

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Frauenklinik der Technischen Universität München
Klinische Forschergruppe

**Einfluss der Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung auf das Apoptoseverhalten und die
Signaltransduktion in kultivierten humanen Ovarialkarzinomzellen**

Anne-Sophie Bächer

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. em. Dr. Manfred Schmitt (schriftl.)/
Prof. Dr. U. Reuning (mündl.)
2. Prof. Dr. Marion B. Kiechle (schriftl.)/
Prof. Dr. P. Knolle (mündl.)

Die Dissertation wurde am 14.08.2017 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 30.05.2018 angenommen.

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Müller, M. A., Brunie, L., Baecher, A. S., Kessler, H., Gottschalk, K. E. & Reuning, U. 2014. Cytoplasmatic salt bridge formation in integrin $\alpha v \beta 3$ stabilizes its inactive state affecting integrin-mediated cell biological effects. *Cell Signal*, 26, 2493-503.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Superfamilie der Integrine	1
1.2	Integrin-vermittelte Signaltransduktion	2
1.3	Struktur des Integrins $\alpha\beta3$	4
1.4	Konformationsänderungen während der Integrinaktivierung	6
1.5	Bedeutung des Integrins $\alpha\beta3$ für die Tumorprogression am Beispiel des Ovarialkarzinoms	9
1.5.1	Das Ovarialkarzinom	11
1.5.2	Zelltod durch Apoptose	13
1.6	Integrin-gesteuerte intrazelluläre Signalkaskaden	16
1.7	Zielsetzung der Dissertation	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Zelllinie	24
2.1.2	Zellkulturmedien und -supplemente	26
2.1.3	Plasmide	26
2.1.4	Herstellung einzelner Zellkulturmedien	26
2.1.5	Sonstige Pufferlösungen	27
2.1.6	Sonstige Materialien und Reagenzien	27
2.1.7	Antikörper/Antigen	28
2.1.8	Instrumente	28
2.1.9	Kits	28
2.1.10	Verbrauchsmaterialien	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Zellkulturtechniken	30
2.2.2	Durchflusszytofluorometrie	32
2.3	Statistische Auswertung	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Untersuchungen zum Einfluss der Integrin $\alpha\beta3$ -Aktivierung auf das Apoptoseverhalten als Funktion der TMD-Sequenz des Integrins $\alpha\beta3$	36
3.1.1	Nachweis früher Apoptoseereignisse durch Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und Propidiumjodid	37

3.1.2	Untersuchungen zum Effekt der Serum-Deprivation auf das Apoptoseverhalten in Suspension kultivierter OV-MZ-6-Zellen als Funktion der Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung	39
3.1.3	Nachweis später Apoptoseereignisse mittels Detektion von durch Caspase generierten Spaltprodukten des Cytokeratins 18	43
3.2	Untersuchungen zum Einfluss der Integrin $\alpha\beta 3$-Aktivierung als Funktion der Ausbildung einer zytoplasmatischen Salzbrücke auf das zelluläre Apoptoseverhalten suspendierter OV-MZ-6-Zelltransfektanten	44
3.2.1	Nachweis früher Apoptoseereignisse durch Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und Propidiumjodid	44
3.2.2	Nachweis später Apoptoseereignisse mittels Detektion von Fragmenten des Cytokeratins 18 nach Spaltung durch Caspase	48
3.3	Einfluss der Integrin $\alpha\beta 3$-Aktivierung auf die Signaltransduktion unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF-κB	50
3.3.1	Aktivierung von Rel Transkriptionsfaktoren bei der Integrin $\alpha\beta 3$ -vermittelten Signaltransduktion in Abhängigkeit von der Integrinaktivierung (TMD-Konformation)	50
3.3.2	Aktivierung von Rel Transkriptionsfaktoren bei der Integrin $\alpha\beta 3$ -vermittelten Signaltransduktion in Abhängigkeit von der Integrinaktivierung (SB-Konformation)	51
4	Diskussion	53
4.1	Einfluss des Aktivierungsstatus (TMD-Konformation) des Integrins $\alpha\beta 3$ auf das Apoptoseverhalten von nicht-adhärenenten OV-MZ-6 Zellen	53
4.2	Integrin $\alpha\beta 3$ /c-Src-vermittelte Signaltransduktion als Mediator verankerungs-unabhängigen Zellwachstums	56
4.3	Einfluss der zytoplasmatischen Salzbrücke des Integrins $\alpha\beta 3$ auf das Apoptoseverhalten in Suspension kultivierter OV-MZ-6 Zellen	57
4.4	Therapeutische Ansatzpunkte und klinische Folgen	61
5	Zusammenfassung	63
	Abbildungsverzeichnis	65
6	Literaturverzeichnis	67
6.1	Zeitschriftenartikel	67
6.2	Internetquellen	78
	Danksagung	79

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APO-1	<i>Apoptosis antigen 1</i>
AS	Aminosäure
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
c-src	<i>Cellular homologue rous sarcoma oncogene</i>
CAS	<i>Cellular apoptosis susceptibility</i>
CD95	<i>Cluster of differentiation 95</i>
CK	Cytokeratin
Col	Kollagen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
erk	<i>Extracellular signal regulated kinases</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FAS	Todesrezeptor Fas (APO-1, CD95)
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
FLIP	<i>FLICE (Caspase-8) inhibitory protein</i>
FN	Fibronektin
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
g	Gramm
GAM	<i>Growth arrest medium</i>
GpA	Glycophorin A
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B α -Kinase-Komplex
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i>

IMD	<i>Integrin mediated death</i>
IκB	<i>Inhibitor of kappa B</i>
konj.	Konjugiert
LN	Laminin
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
max.	maximal
Min.	Minuten
ml	Milliliter
neg.	Negativ
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PI	Propidium Jodid
PI3/AKT	<i>Protein kinase B/cellular homologue AKT8 virus oncogene</i>
pos.	Positiv
PS	Phosphatidylserin
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat Tripeptid
RT	Raumtemperatur
SB	Salzbrücke
SFK	<i>Src family kinase</i>
Std.	Stunden
TF	Transkriptionsfaktor
TMD	Transmembrandomäne
TNFR-1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1
TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
v/v	<i>Volume/volume</i>
VN	Vitronektin
w/v	<i>Weight/volume</i>
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Integrine sind heterodimere Transmembranproteine, deren Rolle bei der Karzinogenese bereits eingehend untersucht wurde. Sie stellen wichtige Zielmoleküle pathophysiologischer Prozesse dar, wie z.B. der Tumorgenese, der Angiogenese, der Hämostase und der Wundheilung. Ein Großteil der Literatur beschäftigt sich hierbei mit dem Einfluss auf die zell- und tumorbiologischen Aspekte der Zelladhäsion, der Zellproliferation, der Zellmigration, der Signaltransduktion und des Zellüberlebens. Die Mechanismen und Konformationsänderungen bei der Integrinaktivierung sind bisher nicht vollständig geklärt. Bisher wurde ein 3-Zustands-Modell postuliert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss der Integrinaktivierung am Beispiel des tumorbiologisch relevanten Integrins $\alpha\beta3$ auf ausgewählte Signaltransduktionswege sowie auf das Apoptoseverhalten bei humanen Ovarialkarzinomzellen in Suspensionskultur.

1.1 Die Superfamilie der Integrine

Fundamentale biologische Prozesse wie Organentwicklung, Hämostase, Angiogenese, Immunreaktion oder auch Gewebereparatur und Wundheilung setzen eine funktionierende Kommunikation der Zelle mit ihrer Umwelt, der extrazellulären Matrix (EZM) und anderen Zellen voraus. Ein wichtiger Mechanismus hierbei ist die Zelladhäsion, die den spezifischen, Rezeptor-vermittelten Kontakt zwischen Zellen untereinander oder zwischen Zellen und der sie umgebenden EZM herstellt. Adhäsions- und Signalrezeptoren wie Cadherine, Integrine, Selektine und die Immunglobulin (Ig) -Superfamilie vermitteln diese Kontakte und erlauben die Transmission von Signalen über die Zellmembran hinweg ins Zellinnere. Integrine stellen dabei die Hauptgruppe transmembraner Adhäsions- und Signaltransduktionsrezeptoren dar, welche hauptsächlich die Zell-EZM-Adhäsion vermitteln.

Zu den Aufgaben der Integrine als Transmembranproteine gehören die Steuerung zellphysiologisch wichtiger Prozesse wie Zelladhäsion, -migration, -proliferation und -

differenzierung sowie die Regulierung des Zellüberlebens und des programmierten Zelltods (Apoptose). Die Namensgebung der Integrine erfolgte durch Hynes et al. entsprechend ihrer Funktion, das Interzellulärskelett mit der EZM zu „integrieren“ (Tamkun et al., 1986, Hynes, 1987). Die Integrin-Superfamilie besteht aus 24 Mitgliedern, diese wiederum aus bestimmten Kombinationen verschiedener Untereinheiten. Je nach der Spezifität ihrer Ligandenbindung können sie in Subfamilien unterteilt werden (Hynes, 2002). Integrine sind nicht-kovalent verbundene Heterodimere, die sich aus je einer α - und einer β -Untereinheit zusammensetzen (Hynes, 1987). Die Ketten bestehen jeweils aus einer großen extrazellulären Domäne (N-Terminus), einer Transmembrandomäne (TMD) und einer relativ kurzen zytoplasmatischen Domäne (C-Terminus). Die Kopfgruppen der extrazellulären Domänen der α - und β -Untereinheit bilden gemeinsam die Ligandenbindungsstelle. Über kurze Peptidsequenzen, wie z.B. das Arg-Gly-Asp (RGD)-Motiv, erkennen Integrine - darunter auch das Integrin $\alpha v \beta 3$ - ihre Liganden. Die EZM-Proteine Vitronektin (VN), Fibronektin (FN), Laminin (LN) und Kollagen (Col) verfügen über ein RGD-Motiv (Ruoslahti, 1996, van der Flier and Sonnenberg, 2001, Zanetti et al., 1994, Shattil et al., 2010). Das zytoplasmatische Ende der β -Kette verbindet das Integrin mit dem Aktinzytoskelett.

Der exakte Mechanismus der Integrinaktivierung mit den sie begleitenden Konformationsänderungen, sowie die bidirektionale Übertragung der Signale (sog. *inside-out* und *outside-in signaling*) über die Zellmembran hinweg ins Zellinnere sind Gegenstand aktueller Forschung.

1.2 Integrin-vermittelte Signaltransduktion

Eine Besonderheit der Integrine stellt ihre Fähigkeit dar, bidirektional (*outside-in* und *inside-out*) Signale über die Zellmembran hinweg zu transduzieren (Hynes, 2002). Es existieren mehrere Erklärungsmodelle, auf welche Weise die Integrine Signale von ihrer extrazellulären Ligandenbindungsstelle und ihrer zytoplasmatischen Domäne übertragen (Xiong et al., 2001, Gottschalk et al., 2002, Takagi et al., 2002, Luo et al., 2007, Shattil et al., 2010, Hu and Luo, 2013, Kim et al., 2003, Kim et al., 2011).

Beim Prozess des *inside-out signaling* kommt es durch Bindung von intrazellulären Zytoskelettproteinen wie Talin oder Kindlin an die β -Integrinuntereinheit zu einer Veränderung der Integrinkonformation.

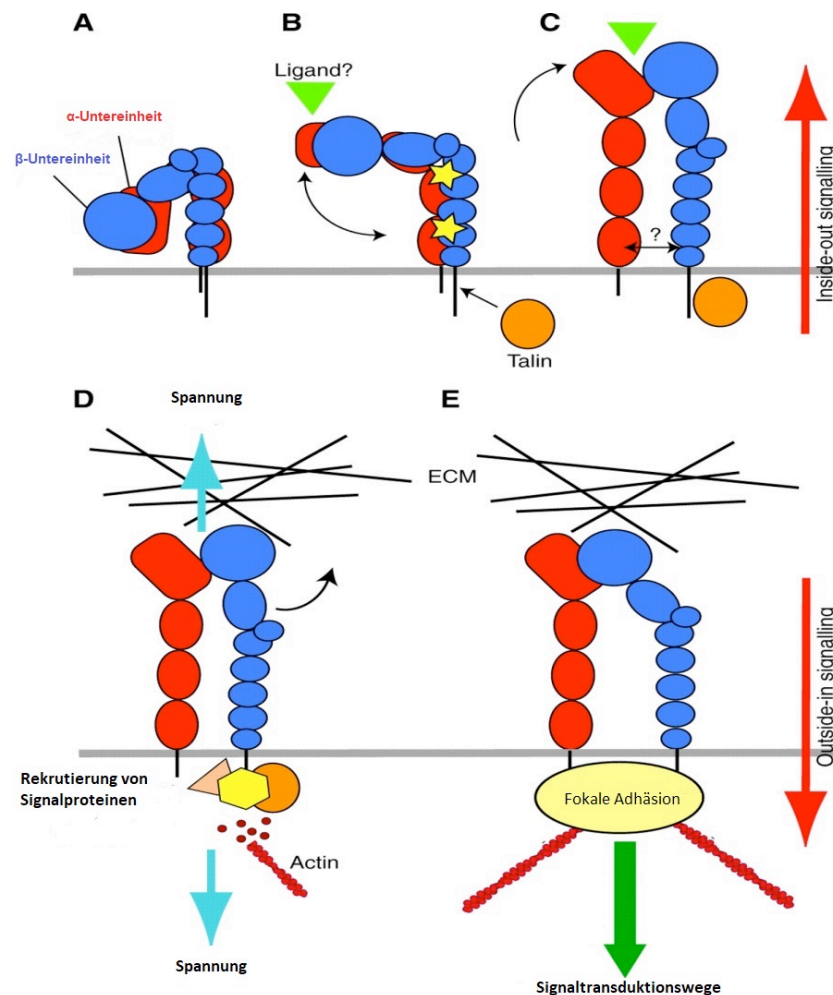


Abbildung 1: Schematische Darstellung der bidirektionalen Integrin-vermittelten Signaltransduktion

Durch die Bindung von intrazellulären Aktivatoren wie z.B. Talin (B) oder Actin an die β -Untereinheit des Integrins ändert sich die Konformation des Integrins: Durch die geänderte räumliche Orientierung können sich die extrazellulären Anteile aufrichten, was zu einer erhöhten Affinität zu den Liganden sowie einer erhöhten Adhäsionskraft und Zellmigration führt. Die Rekrutierung von Signalproteinen führt zur Modulation der mechanischen Spannung in der EZM. Der ruhende Zustand geht in den aktivierten über, das *inside-out signaling* (A-C) kann stattfinden. Bindung von EZM-Liganden an die Ligandenbindungsstelle der extrazellulären Domäne führt zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, wie z.B. der fokalen Adhäsionskinase (FAK), sog. *outside-in signaling* (D und E). Hierüber finden Veränderungen der Zellproliferation, der Motilität, des Zellüberlebens bzw. Zelltods und der Genexpression statt (Abb. modifiziert nach Askari et al., 2009).

Die Integrinuntereinheiten weichen auseinander, sodass die TMD dissoziieren und ihre Interaktion unterbrochen wird. Dies führt wiederum zu einer veränderten Ausrichtung zwischen der α - und der β - Untereinheit (Calderwood, 2004). Durch die geänderte räumliche Orientierung können sich die extrazellulären Anteile aufrichten, was zu einer erhöhten Affinität zu den Liganden sowie einer erhöhten Adhäsionskraft und Zellmigration führt. Durch die Konformationsänderungen wandelt sich das Integrin also von einem abgewinkelten, geschlossenen Zustand mit geringer Ligandenbindungsaffinität in einen aufrechten, offenen Zustand mit hoher Affinität zu den Liganden, s. Abbildung 1 (Takagi et al., 2002, Tadokoro et al., 2003).

Beim sog. *outside-in signaling* kommt es zur Besetzung der Ligandenbindungsstelle durch einen Liganden der EZM. Im Zellinneren werden nach Anbindung eines Signalmoleküls an die β -Untereinheit verschiedene Signalkaskaden initiiert (s.a. Kapitel 1.6). Dies geschieht durch Phosphorylierung von Proteinen und durch eine Reorganisation des Zytoskeletts (Vinogradova et al., 2002). Die Aktivierung der Signalkaskaden beeinflusst diverse biologische Schlüsselprozesse, darunter v.a. die Zellproliferation, Motilität, Genexpression, aber auch das Zellüberleben und die Apoptose (Hynes, 2002, Shattil et al., 2010).

1.3 Struktur des Integrins $\alpha v \beta 3$

Integrine verfügen als Heterodimere mit nicht-kovalent verbundener α - und β -Untereinheit über eine flexible Struktur. Dadurch können sie ihrer Funktion als Transmembranproteine nachkommen mit der Kapazität, eine bidirektionale Signaltransduktion zu initiieren. Am Beispiel des tumorbiologisch relevanten Integrins $\alpha v \beta 3$ wird die Integrinstruktur gezeigt (s.a. Abbildung 2). Die αv -Untereinheit des Integrins besteht aus 1018 Aminosäuren mit 13 potentiellen N-Glykosylierungsstellen und vier typischen N-terminalen *tandem repeats*. Die mit 762 Aminosäuren kürzere $\beta 3$ -Untereinheit ist weniger glykosyliert und besitzt vier *tandem repeats*, die Cysteinreste enthalten. Die erstmalige Auflösung der Kristallstruktur der Extrazellulärdomäne des Integrins $\alpha v \beta 3$ im Jahr 2001 durch Xiong et al. brachte für diese wichtige Rezeptorfamilie neue Erkenntnisse über die Ligandenbindung und die Signaltransduktion über die Zellmembran hinweg (Xiong et al., 2001). Der Hauptteil des Proteins befindet sich extrazellulär. Sowohl die α - als auch die β -Untereinheit

bilden innerhalb eines ovoiden Proteinkopfes die Liganden-Bindungsdomäne. Der extrazelluläre Bereich der $\beta 3$ -Kette besteht aus der βA -, einer Immunglobulin ähnlichen Hybrid-, sowie einer PSI (Plexine Semaphorine, Integrine)- Domäne. Die Kopfgruppe des extrazellulären Anteils der αv -Kette setzt sich aus einer siebenblättrigen β -Propeller-Einheit sowie aus einem Proteinrest zusammen. Eben genannte Domänen sind über ein Gelenk (*genu*) verbunden. Von Bedeutung für die Integrinaktivierung ist hierbei, dass der extrazelluläre Anteil des Integrins $\alpha\beta 3$ *in vitro* an der Stelle des *genu*-Gelenks in einem Winkel von $\sim 135^\circ$ zusammengeklappt werden kann. Diese hohe Flexibilität soll eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Integrine sowie für die Affinität bei der Ligandenbindung spielen. Die dynamischen Konformationsänderungen werden im folgenden Kapitel erläutert.

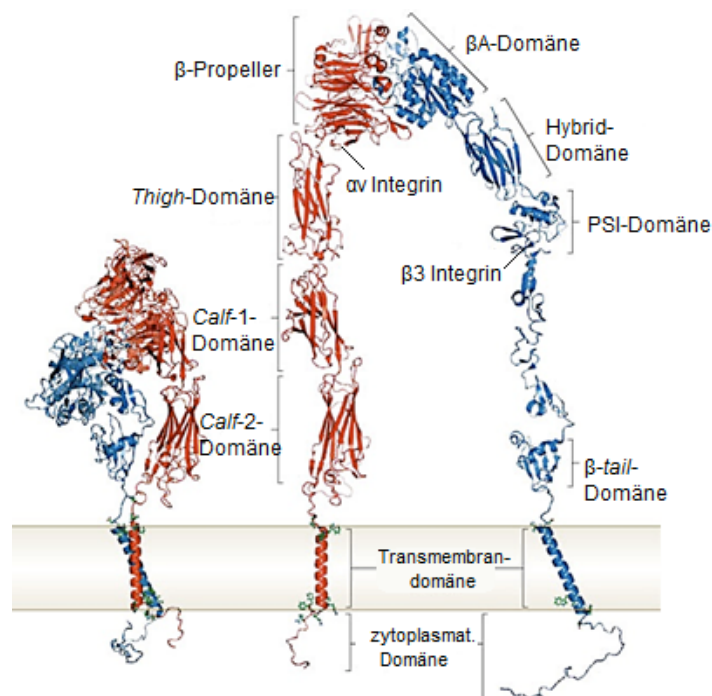


Abbildung 2: Die Integrinstruktur am Beispiel des Integrins $\alpha v \beta 3$

Integrine sind α/β -heterodimere Transmembranproteine, die pro Untereinheit eine extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine zytosolische Domäne aufweisen. Die Abbildung zeigt linksseitig ein Integrin im gebeugten Zustand (*bent conformation*). Auf der rechten Bildhälfte ist ein Integrin im aufrechten Zustand (*extended conformation*) gezeigt, so dass man hier die verschiedenen Domänen der Integrinstruktur genauer erkennen kann. Die α -Untereinheit verfügt über eine β -Propeller-Einheit sowie einen Proteinrest mit einer *thigh*- und 2 *calf*-Domänen. Die β -Untereinheit setzt sich aus einer βA -, einer Ig-ähnlichen Hybrid-, sowie einer PSI-Domäne zusammen. Die flexiblen Strukturmerkmale erlauben Konformationsänderungen während der Integrinaktivierung. Die Kopfgruppen der extrazellulären Domänen formen gemeinsam die Ligandenbindungsdomäne (Abb. modifiziert nach Shattil et al., 2010).

1.4 Konformationsänderungen während der Integrinaktivierung

Integrine nehmen während ihrer Aktivierung verschiedene transiente Konformationszustände an. Aktuell geht man von einem 3-Zustands-Modell aus: Ruhender Zustand mit geringer Affinität zu den Liganden (*bent conformation*), intermediärer Zustand (*extended conformation* mit geschlossener TMD) und hochaffiner, aktivierter Zustand (*extended conformation* mit offener TMD) (Boettiger et al., 2001, Gottschalk et al., 2002, Anthis and Campbell, 2011). Die Aufdeckung der Kristallstruktur der Extrazellulärdomäne des Integrins $\alpha\beta3$ durch Xiong et al. brachte neue strukturelle Informationen über die Extrazellulärdomäne der α - und der β -Untereinheit (2001). Sie kann in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen: Abgewinkelt (*bent*) oder aufrecht (*extended*), wobei erstere den inaktiven Zustand beschreibt, mit geringer Affinität zu den extrazellulären Liganden. Wird der Rezeptor aktiviert, folgt die Extension der Extrazellulärdomäne und die Kopfgruppe der Extrazellulärdomänen öffnet sich. Es kommt zur Aktivierung des Integrins und eine hohe Bindungsaffinität gegenüber den Liganden ist zu beobachten (Takagi et al., 2002, Luo et al., 2007).

Die Transmembrandomänen sind durch strukturelle Anpassung ebenfalls in die Integrinaktivierung involviert. Im ruhenden Zustand stellen die TMD eine rechtsdrehende Doppelwendel mit Ausbildung einer elektrostatischen Verbindung dar. Diese Verbindung kann sich zwischen spezifischen, konservierten Regionen der TMD der beiden Untereinheiten ausbilden (Gottschalk, 2005). Senes et al. konnten eine große Ähnlichkeit zwischen einer der spezifischen Regionen der Integrin-TMD mit dem GxxxG-Dimerisierungsmotiv innerhalb der TMD des Glycophorin A (GpA), eines homodimeren Erythrozytenproteins, aufzeigen (Lemmon et al., 1992, Senes et al., 2004). Die Arbeitsgruppe Reuning untersuchte die Rolle des GxxxG-Motivs bei der Assoziation der Untereinheiten des Integrin $\alpha\beta3$. Im GpA vermittelt das GxxxG-Motiv eine starke homodimere TMD-Assoziation (Senes et al., 2004). Mehrere Autoren beschreiben eine Assoziation der α - und der β -TMD-Segmente im inaktiven, ruhenden Zustand des Integrins (Wegener and Campbell, 2008, Luo et al., 2007, Zhu et al., 2009). Unterschiedliche experimentelle Verfahren stützen dieses Modell: Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Adair and Yeager, 2002), Disulfid-Crosslinking-Experimente (Luo et al., 2004), Erzeugung aktivierender Mutanten (Partridge, Liu et al. 2005) und FRET (eng. *fluorescence resonance energy transfer*)-

Analysen (Kim et al., 2003). Müller et al. stellten Integrin $\alpha\beta3$ -GpA-Chimären her, in denen die komplette Integrin TMD beider Untereinheiten vollständig durch die stark dimerisierende, komplette TMD des GpA ausgetauscht wurde (TMD-GpA) (2013). Es zeigte sich ein Integrin $\alpha\beta3$ im *non-signaling* Modus mit geringer basaler Affinität gegenüber dem EZM-Liganden VN, welche sich nach Kraffteinwirkung erhöhte. Dies wurde mittels *atomic force microscopy* dargestellt. Die Integrin $\alpha\beta3$ -TMD-GpA-Mutante zeigte außerdem Charakteristika eines intermediären Integrinaktivierungszustandes, wie er direkt nach dem Prozess des *inside-out signaling*, aber noch vor dem *outside-in signaling* vorkommt. Als nächstes wurde eine weitere Mutante des Integrins $\alpha\beta3$ generiert, in der das zentrale GxxxG-Motiv zu GxxxI (TMD-GpA-I) verändert wurde, eine Mutation, die bekanntermaßen die TMD-Assoziation beim GpA aufhebt. Diese Integrin $\alpha\beta3$ -TMD-GpA-I-Mutante zeigte eine gesteigerte *inside-out*-Aktivierung und ein konstitutives *outside-in signaling* (Müller et al., 2013). Den TMD der Integrinuntereinheiten kommt somit eine große Rolle bei den allosterischen Konformationsänderungen im Zuge der Integrinaktivierung zu.

Auch das Auseinanderweichen der kurzen zytoplasmatischen Domänen des Integrins geht mit der Trennung der TMD einher und kann damit zur Integrinaktivierung beitragen (Luo et al., 2007, O'Toole et al., 1994, Hughes et al., 1996). Hughes und Mitarbeiter fanden heraus, dass die zytoplasmatischen Domänen der beiden Integrinuntereinheiten ein bestimmtes Motiv mit polaren und apolaren Sequenzen zeigen: Ein GFFKR-Motiv in der α -Untereinheit und ein LLxxxHDRE-Motiv in der β -Untereinheit. Es wird hier membranah eine elektrostatische Wechselwirkung über eine putative Salzbrücke (α R995; β D723) vermutet (s.a. Abbildung 3). Dies ist eine nicht-kovalente Interaktion zwischen den zytoplasmatischen Untereinheiten, basierend auf Wasserstoffbrückenbindungen und anderen elektrostatischen Wechselwirkungen (Lau et al., 2009, Hughes et al., 1996, Vinogradova et al., 2002, Calderwood, 2004). Im ruhenden Zustand befinden sich die beiden TMD der Integrinuntereinheiten im assoziierten Zustand; diese räumliche Nähe stellt eine Voraussetzung zur Bildung der Salzbrücke dar. Mehrere Studien unterstützen ein Modell, in dem das ruhende, gebeugte Integrin (*bent conformation*) durch die Bildung einer Salzbrücke zwischen den zytoplasmatischen Untereinheiten stabilisiert wird (Hughes et al., 1996, Partridge et al., 2005, Lau et al., 2009).

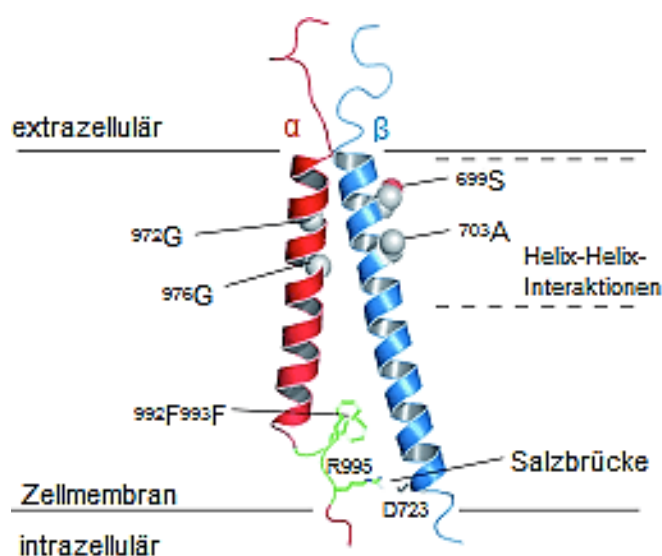


Abbildung 3: Schema der Integrin Transmembrandomänen und einer putativen Salzbrücke zwischen den zytoplasmatischen Domänen beider Untereinheiten

Sowohl die α - als auch die β -Untereinheit mit den jeweiligen TMD und den zytoplasmatischen Domänen sind gezeigt. Die TMD sind essenziell für das Übermitteln von Informationen über die Zellmembran hinweg (sog. *inside-out* und *outside-in signaling*). Das GxxxG-ähnliche Motiv spielt eine wichtige Rolle bei der Assoziation der Transmembrandomänen. Zwischen den zytoplasmatischen Enden besteht eine putative Salzbrücke (α R995; β D723). Durch elektrostatische Kräfte hält sie das Integrin in einem ruhenden Zustand. Bindet Talin an die β -Untereinheit, rupturiert die Salzbrücke und es kommt zur Integrinaktivierung (Abb. modifiziert nach Hoefling et al., 2009).

Die an der Bildung der putativen Salzbrücke beteiligten Aminosäuren befinden sich in hochkonservierten Sequenzen der α - und der β -Untereinheit, ein weiterer Hinweis auf ihre spezifische, potentiell funktionelle Rolle (Hughes et al., 1996, Vinogradova et al., 2002, Lau et al., 2009). Unter physiologischen Bedingungen ist der finale Schritt der Integrinaktivierung das Binden des Zytoskelettproteins Talin an das NPxY-Motiv der zytoplasmatischen β -Untereinheit, wodurch es zur Unterbrechung der Salzbrücke mit daraus resultierendem Auseinanderweichen der zytoplasmatischen Domänen und nachfolgender Integrinaktivierung kommt (Shattil et al., 2010, Anthis and Campbell, 2011). Dementsprechend konnten verschiedene Studien zeigen, wie wichtig eine intakte zytoplasmatische Salzbrücke ist, um das Integrin in einem ruhenden Zustand zu halten (Hughes et al., 1996, Lau et al., 2009, Kim et al., 2003). Kommt es hingegen zur Dissoziation der Salzbrücke, wird postuliert, dass es zur Aktivierung des Integrins mit der Folge des *outside-in signaling* kommt (Hughes et al., 1996). Um den Einfluss der Salzbrücke auf die Integrinaktivierung darzustellen, führten Müller et al. (2014)

Integrin $\alpha\beta3$ -Mutanten ein, bei denen die die Salzbrücke bildenden Aminosäuren ausgetauscht wurden (α_{R995D} und β_{D723R}). Es wurden hierbei für Zelltransfektionen verschiedene Integrin $\alpha\beta3$ -Salzbrücken Varianten generiert mit entweder der Ausbildung einer Salzbrücke ($\alpha\beta3$ -Wildtyp und umgekehrt geladene Salzbrücken-Mutante $\alpha_{V_{R995D}}\beta_{D_{723R}}$) oder mit einer rupturierten Salzbrücke ($\alpha_{V_{R995D}}\beta_3$ und $\alpha\beta_{D_{723R}}$); letzteres zeigte als Konsequenz ein gesteigertes *inside-out* und *outside-in signaling*.

Allerdings wird der Einfluss auf die Integrinaktivierung oder auch die Existenz einer Salzbrücke von verschiedenen Autoren kontrovers diskutiert (s.a. Kapitel 4.3). Auch wenn die Ausbildung einer Salzbrücke für die korrekte Rezeptoraktivierung und -regulierung der Integrine wichtig zu sein scheint, fehlt dennoch Klarheit über die genauen Mechanismen.

1.5 Bedeutung des Integrins $\alpha\beta3$ für die Tumorprogression am Beispiel des Ovarialkarzinoms

Integrine spielen bei vielen pathophysiologischen Prozessen wie der Tumormetastasierung und der Angiogenese eine große Rolle (Desgrosellier and Cheresh, 2010, Felding-Habermann, 2003, Giancotti and Mainiero, 1994, Guo and Giancotti, 2004, Hood and Cheresh, 2002, Weis and Cheresh, 2011a). Eines der am besten untersuchten Integrine ist das Integrin $\alpha\beta3$, welches bei verschiedenen Krebsarten zur Tumorprogression beiträgt. Es wird von verschiedenen Zelltypen exprimiert, darunter endotheliale Zellen, glatte Muskelzellen, Monozyten, Thrombozyten, Leukozyten und Karzinomzellen (Murphy et al., 1994). Außerdem stellt es einen wichtigen Angiogenesemarker dar, da es auf Endothelzellen während der Angiogenese exprimiert wird (Weis and Cheresh, 2011b, Kumar, 2003). Der Begriff Angiogenese beschreibt hierbei die Neubildung von Gefäßen, die es dem Tumor ermöglichen, seine Versorgung sicherzustellen, und somit eine essenzielle Grundlage für Tumorwachstum und auch Metastasierung bieten. Es wurde erstmals 1985 von Pytela et al. nach seiner Fähigkeit, RGD-Sequenzen auf EZM-Liganden zu erkennen, beschrieben (Pytela et al., 1985). Obwohl das Integrin $\alpha\beta3$ klassischerweise als Vitronektin-Rezeptor bezeichnet wird, ist dieser Name zu restriktiv gewählt, da auch viele weitere EZM-Liganden an das Integrin $\alpha\beta3$ binden, wie z.B. Fibronektin,

Fibrinogen, der von-Willebrand-Faktor, Laminin und Osteopontin (Humphries et al., 2006). Viele maligne Tumoren zeigen eine Integrin $\alpha\beta3$ -Überexpression, darunter das maligne Melanom, das Pankreas-, das Mamma- und das Ovarialkarzinom (Felding-Habermann et al., 2001, Hosotani et al., 2002, Landen et al., 2008, Nip et al., 1992). Verschiedene Studien diskutieren eine Förderung der Tumorprogression durch die Vermittlung von Signalkaskaden und eine Kooperation mit anderen Rezeptoren, welche bekanntermaßen eine Rolle bei der Karzinogenese spielen. Hapke et al. (2003) zeigten nach Überexpression des Integrins $\alpha\beta3$ sowie durch Zelladhäsion an den EZM-Liganden VN eine verstärkte Zellproliferation und Zellmotilität. Lössner et al. (2008) zeigten eine Induzierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors EGF-R sowie der Integrin-linked Kinase ILK als Funktion der Integrin $\alpha\beta3$ -Expression.

Neben den eben genannten Integrinliganden-abhängigen Ereignissen konnten verschiedene Studien in Bezug auf Tumorwachstum und Zellüberleben auch eine Rolle für das unligierte Integrin $\alpha\beta3$ aufzeigen, also Liganden-unabhängig (Desgrosellier et al., 2009). Diese unligierten Integrine sind im gesunden Organismus vor allem bei der Modulation der Apoptose von Bedeutung. Desgrosellier et al. konnten zeigen, dass das Integrin $\alpha\beta3$ durch verankerungs-unabhängiges Zellwachstum (sog. *anchorage independance*) zur Tumorprogression beiträgt. Hierzu ist die Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase c-Src (s. Kapitel 1.6) notwendig, welche überraschenderweise unabhängig von der Zelladhäsion oder der Aktivierung des wichtigen Signalmoleküls FAK stattfindet (Desgrosellier et al., 2009). Tumorzellen, die also nicht mehr auf Substratkontakt angewiesen sind, um überleben zu können, können sich aus dem normalen Zellverband lösen und andere Organe invadieren. Dies kann zur Bildung von Metastasen führen (Yawata et al., 1998, Simpson et al., 2008). Ein Beispiel hierfür stellt die Tumorzell dissemination in Aszites in der Peritonealhöhle beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom dar.

Beim Ovarialkarzinom ist eine Korrelation der Integrin $\alpha\beta3$ -Expression mit der Tumorprogression bekannt; so zeigt sich in hochmalignen Ovarialkarzinomen eine höhere Integrin $\alpha\beta3$ -Expression als in niedermalignen (Liapis et al., 1997). Da auch die vorliegende Dissertation am Beispiel kultivierter humaner Ovarialkarzinomzellen durchgeführt wurde, folgt an dieser Stelle eine Einführung in das Krankheitsbild.

1.5.1 Das Ovarialkarzinom

Das Risiko für Frauen in Deutschland, jemals einen bösartigen Tumor der Eierstöcke, dem zweithäufigsten malignen Genitaltumor der Frau, zu entwickeln, liegt bei 1,5% (1 von 68 Frauen). Obwohl die Erkrankungsfälle seit 1990 deutlich rückläufig sind, lässt sich diese Tendenz nicht bei den Mortalitätsraten verzeichnen; jährlich sterben in Deutschland ca. 5500 Frauen an bösartigen Veränderungen des Ovars. Die geschätzte Neuerkrankungsrate für das Jahr 2016 beträgt in Deutschland ca. 7200 Frauen. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren, wobei die Wahrscheinlichkeit, ein Ovarialkarzinom zu entwickeln, bis zum 85. Lebensjahr kontinuierlich ansteigt und danach nahezu konstant bleibt. Das relative 5-Jahres-Überleben beträgt derzeit etwa 41% und zeigt somit – im Vergleich zu anderen Tumoren der weiblichen Geschlechtsorgane – eine eher schlechte Prognose (Krebs in Deutschland 2011/2012. Häufigkeiten und Trends. Robert Koch-Institut 2015, 90). Es konnten mehrere Risikofaktoren wie Alter, Infertilität, Nulliparität und vererbare Genmutationen identifiziert werden. Andererseits wirken sich verschiedene Faktoren protektiv auf die Entstehung aus, z.B. eine hohe Zahl an Schwangerschaften und die langjährige Einnahme oraler Kontrazeptiva (Beral et al., 2008).

Ein Grund für die hohen Mortalitätsraten ist das Fehlen typischer Frühsymptome. Auch die Spätsymptome sind unspezifisch und meist durch Aszites und Darmbefall bedingt (Bankhead et al., 2005, Goff, 2012). Bisher gibt es keine effektive Screening-Maßnahme zur Früherkennung des Ovarialkarzinoms (Buys et al., 2011, Menon, 2012, Walsh and Karlan, 2007). Entscheidend für die Prognose bleibt daher vor allem, in welchem Tumorstadium das Ovarialkarzinom diagnostiziert wird. Die derzeitige Standardtherapie sieht eine Operation vor, deren wichtigstes Prinzip darin besteht, sämtliches sichtbares Tumorgewebe in der Bauchhöhle zu entfernen. Anschließend wird in Abhängigkeit vom Tumorstadium eine platinhaltige Chemotherapie durchgeführt (Borges and Schmalfeldt, 2011).

Die Ausbreitung des Ovarialkarzinoms verläuft intraperitoneal und lymphogen in die pelvinen und paraaortalen Lymphknoten. Eine ernstzunehmende Komplikation des Ovarialkarzinoms ist die peritoneale Disseminierung, ein Prozess, bei dem Krebszellen sich von ihrer primären Lokalisation lösen und in Abwesenheit von Zell-EZM-Kontakten überleben können. Im Aszites in der Peritonealhöhle überlebende, einzelne

Zellen bzw. kleine Zellaggregate könnten somit als eine *in vivo* Suspensionszellkultur angesehen werden (s. Abbildung 4) (Frankel et al., 2001).

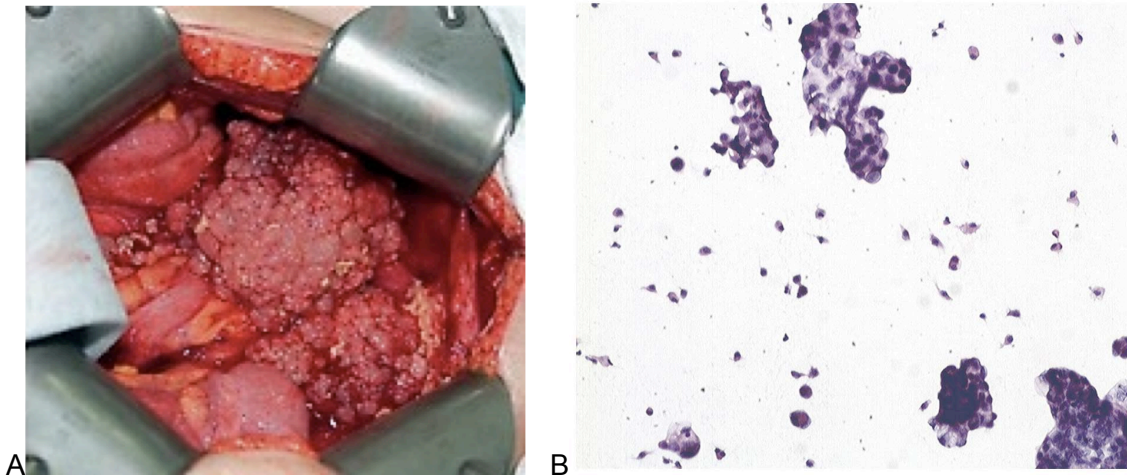


Abbildung 4: Ovarialkarzinomzellen in Aszites bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom

A) Das klinische Bild des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms präsentiert sich häufig mit der Bildung von Aszites. Eine Störung des physiologisch vorherrschenden Gleichgewichts zwischen Bildung und Lösen von Zelladhäsionskontakten ermöglicht die Disseminierung der Karzinomzellen im Aszites auf das Peritoneum und Organe des kleinen Beckens, wo sie zu Tumormetastasen auswachsen. Diejenigen Zellen, die nach Substratverlust nicht in die Apoptose eintreten, sondern fähig sind zu überleben bzw. zu proliferieren, können zur Metastasierung führen (Abb. modifiziert nach Dtsch Arztebl Int 2011; 108(38): 635-41; DOI: 10.3238/arztebl.2011.0635B). B) Die Abbildung zeigt das mikroskopische Bild in Aszites schwimmender Ovarialkarzinomzellen. Deutlich erkennt man ein typisches Nebeneinander von einzelnen, isoliert vorliegenden Tumorzellen sowie von Tumorzellaggregaten (*floating clusters*) (Abb. modifiziert nach Cui et al., 2012).

Essenziell für die Ausbreitung der Krebszellen in der Bauchhöhle ist hierbei eine Störung der normalerweise fein geregelten Balance zwischen der Bildung und dem Lösen von Zell-EZM-Adhäsionskontakten. Die pathologische Migration mit nachfolgender Invasion in umliegendes Gewebe führt dann zu malignen Prozessen wie der Bildung von Tumoren oder auch zur Metastasierung. Es stellt sich die grundlegende Frage, wie die aus ihrem Zellverband gelösten Zellen in Aszites überleben können, denn normalerweise führt der Verlust des Integrin-vermittelten Zell-EZM-Kontakts bei epithelialen, verankerungs-abhängigen Zellen zum programmierten Zelltod (Frisch and Francis, 1994).

1.5.2 Zelltod durch Apoptose

Integrine besitzen die Fähigkeit, Überleben und Tod einer Zelle zu regulieren. Dies kann für eine Krebszelle bedeuten, dass sie die normalen Kontrollmechanismen des Organismus umgehen kann, überlebt, sich vermehrt und ggf. zur Metastasenbildung und Tumorprogression führt.

Der Begriff Apoptose (altgriechisch für „fallende Blätter“) bezeichnet den programmierten Zelltod und wurde 1972 von Kerr et al. eingeführt, um eine durch spezifische Morphologie und Prozesse geprägte Form des Zelltods zu beschreiben (Kerr et al., 1972).

Der Zelltod durch Apoptose läuft ohne Entzündungsreaktion ab. Typische morphologische Veränderungen im Ablauf sind Chromatinkondensation, Fragmentierung des Chromatins im Zellkern, Schrumpfung und Zerfall der Kernmembran, Verlust des Kontakts zu den Nachbarzellen und die Bildung von Membranvesikeln, den sog. Apoptosekörpern, die durch Makrophagen phagozytiert werden (Kerr et al., 1972). Die Apoptose spielt in der Entwicklung und Differenzierung multizellulärer Organismen eine äußerst wichtige Rolle und sorgt für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase (Danial and Korsmeyer, 2004). Darüber hinausgehend ist sie von großer Bedeutung bei der Morphogenese, der Entwicklung der Immuntoleranz, aber auch der Beseitigung defekter Zellen. Fehler im Ablauf der Apoptose führen daher in Zellen zu pathologischen Zuständen: Autoimmunkrankheiten, Virusinfektionen oder auch Karzinomentstehung (Thompson, 1995, Reed, 2002, Mullauer et al., 2001).

Die Apoptose kann entweder über den extrinsischen oder den intrinsischen Signalweg ausgelöst werden (s. Abbildung 5). Der extrinsische Signalweg (auch Rezeptorvermittelte Apoptose genannt) wird durch Bindung von Liganden an sog. Todesrezeptoren aktiviert. Zu diesen Rezeptoren gehören u.a. Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1 (TNFR-1), Fas (=CD95=APO-1) und die TRAIL-Rezeptoren. Intrazelluläre Stress-Signale (z.B. DNA-Schäden, oxidativer Stress) aktivieren den intrinsischen Weg: In Anwesenheit von Stress-Signalen kommt es zu einem Überwiegen pro-apoptotischer Proteine. Dazu gehören die Proteine der Bcl2-Superfamilie, die in der Mitochondrienmembran lokalisiert sind und Permeabilitätsporen bilden, so dass das Membranpotential der inneren Mitochondrienmembran zusammenbricht und mitochondriale Apoptose-

Mediatorproteine in das Zytoplasma freigesetzt werden (Kuwana et al., 2002). Zu diesen Apoptose-Mediatorproteinen gehören Cytochrom C und Smac/Diablo.

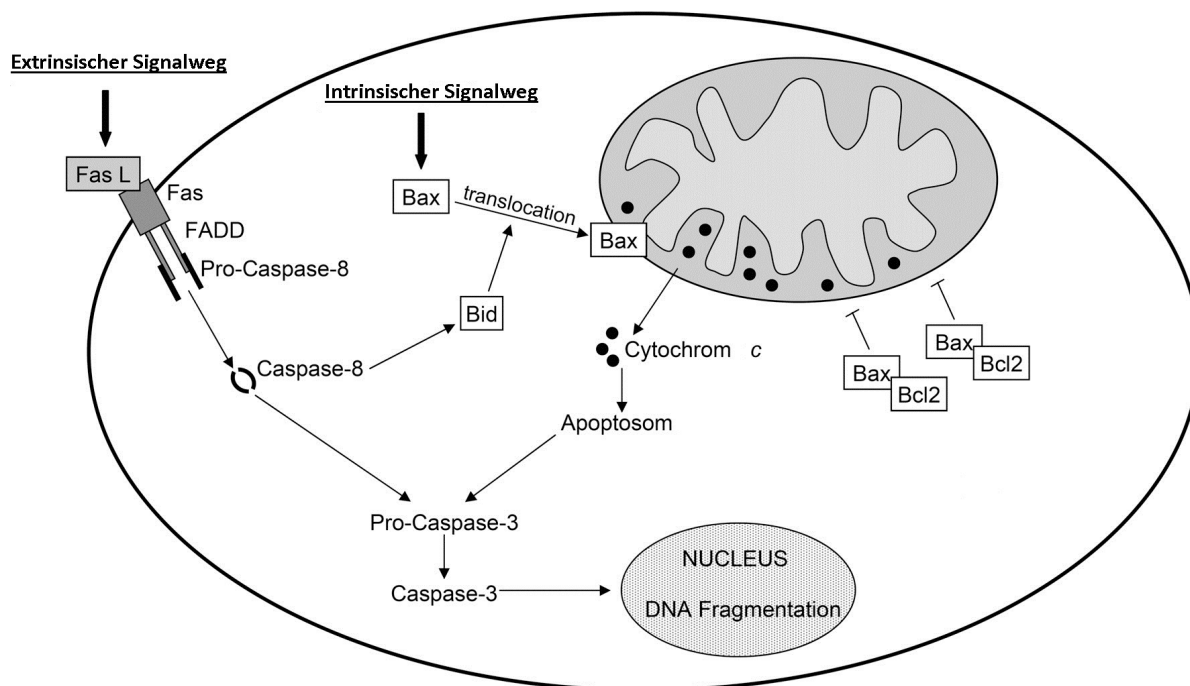


Abbildung 5: Auslösen der Apoptose via intrinsischen und extrinsischen Signalwegs

Die Apoptose kann über den intrinsischen oder den extrinsischen Signalweg ausgelöst werden. Der extrinsische Signalweg wird durch Bindung von Liganden an sog. Todesrezeptoren aktiviert (Rezeptor-vermittelte Apoptose). Diese Rezeptoren sind Mitglieder der TNFR-Superfamilie. Zu ihnen zählen u.a. TNFR-1, Fas (=CD95=APO-1) und die TRAIL-Rezeptoren. Im Verlauf wird die Procaspase-8 rekrutiert, welche durch autokatalytische Spaltung zur Caspase-8 aktiviert wird. Dadurch kommt es zur kaskadenartigen Aktivierung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7. Der intrinsische Signalweg wird durch intrazelluläre Signale wie DNA-Schäden oder oxidativen Stress aktiviert. Die intrazellulären Stress-Signale führen zur Freisetzung von Apoptose-Mediatoren (v.a. Cytochrom c) aus der permeabilisierten Mitochondrienmembran (Mitochondrien-vermittelte Apoptose). Es kommt zu einem Übergewicht an pro-apoptotischen Proteinen (z.B. Bax, Bad, Bid), die wiederum zur Bildung von Poren in der Mitochondrienmembran führen, so dass mitochondriale Apoptose-Mediatorproteine in das Zytoplasma freigesetzt werden. Im Verlauf wird die Caspase-9 aktiviert, die zur Aktivierung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 führt. Zwischen intrinsischem und extrinsischem Signalweg besteht eine Verbindung: Caspase-8 kann das pro-apoptotische Bcl-2-Protein Bid spalten (tBid) und so den intrinsischen Signalweg aktivieren. Es kommt hierdurch zu einer Signalverstärkung (Abb. modifiziert nach Aurelian, 2005).

In der Folge kommt es zur Aktivierung sog. Caspasen (englisch *cysteinyl-aspartic acid protease*). Caspasen stellen eine Gruppe von Proteasen dar, die einen Cysteinrest im aktiven Zentrum aufweisen, die Proteine spezifisch hinter Aspartatresten schneiden und durch ihre Aktivierung eine intrazelluläre proteolytische Kaskade auslösen, die die Zelle durch Spaltung wichtiger Zielproteine irreversibel in den Tod führt (Thornberry and Lazebnik, 1998).

Eine Sonderform der Apoptose stellt die sog. Anoikis (altgriechisch für „heimatlos“) dar. Sie betrifft verankerungs-abhängige Zellen epithelialen Ursprungs, die nach Verlust des Zell-EZM-Kontakts in den programmierten Zelltod gehen. In der Literatur wird diese Form der Apoptose erstmalig 1994 von Frisch und Francis beschrieben (1994).

Abgegrenzt werden muss die Apoptose von der Nekrose, einer weiteren Form des Zelltods. Bei letzterer erfolgt das Absterben der Zelle als Reaktion auf eine von außen einwirkende Schädigung. Durch den frühzeitigen Verlust der Integrität der Zellmembran kommt es durch einen Ionen- und Flüssigkeitseinstrom zum Anschwellen der Zelle, der Zellinhalt fließt in den Interzellularraum aus. Die Folge ist eine Entzündungsreaktion (Zong and Thompson, 2006, Golstein and Kroemer, 2007).

Integrine können zellbiologische Ereignisse wie die Apoptose modulieren. Sie stehen in ständigem Kontakt mit der EZM. Abhängig von den Informationen, die sie erhalten, können sie entweder das Zellüberleben fördern oder auch zur Einleitung des programmierten Zelltods beitragen. Bindet ein Ligand an ein Integrin, kommt es durch verschiedene Mechanismen zur Förderung des Zellüberlebens, z.B. durch verstärkte Expression anti-apoptotischer Mitglieder der Bcl2-Familie (Matter and Ruoslahti, 2001), Aktivierung des PI3K-Akt Signalwegs (s. Kapitel 1.6) (Aoudjit and Vuori, 2001) und des NF- κ B Signalwegs (s. Kapitel 1.6) (Scatena et al., 1998) oder auch durch eine Inaktivierung des Wächtergens p53 (Bao and Stromblad, 2004). Integrine, an die kein immobilisierter Ligand bindet, können im Gegensatz dazu zur Aktivierung einer pro-apoptotischen Kaskade führen, an deren Ende der Tod der Zelle steht. Man spricht dann vom sog. Integrin-vermittelten Zelltod (*Integrin mediated death* IMD) bei verankerungs-abhängigen Zellen des epithelialen Typs (Stupack et al., 2001, Zhao et al., 2005, Brassard et al., 1999, Desgrosellier and Cheresh, 2010). Es wurde bereits die mögliche Rolle von unligiertem Integrin für einen c-src-vermittelten Signalweg beschrieben. Es folgen zum besseren Verständnis einige der für die vorliegende Arbeit wichtigsten Integrin-vermittelten Signalkaskaden.

1.6 Integrin-gesteuerte intrazelluläre Signalkaskaden

Obwohl Integrine selbst keine Kinaseaktivität besitzen, können sie z.B. durch Ansammlung (sog. *clustering*) mehrerer Integrinrezeptoren in den sog. fokalen Adhäsionskontakten - in denen sie mit vielen anderen Membranproteinen in Multiproteinkomplexen vorliegen - u.a. verschiedene Proteine durch Phosphorylierung aktivieren und rekrutieren (Li et al., 2003).

Abbildung 6 zeigt eine Übersicht über die wichtigsten Integrin-vermittelten Signalkaskaden. Die Integrinaktivierung via *outside-in signaling* führt zur Initiierung verschiedener Signalkaskaden im Inneren der Zelle. Im aktivierten Zustand lagern sich die fokale Adhäsionskinase FAK und das Src-Onkogen an die β -Untereinheit des Integrins an und werden aktiviert. Dies führt zur Aktivierung weiterer Signalwege, z.B. des MAPK/erk- und des PI3K/Akt-Signalweges. Die Signaltransduktion reicht letztlich bis in den Zellkern hinein. Hier wird über eine Veränderung des Aktivitätsmusters von Transkriptionsfaktoren eine Genexpressionsänderung bewirkt. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B.

Fokale Adhäsionskinase

Die fokale Adhäsionskinase (FAK) ist eine Nicht-Rezeptor-Protein-Tyrosinkinase. Im Prozess der Integrin-vermittelten Signalkaskaden nimmt sie eine Schlüsselrolle ein. FAK verfügt über sechs verschiedene Tyrosinstellen mit unterschiedlichen Funktionen: Zwei Tyrosinstellen im N-Terminus (Tyr-397, Tyr-407), zwei innerhalb der Kinasedomäne (Tyr-576, Tyr-577) und zwei im C-Terminus (Tyr-861, Tyr-925) (Calalb et al., 1995, Calalb et al., 1996, Schlaepfer et al., 1994, Parsons, 2003). Bei der Integrin-vermittelten Signaltransduktion kommt es durch Bindung eines Proteins der EZM, wie z.B. VN, FN oder Col, an die Integrin-Extrazellulärdomänen zur Autophosphorylierung von FAK am Tyrosinrest 397 und dadurch zur Aktivierung der Tyrosinkinase FAK (Schlaepfer et al., 1994, Schaller et al., 1994). Durch die Aktivierung von FAK entsteht eine Bindungsstelle für die SH2-Domäne der Mitglieder der Signalmoleküle der Src-Familie. Die Src-Kinasen wiederum phosphorylieren weitere Tyrosinstellen von FAK und führen somit zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege. Hierüber werden wichtige Zellfunktionen wie Zellmigration und Zellüberleben vermittelt.

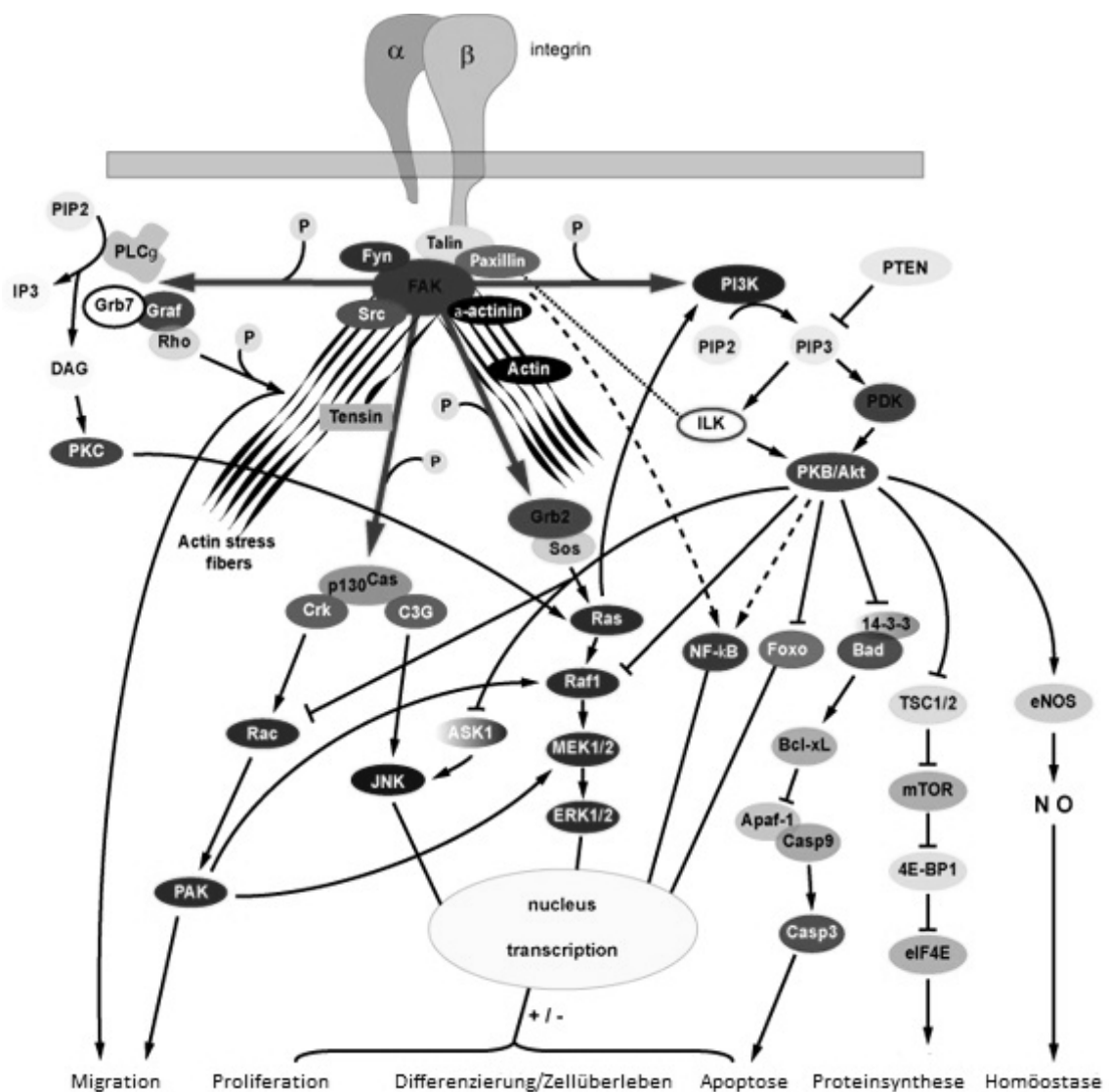


Abbildung 6: Integrin-vermittelte intrazelluläre Signalkaskaden

Die Integrin-vermittelten Hauptsignalwege sind dargestellt. Die Integrinaktivierung via *outside-in signaling* führt zur Initiierung verschiedener Signalkaskaden im Inneren der Zelle. Im aktivierten Zustand lagern sich die fokale Adhäsionskinase FAK und das Src-Onkogen an die β-Untereinheit des Integrins an und werden aktiviert. Dies führt zur Aktivierung weiterer Signalwege, z.B. des MAPK/erk- und des PI3K/Akt-Signalweges. Aktiviertes Akt beeinflusst zellbiologisches Verhalten wie die Zellproliferation, das Zellüberleben und die Zellmigration. Über eine Aktin-vermittelte Reorganisation des Zytoskeletts kann die Zellmobilität beeinflusst werden. NF-κB ist ein Transkriptionsfaktor aus der Rel-Familie. Er reagiert sensibel auf Integrin-vermittelte Veränderungen der Zelladhäsion und nachfolgender Signaltansduktionsereignisse mit einer Steigerung oder Verminderung seines Aktivitätslevels. (Abb. modifiziert nach <http://www.unifr.ch/pathology/en/background/tumorangigenesis>).

Über die Aktivierung von FAK werden u.a. Signalprozesse vermittelt, die eine anti-apoptotische Wirkung auf Zellen bewirken (Almeida et al., 2000, Sonoda et al., 2000, Frisch et al., 1996, Hungerford et al., 1996). Verschiedene Studien konnten einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten FAK-Expression in Karzinomzellen mit einer verstärkten Zellmotilität, Zellinvasivität und Zellproliferation belegen (Owens et al., 1995, Slack et al., 2001, Wang et al., 2000, Zhang and Zou, 2015).

Familie der Src-Kinasen

Die Familie der Src-Kinasen besteht aus neun Mitgliedern: Src, Fyn, Hck, Blk, Lck, Lyn, Yrk und Yes. C-Src ist eine Proteinkinase, die im aktivierten Zustand eine Vielzahl physiologischer und onkogener Prozesse beeinflusst, darunter die Zellproliferation, Zelladhäsion und Angiogenese (Saad et al., 2010, Han et al., 2006, Ishizawa and Parsons, 2004). Die Kinase c-Src besitzt die Fähigkeit, weitere wichtige Signalmoleküle wie z.B. FAK und Transkriptionsfaktoren zu aktivieren. In Zellen epithelialen Ursprungs (wie es auch viele Karzinomzellen sind) reagieren Integrine verankerungs-abhängig. Geht der Integrin-vermittelte Zell-EZM-Kontakt verloren, führt das zum Auslösen der Apoptose. Integrin $\alpha\beta3$ -vermitteltes *Src-signaling* in verankerungs-abhängigen Zellen geschieht durch Rekrutierung von Src an die $\beta3$ -Untereinheit des Integrins (Playford and Schaller, 2004, Desgrosellier et al., 2009). In der Folge wird FAK aktiviert, was zur Aktivierung weiterer Signalwege, wie z.B. den MAPK/erk- und den PI3K/Akt-Signalweg, führt. Aktiviertes FAK und Src phosphorylieren außerdem das Gerüstprotein Paxillin und P^{130} Cas. Weitere Signalkaskaden werden ausgelöst, es kommt zu Veränderungen des Zellüberlebens und der Zellmobilität (s. Abbildung 7).

Bei Tumorzellen, wie z.B. im Aszites flottierenden Ovarialkarzinomzellen, kann allerdings auch verankerungs-unabhängiges Wachstum beobachtet werden. In Integrin $\alpha\beta3$ -negativen Tumorzellen epithelialen Ursprungs führt der Kontaktverlust zum Substrat zur Anoikis. In Integrin $\alpha\beta3$ -positiven Tumorzellen ohne Verankerung an EZM-Liganden konnte gezeigt werden, dass Integrin $\alpha\beta3$ -vermitteltes *Src-signaling* zum Zellwachstum bei suspendierten Tumorzellen beiträgt. Überraschenderweise fanden Desgrosellier et al. (2009) heraus, dass dieser Integrin/Src-vermittelte Signalweg, der in nicht-adhärenen Suspensionszellen durch Phosphorylierung von p^{130} Cas zum verlängerten Zellüberleben führt, FAK-unabhängig geschieht (s. Abbildung 7). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Expression

von Integrin $\alpha\beta3$ oder von c-Src verankerungs-unabhängiges Wachstum unterdrückt. Es ließ sich *in vivo* am Mausmodell mit Integrin $\alpha\beta3$ -positiven bzw. -negativen Pankreaskarzinomzellen eine verminderte lymphonodale Metastasierung feststellen. Eine Veränderung der Migrations- und Invasioneigenschaften der Tumorzellen fand durch die verminderte Expression von Integrin $\alpha\beta3$ oder von c-Src hingegen nicht statt. Dieser Integrin $\alpha\beta3$ /c-Src-vermittelte Signalweg könnte also durch seine Eigenschaft, verankerungs-unabhängiges Zellwachstum zu fördern bzw. zu vermitteln, eine weitere Erklärung für das aggressive Verhalten Integrin $\alpha\beta3$ -exprimierender Karzinome sein, wie es zum Beispiel beim Ovarialkarzinom im Aszites schwimmenden *floating clusters* ohne Verankerung an EZM-Liganden beobachtet werden kann. Dies erklärt möglicherweise die peritoneale Tumorzell dissemination beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom.

Der Transkriptionsfaktor NF-kappaB

Rel-Transkriptionsfaktoren spielen eine große Rolle bei der Integrin-vermittelten Signaltransduktion. Die Integrinaktivierung via *outside-in* und *inside-out signaling* führt zur Initiierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden, wodurch das Zellverhalten an die jeweiligen Anforderungen angepasst wird (Higgins et al., 1993, Sokoloski et al., 1993, Yebra et al., 1995, Reuning, 2011). NF- κ B ist ein wichtiger Faktor in der Pathogenese humaner Tumoren (Karin, 2006, Basseres and Baldwin, 2006, Fullard et al., 2012). NF- κ B liegt als dimerer Transkriptionsfaktor (RelA, p65/p50) in einer inaktiven Form im Zytosol vor, in einem Komplex mit I κ B (*inhibitor of kappa B*) gebunden. Extrazelluläre Signale, wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Zytokine, aktivieren die I κ B Kinase (IKK), welche wiederum das I κ B α Protein phosphoryliert. Dies führt zur Ubiquitinierung von I κ B und dessen Dissoziation von NF- κ B und dem nachfolgenden Abbau von I κ B α durch das Proteasom. Aktiviertes NF- κ B tritt dann in den Nukleus ein, wo es an NF- κ B-Bindungsstellen in den Promotoren der entsprechenden Zielgene bindet.

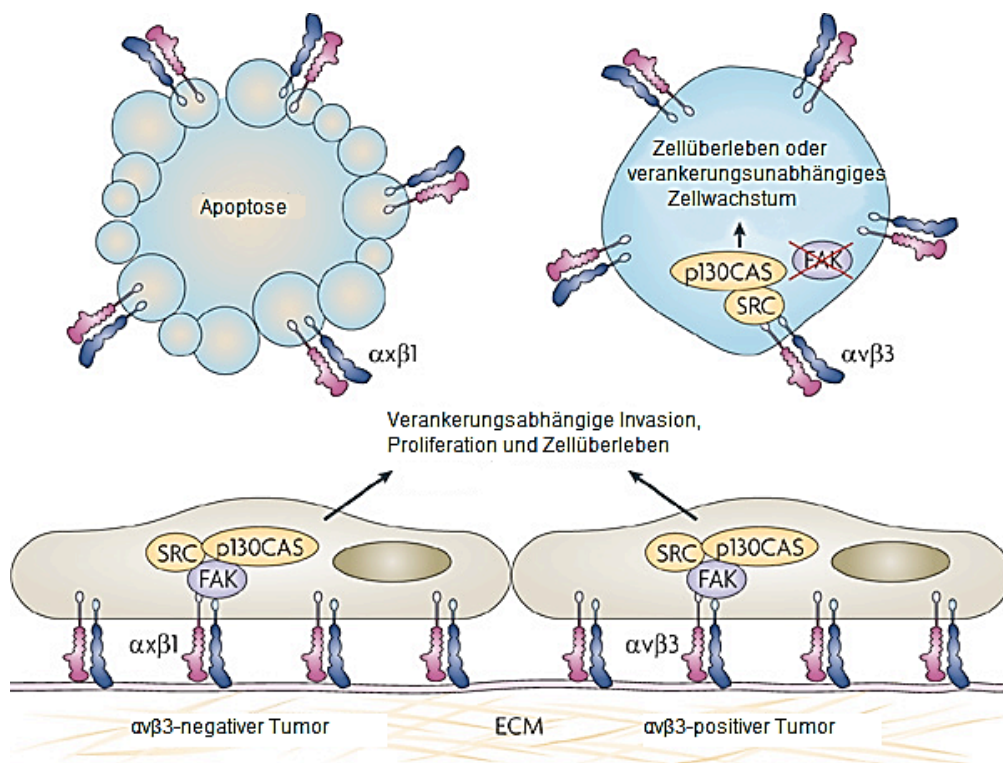


Abbildung 7: Integrin $\alpha\beta3$ /c-Src-vermittelte Signaltransduktion als Mediator verankerungsunabhängigen Zellwachstums

Es ist die Aktivierung von FAK und Src in adhärenen Tumorzellen gezeigt. Dies gilt für $\beta1$ Integrine (in der Abbildung als $\alpha\beta1$ gekennzeichnet) sowie für Integrin $\alpha\beta3$. Im aktivierten Zustand lagern sich FAK und das Src-Onkogen an die β -Untereinheit des Integrins an und werden aktiviert. Dies führt zur Aktivierung weiterer Signalwege, z.B. des MAPK/erk- und des PI3K/Akt-Signalwegs. Aktiviertes FAK und Src phosphorylieren das Gerüstprotein Paxillin und P^{130} Cas, welche wiederum weitere Signalkaskaden auslösen. So kommt es zu Veränderungen der Zellmobilität und des Zellüberlebens. Daneben sind Tumorzellen in Suspensionskultur dargestellt. Der Kontaktverlust zum Substrat führt in Integrin $\alpha\beta3$ -negativen Tumorzellen epithelialen Ursprungs zur Anoikis, einem wichtigen Mechanismus des Organismus zum Schutz vor Metastasierung. In Integrin $\alpha\beta3$ -positiven Tumorzellen ohne Verankerung an EZM-Liganden kommt es hingegen durch Integrin $\alpha\beta3$ -vermitteltes Src-signaling zum Zellüberleben der Zellen in Suspension. Überraschenderweise zeigte sich, dass dieser Integrin/Src-vermittelte Signalweg FAK-unabhängig stattfindet (Abb. modifiziert nach Desgrosellier and Cheresch, 2010).

Dies führt über eine Veränderung des Aktivitätsmusters von Transkriptionsfaktoren zu Änderungen der Genexpression (Gilmore, 2006, Perkins, 2007). Im Normalfall handelt es sich hierbei um einen transienten Prozess. In manchen Krebszellen ist NF- κ B jedoch konstitutiv aktiv (Gilmore, 2006). Diese konstante Aktivierung kann Krebszellen - z.B. durch Hochregulierung der Expression anti-apoptotischer Faktoren - vor dem Zelltod durch Apoptose bewahren und somit Zellüberleben und -wachstum der

Krebszellen fördern (Fan et al., 2008, Karin, 2006, Lin et al., 2010, Deregowski et al., 2002, Dutta et al., 2006).

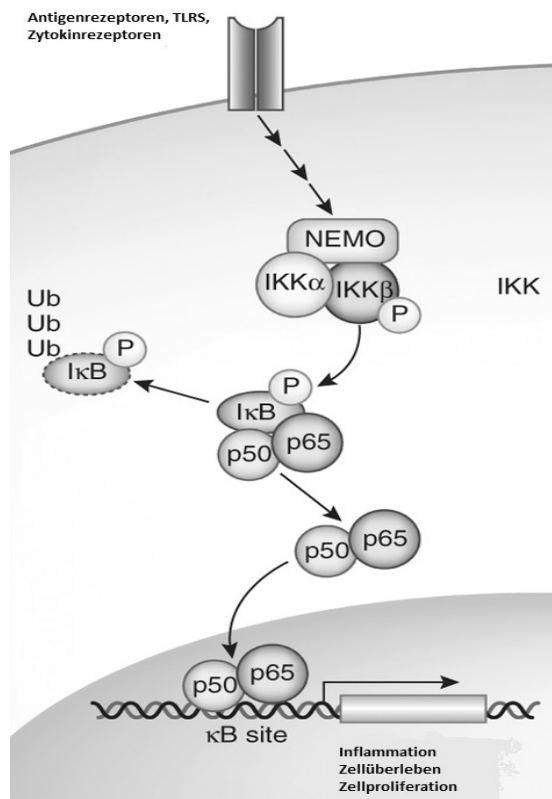


Abbildung 8: Der NF-κB Signaltransduktionsweg

Extrazelluläre Signale wie Antigenrezeptoren, TLR-Liganden und Zytokine, wie z.B. TNF, aktivieren die IκB Kinase (IKK). Diese phosphoryliert das IκB Protein, was wiederum zur Ubiquitinierung von IκB und dessen Dissoziation von NF-κB führt. IκB wird durch das Proteasom abgebaut. Aktiviertes NF-κB kann dann in den Nukleus eintreten. Hier bindet der dimere Transkriptionsfaktor NF-κB (p50/p65) an spezifische NF-κB-Bindungsstellen in den Promotoren der entsprechenden Zielgene. Über eine Veränderung des Aktivitätsmusters von Transkriptionsfaktoren kommt es zu Änderungen der Genexpression, welche zell-biologische Prozesse wie Inflammation, Zellüberleben und Zellteilung regulieren (Abb. modifiziert nach Gerondakis et al., 2014).

1.7 Zielsetzung der Dissertation

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf dem Studium des Einflusses der Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung auf das zelluläre Apoptoseverhalten sowie auf ausgewählte Signaltransduktionswege von in Suspension kultivierter humaner Ovarialkarzinomzellen am Beispiel der humanen Ovarialkarzinom-Zelllinie OV-MZ-6.

Um den Einfluss der Konformation der Transmembrandomänen und der zytoplasmatischen Domänen auf die Integrinaktivierung genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Mutanten des Integrin $\alpha\beta 3$ generiert (bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden und nicht Teil dieser Dissertation) (Müller et al., 2014, Müller et al., 2013): Die komplette Integrin-TMD der α - und der $\beta 3$ -Untereinheit wurde durch die gut untersuchte komplette TMD des Homodimers Glycophorin A ausgetauscht (TMD-GpA), welche ein GxxxG-Motiv enthält, wodurch es zu einer starken Assoziation der TMD kommt (Senes et al., 2004). Zur Kontrolle und als Model für eine dissoziierte TMD wurde das GxxxG-Motiv zu GxxxI verändert (TMD-GpA-I) (Lemmon et al., 1992). Eine Integrin-Mutante mit dissoziierter TMD (TMD-GpA-I) zeigte eine gesteigerte bidirektionale Signaltransduktion, wohingegen eine Integrin-Mutante mit dimerisierter TMD (TMD-GpA) einen intermediären Aktivierungszustand beschreibt, wie er nach dem *inside-out* aber vor dem *outside-in signaling* vorkommt (Müller et al., 2013). Die für die Bildung der zytoplasmatischen Salzbrücke verantwortlichen Aminosäuren in der α - und $\beta 3$ -Untereinheit des Integrins wurden in Vorarbeiten ausgetauscht (α_{R995D} ; β_{D723R}), um den Effekt solcher Mutanten auf die Integrinaktivierung zu analysieren. Es wurden verschiedene Kombinationen generiert mit entweder der Ausbildung einer Salzbrücke ($\alpha\beta 3$ -Wildtyp (WT) und umgekehrt geladener Salzbrücken-Mutante ($\alpha_{R995D}\beta_{D723R}$)) oder mit einer rupturierten Salzbrücke ($\alpha_{R995D}\beta 3$ und $\alpha\beta_{D723R}$), wobei sich bei letzterer ein gesteigertes *inside-out* und *outside-in signaling* zeigte (Müller et al., 2014).

Diese Integrinkonstrukte wurden in die humane Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 transfiziert und dienten in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der folgenden Fragestellungen:

- 1) Wie wird das verankerungs-unabhängige Überleben der Zellen durch ihren Gehalt an Integrin $\alpha\beta 3$ in verschiedenen Aktivierungszuständen beeinflusst?
- 2) Welchen Einfluss haben Zellen mit Expression der unterschiedlichen Integrin $\alpha\beta 3$ -TMD-Mutanten und Integrin Salzbrücken-Mutanten

- auf das Apoptoseverhalten humaner, in Suspension kultivierter OV-MZ-6-Zellen?
- auf ausgewählte Integrin-vermittelte Signaltransduktionswege?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinie

Für die Studien im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die humane Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 verwendet. Diese Tumorzellen wurden aus dem Aszites einer Patientin mit fortgeschrittenem (FIGO IV) serös-papillärem Zystadenokarzinom des Ovars etabliert. Sie wurden hinsichtlich Morphologie, biochemischer und immunhistochemischer Eigenschaften durch Möbus et al. charakterisiert (Möbus et al., 1992).

Neben diesen Wildtyp OV-MZ-6-Zellen waren in einem früheren Projekt durch stabile Transfektion auch OV-MZ-6-Zellen mit gesteigerter Expression des Integrin $\alpha\beta3$ erzeugt worden, welche in den Untersuchungen der vorliegenden Dissertation Verwendung fanden (Hapke et al., 2001). Die Integrin $\alpha\beta3$ -Überexpression führt in humanen Ovarialkarzinomzellen auf VN als Adhäsionssubstrat zur einer gesteigerten Adhäsion, Motilität und Proliferation (Hapke et al., 2003). Um mehr Einsicht in die Integrin-gesteuerten Zellfunktionen zu erhalten, wurden in Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe Reuning Mutanten des Integrins generiert. Der Einfluss dieser Integrin $\alpha\beta3$ -Mutanten auf entscheidende Prozesse wie z.B. bestimmte Signalwege oder auch Zelladhäsion konnte bereits durch Müller et al. gezeigt werden, s.a. Einleitung Kapitel 1.4 (2013, 2014). Die stabil transfizierten OV-MZ-6 Zellen wurden für die vorliegende Dissertation zur Verfügung gestellt.

a) Generierung von Integrin $\alpha\beta3$ -TMD-Mutanten

Die komplette TMD der α - bzw. der $\beta3$ -Untereinheit wurde durch die komplette TMD des GpA ersetzt, welche bekanntermaßen eine starke Assoziation der TMD zeigt (Senes et al., 2004). Als Kontrolle wurde außerdem eine weitere Mutante generiert, in welcher das zweite G des GxxxG-Motiv durch Isoleucin ersetzt wurde (TMD-GpA-I). Das GxxxI-Motiv löst die starke Assoziation der TMD auf (Lemmon et al., 1992). Anschließend wurden OV-MZ-6 Zellen stabil mit den Integrin Mutanten TMD- $\alpha\beta3$, TMD-GpA und TMD-GpA-I transfiziert. Als Kontrolle dienten OV-MZ-6 Zellen, die mit dem leeren Expressionsvektor pCDNA3.1/myc-His transfiziert wurden (Vektor).

b) Generierung von Integrin $\alpha\beta3$ -Salzbrücken-Mutanten

Die humane Ovarialkarzinom-Zelllinie OV-MZ-6 wurde ausgewählt, um den Einfluss der zytoplasmatischen Salzbrücke des Integrins $\alpha\beta3$ auf die Integrinaktivierung und darüber hinaus auch auf das Apoptoseverhalten sowie die Signaltransduktion zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Mutanten der zytoplasmatischen Salzbrücke des Integrins $\alpha\beta3$ generiert, indem die Aminosäuren der jeweiligen Integrinuntereinheit (α_{R995D} ; β_{D723R}), die die Salzbrücke bilden, ausgetauscht wurden. Um den Effekt solcher Mutanten auf die Integrinaktivierung zu untersuchen, wurden OV-MZ-6-Zellen stabil mit verschiedenen Kombinationen der α - und der β -Untereinheit transfiziert, um entweder die Ausbildung einer Salzbrücke ($\alpha\beta3$ -WT oder Mutante mit Umkehrladung $\alpha_{R995D}\beta_{D723R}$) zu ermöglichen oder deren Bildung zu unterbinden ($\alpha_{R995D}\beta$ oder $\alpha\beta_{D723R}$). Zur Vereinfachung wird die in Tabelle 1 aufgeführte Nomenklatur für die unterschiedlichen Zelltypen verwendet.

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Integrin $\alpha\beta3$ -Mutanten, die in der vorliegenden Arbeit Verwendung finden

Wildtyp		
α -WT + β -WT	→ $\alpha\beta3$ -WT (= TMD- $\alpha\beta3$) (= Salzbrücken (SB)- $\alpha\beta3$) → aktivierbares Wildtyp-Integrin	
Vektor		
pcDNA3.1/myc-His Vector	→ Vektor = OV-VEC	
TMD-Mutanten		
α -TMD-GpA-I + β -TMD-GpA-I	→ TMD-GpA-I	Offene TMD-Konformation = konstitutiv aktives Integrin mit hoher Affinität zu den Liganden
α -TMD-GpA + β -TMD-GpA	→ TMD-GpA	Geschlossene TMD-Konformation = Integrin im intermediären Aktivierungszustand (nach <i>inside-out</i> , aber vor <i>outside-in signaling</i>)
Salzbrücken-Mutanten		
α -WT + β_{D723R}	$\alpha\beta_{D723R}$	Keine Ausbildung einer SB
α_{R995D} + β -WT	$\alpha_{R995D}\beta$	Keine Ausbildung einer SB
α_{R995D} + β_{D723R}	$\alpha_{R995D}\beta_{D723R}$	Mögliche Ausbildung einer SB mit Ladungsumkehr

2.1.2 Zellkulturmedien und -supplemente

1% (w/v) Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in PBS	Biochrom AG, Berlin
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) mit Glutamax™	Invitrogen Gibco, Carlsbad, CA, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
Geneticin® G 418-Sulfat	Invitrogen
L-Arginin und L-Asparagin	Sigma-Aldrich
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Invitrogen
Phosphate-buffered saline (PBS)	Invitrogen
Trypanblau-Lösung 0,4% (w/v)	Sigma-Aldrich

2.1.3 Plasmide

Renilla-Luziferase-Reporter-gen-Vektor	Promega, Madison, WI, USA
pRL-SV40-Plasmid	
NF-KB-Reporter-gen	von K. Brand, Hochschule Hannover, freundlicherweise zur Verfügung gestellt

2.1.4 Herstellung einzelner Zellkulturmedien

GAM (<i>growth arrest medium</i>):	DMEM mit Glutamax™
	272 mM HEPES
	10 mM Arginin
	550 mM Asparagin
Komplettmedium für OV-MZ-6-Zellen:	GAM
	10% (v/v) FCS

Selektionsmedium für stabil transfizierte Zellen mit einem Resistenzgen für G 418: Kompletmedium mit G 418 (1 µg/ml)

Einfriermedium: 90% (v/v) FCS
10% (v/v) DMSO

2.1.5 Sonstige Pufferlösungen

TBS (10x): 1 M NaCl
10 mM Tris/HCl
für TBS-T: 1x TBS, 0,1% (v/v) Tween-20

PBS (10x): 1,37 M NaCl
26,80 mM KCl
14,70 mM KH₂PO₄
71,80 mM Na₂HPO₄
für PBS-T: 1x PBS, 1% (v/v) Tween-20

2.1.6 Sonstige Materialien und Reagenzien

Isopropanol Merck, Darmstadt
Lipofectin® Reagens Invitrogen Gibco, Carlsbad, CA, USA
Methanol Carl Roth, Karlsruhe
NaCl Carl Roth
Tris-Ultra Pure Carl Roth

Trypsin
Tween® -20

Invitrogen
Applichem, Gatersleben

2.1.7 Antikörper/Antigen

Antikörper/Antigen	Firma
Annexin-V-Fluos-Antigen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
M30 CytoDEATH (erkennt Cytokeratin 18-Spaltprodukte)	Roche Diagnostics

2.1.8 Instrumente

Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss, Jena
Durchflusszytometer FACS Calibur mit Software Cellquest	BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA
Heracell-Zellinkubator O ₂	Heraeus, Hanau
Herasafe biologische Sicherheitswerkbank	Heraeus
Lumat LB 9501-Luminometer	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Neubauer Zellzählkammer	Paul Marienfeld GMBH & Co KG, Lauda-Königshofen
pH-Meter	Schott, Mainz
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG Zürich, Schweiz
Zentrifuge 5417C+5424R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Labofug 400R	Heraeus

2.1.9 Kits

Annexin-V-FLUOS staining kit	Roche Diagnostics
M30 CytoDEATH	Roche Diagnostics
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Madison, WI, USA

2.1.10 Verbrauchsmaterialien

FACS-Röhrchen 4,5 ml, konisch

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Minisart® sterile Filter

Sartorius, Aubagne, France

Pipettenspitzen,

Sarstedt, Nümbrecht

1,5/2 ml Eppendorf-Gefäße

Sterile Spritzen und Injektionsnadeln

Braun, Melsungen

Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten,

BD Biosciences

Zellschaber, serologische Pipetten

(5/10/25 ml)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturtechniken

2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

OV-MZ-6-Zellen wurden bei 37°C/ 5% (v/v) CO₂ in Kompletmedium kultiviert und alle 3-4 Tage passagiert. Die adhärennten Zellen wurden hierzu zuerst in sterilem PBS gewaschen und dann in PBS, 0,05% (w/v) EDTA für 2-5 min abgelöst. Anschließend wurden die Zellen bei 1500 x g für 3 min abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde ein Teil des Zellpellets in frischem Medium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt.

2.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Um die Zellen einzufrieren, wurden sie mit PBS, 0,05% (w/v) EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst, in 5 ml PBS gewaschen und abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden ca. 5 x 10⁶ Zellen in 5 ml Einfriermedium resuspendiert, in Einfriereröhrchen überführt und sofort auf Eis gestellt. Kurzzeitig erfolgte die Lagerung bei -80°C. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen anschließend in flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt.

Um eingefrorene Zellen in Kultur zu nehmen, wurden die Zellen behutsam aufgetaut und in 5 ml eiskaltem Zellmedium gewaschen. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurden diese im Zellmedium resuspendiert und in kleinen Zellkulturflaschen wie oben beschrieben kultiviert. Hierbei galt es, die Zellen mindestens zwei bis drei mal zu passagieren, bevor sie für Versuche verwendet wurden.

2.2.1.3 Kultivierung von OV-MZ-6-Zellen in Suspension

Um Effekte eines verankerungs-unabhängigen Zellwachstums von OV-MZ-6-Zellen zu studieren, wurden die Zellen in einer Konzentration von 500.000/ml bis zu einem Zeitpunkt von maximal 60 Stunden in Suspension kultiviert (Meredith et al., 1993, Frisch and Francis, 1994). Hierfür wurden die Zellen durch Aufstellen der Zellkulturflaschen der adhäsionsfördernden Wachstumsflächen in den Zellkultur-

flaschen beraubt und so in Suspension gehalten. Zum gewünschten Zeitpunkt wurden zuerst etwaig gebildete Zellaggregate durch vorsichtiges Resuspendieren mit einer großlumigen Pipette gelöst. Einzig die flottierenden „Suspensionszellen“ fanden in den Versuchen Verwendung.

2.2.1.4 Nachweis der NF- κ B-Aktivierung mittels Promotoraktivitätsstudien in humanen Ovarialkarzinomzellen

Für den Reporter-Gen-Assay wurden die OV-MZ-6-Zellen mit den jeweiligen TMD- und Salzbrücken- Integrin $\alpha\beta 3$ -Mutanten in Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen 24 bis 36 h bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 50-60% im Zellkulturmedium kultiviert, in PBS gewaschen und je 300 μ l GAM pro Vertiefung zugegeben. Es wurde eine Suspension aus je 3 μ l Lipofektin und 100 μ l GAM in Transfektionsröhrchen vorgelegt, vorsichtig gemischt und 45 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Zeitgleich wurde in weiteren Transfektionsröhrchen je 0,3 μ g Plasmid-DNA des 3 κ B-Promoters enthaltenden Luziferase-Reporter-genplasmids in 100 μ l GAM verdünnt vorgelegt und 100 ng des Renilla-Luziferase-Reporter-gen-Vektors zur Ermittlung der Transfektionseffizienz kotransfiziert. Anschließend wurden die DNA- und die Lipofektin-Suspension vereinigt, vorsichtig gemischt und 15 min bei RT inkubiert, bevor sie auf die Zellmonolayer pipettiert wurden.

Nach 6 h Inkubation bei 37°C wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und GAM durch je 1 ml Kompletmedium ersetzt. Nach weiteren 48 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit 120 μ l 5x PLB-Puffer (*passive lysis buffer*) lysiert und mittels Luminometer die NF- κ B-Expression bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum Nachweis der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B OV-MZ-6-Zellen transient mit einem Luziferase-Reporter-Gen transfiziert, welches als Promotor drei konsekutive κ B-*sites* enthält, die dem Thymidin-Kinase-Promotor vorangehen. Nach der Zelltransfektion und anschließender Zellyse wurde die Luziferase-Aktivität (entsprechend der Aktivierung der κ B-Promotorsequenz durch aktives NF- κ B) als Maß für die NF- κ B-Aktivität mittels Luminometrie gemessen. Hierzu wurde *das Dual-Luciferase® Reporter Assay System* nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Es folgte die Zugabe eines für die Luziferase spezifischen Substrats, wodurch es zur Photonenemission kommt, welche wiederum mittels Luminometer detektiert werden

kann. Die gemessene Lichtintensität stellt ein Maß für die Luziferaseaktivität und somit für die Promotoraktivierung durch NF- κ B dar. Gleichzeitig wurden die Zellen mit dem Renilla-Luziferase-Reporter-Gen-Vektor pRL-SV40-Plasmid kotransfiziert, um die unterschiedliche Transfektionseffizienz der Zellen zu normalisieren.

2.2.2 Durchflusszytometrie

2.2.2.1 Prinzip

Fluorescence activated cell sorting (FACS) ist eine Methode die es erlaubt, Zellen nach den folgenden Zelleigenschaften zu unterscheiden.

Aussagen über Zellgröße und Zellmorphologie:

Zellen, die sich in einer Suspension befinden, werden einzeln aufgesogen. Während sie einen fokussierten Laserlichtstrahl passieren, senden sie unterschiedliche Lichtsignale aus. Dies geschieht je nach Form, Volumen und Färbung der Zelle. Geeignete Detektoren können diese Signale messen und quantifizieren: Das „Vorwärtsstreulicht“ (*forward scatter*) ermöglicht hierbei Aussagen über die Zellgröße bzw. ihr Volumen und das „Seitwärtsstreulicht“ (*side scatter*) über die Granularität der Zelle (z.B. zytoplasmatische Granula, Zellkernform, Membranfaltung).

Nachweis von zellulären Antigenen nach Fluoreszenzfärbung:

Zusätzlich können die Zellen mittels spezifischer Färbungen charakterisiert werden, indem sie z.B. mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt werden, die von einem oder mehreren Fluoreszenzdetektoren gemessen werden.

2.2.2.2 Nachweis früher Apoptose-Ereignisse in kultivierten Ovarialkarzinomzellen durch Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und Propidiumjodid

In frühen Stadien der Apoptose kommt es zu verschiedenen Veränderungen der Zelloberfläche, darunter auch zur Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der Innenseite der Plasmamembran an ihre Außenseite (*PS switch*). Annexin-V-Fluos, ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid bindendes Protein besitzt eine große Affinität für PS und kann somit als zuverlässiger Marker benutzt werden, um apoptotische Zellen zu erkennen (Vermees et al., 1995, Andree et al., 1990) (s. Abbildung 9). Da auch nekrotische Zellen durch den Verlust an Zellintegrität nicht transloziertes PS

exponieren, wird gleichzeitig mit Propidiumjodid gefärbt, welches in nekrotische Zellen eindringen und dort die DNA anfärben kann. Dadurch kann die Subpopulation nekrotischer Zellen ermittelt werden. Somit ist durch eine Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und PI eine zuverlässige Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen möglich.

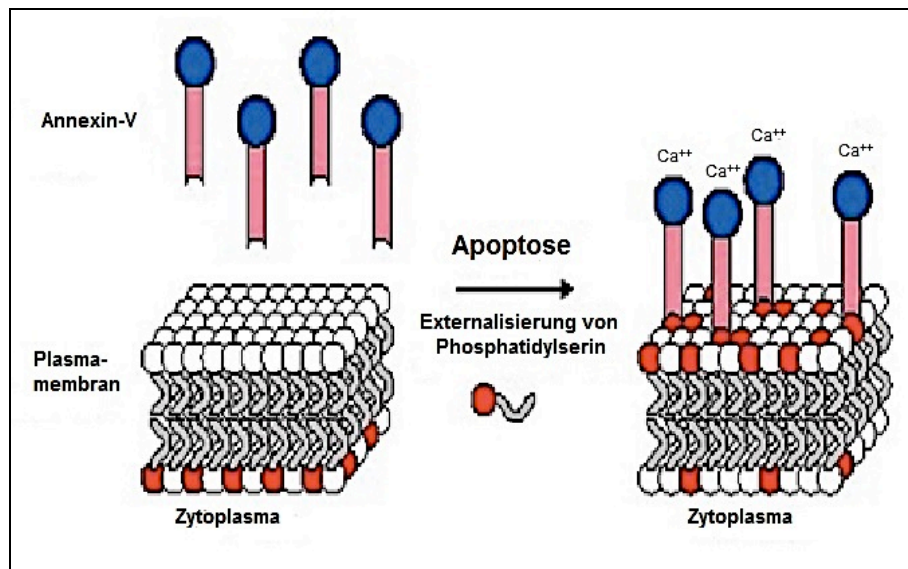


Abbildung 9: Prinzip der Detektion apoptotischer Zellen durch Bindung von Annexin-V-Fluos an Phosphatidylserin

In der intakten Zelle findet sich PS an der Innenseite der Zellmembran. Kommt es zum programmierten Zelltod, wird PS auf die Außenseite der Membran transloziert, wo es auf apoptotischen Zellen Annexin-V-Fluos erkennt und bindet (Vermes et al., 1995). Nekrotische Zellen binden aufgrund des Verlusts der Integrität der Zellmembran ebenfalls Annexin-V-Fluos, so dass apoptotische und nekrotische Zellen nicht mehr unterscheidbar wären. Deshalb wird gleichzeitig mit dem DNA-Farbstoff Propidiumjodid gefärbt, da dieser ausschließlich nekrotische Zellen markiert und somit eine Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen erlaubt (Abbildung modifiziert nach <http://www.abgab.com/pdf2/KA1001.pdf>).

Die OV-MZ-6-Zellen wurden in einer Konzentration von 500.000 Zellen/ml bis zu einem Zeitpunkt von maximal 60 h wie unter Kapitel 2.2.1.3 beschrieben in Suspension gehalten. Zum gewünschten Zeitpunkt wurden zuerst etwaig gebildete Zellaggregate durch vorsichtiges Resuspendieren mit einer großlumigen Pipette gelöst und anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde 3 min bei 1000 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellen gezählt. Pro FACS-Röhrchen wurden je 150.000

Zellen eingefüllt und erneut 3 min bei 1000 x g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 100 µl Inkubationspuffer aufgenommen und entweder zur Bestimmung der Basisfluoreszenz entweder nicht, oder mit Annexin-V-Fluos und PI gefärbt. Die Unterscheidung der Zellen erfolgte nach ihrem Färbeverhalten.

Zum Anfärben der Zellen wurde zuerst Annexin-V-Fluos zugegeben und die Zellen wurden 15 min in der Lösung inkubiert. Hierbei wurde im Dunkeln gearbeitet. PI wurde erst ca. 1-2 min vor der FACS-Analyse zugegeben. Die Auswertung erfolgte per Quadrantenanalyse am Durchflusszytometer. Abbildung 10 zeigt ein typisches Histogramm mit lebendigen, apoptotischen und nekrotischen Zellen.

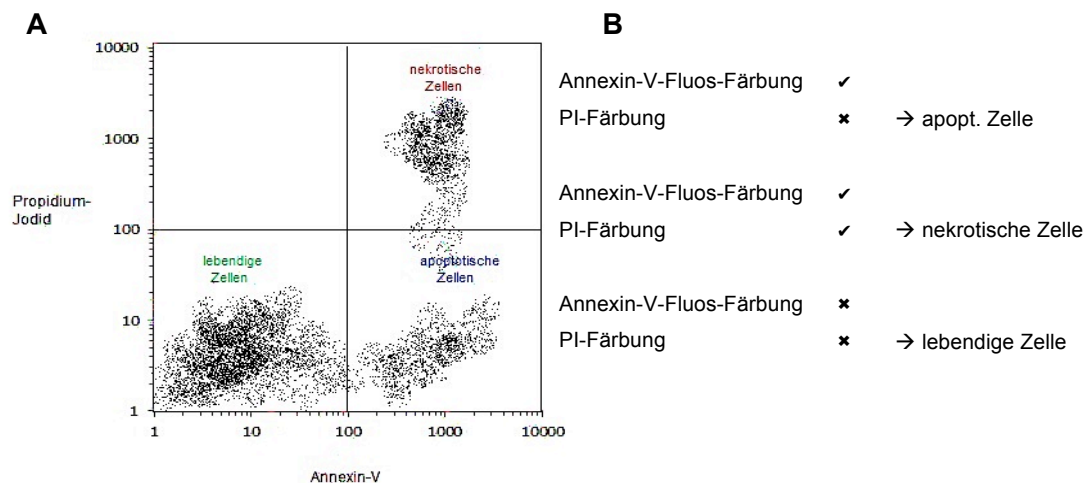


Abbildung 10: Diskriminierung der Zellviabilität im Durchflusszytometer mittels Annexin-V-Fluos-Bindung

A) Schematische Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse Annexin-V-Fluos/PI-gefärbter Zellen. Der linke untere Quadrant des Histogramms zeigt lebendige, der rechte untere Quadrant apoptotische und der rechte obere Quadrant nekrotische Zellen an. **B)** Es sind die verschiedenen Möglichkeiten des Färbeverhaltens der Zellen dargestellt: Lebendige Zellen (Annexin-V-Fluos neg., PI neg.), nekrotische Zellen (Annexin-V-Fluos pos., PI pos.) und apoptotische Zellen (Annexin-V-Fluos pos., PI neg.) lassen sich hierdurch unterscheiden.

2.2.2.3 Nachweis einer für die Apoptose spezifischen Caspasenspaltungsstelle im Cytokeratin 18 in Ovarialkarzinomzellen

Es konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von Cytokeratinen durch Caspasen, insbesondere des Cytokeratins 18 (CK 18), in späten Apoptosestadien auftritt (Caulin et al., 1997). Durch den M30 CytoDEATH-Antikörper können spezifische, durch Cas-3 gespaltene CK18 Fragmente als Maß für die Caspaseaktivierung in späten Apoptosestadien erkannt werden (Leers et al., 1999).

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 500.000 Zellen/ml über 48 h in Suspension gehalten. Die Zellsuspension wurde 2 x für 3 min bei 1300 x g abzentrifugiert, der Überstand jeweils verworfen und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Als nächstes wurden je 150.000 Zellen in ein FACS-Röhrchen gefüllt und erneut für 3 min bei 1300 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1-2 ml eiskaltem Methanol für 30 min bei -20°C fixiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen in *washing buffer* wurden die Zellen in M30 CytoDEATH-Antikörper *working solution* (Antikörperkonzentration 1:20) für 60 min bei 15-25°C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut 2 x gewaschen und mit Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper für 30 min bei 15-25°C inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen wurden die Zellen in 0,5 ml PBS resuspendiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie ausgewertet.

2.3 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel angegeben, die Streuung der Werte wurde als Standardabweichung dargestellt. Die Prüfung auf Signifikanz der Daten erfolgte mittels des T-Tests.

3 Ergebnisse

Am Beispiel des tumorbiologisch relevanten Integrins $\alpha\beta 3$ konnte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Reuning bereits gezeigt werden, dass sowohl den transmembranen und als auch den zytoplasmatischen Domänen eine große Rolle bei den allosterischen Konformationsänderungen im Zuge der Integrinaktivierung zukommt. Für die Studien der vorliegenden Arbeit waren in der Arbeitsgruppe verschiedene Integrin $\alpha\beta 3$ -Mutanten generiert worden, die bezüglich ihrer biologischen Effekte wie Zelladhäsion, Zellproliferation und Integrin-vermittelter Signaltransduktion charakterisiert worden sind (s.a. Kapitel 1.4).

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf dem Einfluss der Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung auf das zelluläre Apoptoseverhalten sowie auf ausgewählte Signaltransduktionswege in humanen Ovarialkarzinomzellen am Beispiel der Zelllinie OV-MZ-6.

3.1 Untersuchungen zum Einfluss der Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung auf das Apoptoseverhalten als Funktion der TMD-Sequenz des Integrins $\alpha\beta 3$

In Abhängigkeit von Einflüssen und Reizen ihrer Umwelt besitzen Integrine im Zusammenspiel mit anderen Faktoren entweder die Fähigkeit, Zellüberleben zu fördern oder den programmierten Zelltod, die Apoptose, einzuleiten.

Der komplette Verlust von Zelladhäsion führt bei verankerungs-abhängigen Zellen epithelialen Ursprungs zur Anoikis (Frisch and Francis, 1994). Diese Mechanismen sorgen dafür, dass Zellen in inadäquater Umgebung nicht überleben. Tumorzellen epithelialen Ursprungs, die unabhängig von der Verankerung in der EZM überleben können, können die Tumorprogression fördern und zur Metastasierung führen, wie es z.B. auch beim Ovarialkarzinom für die in Aszites flottierenden Zellspheroide zu beobachten ist (Desgrosellier et al., 2009; Frankel et al., 2001).

3.1.1 Nachweis früher Apoptoseereignisse durch Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und Propidiumjodid

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss die Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung auf das Apoptoseverhalten als Funktion der TMD-Sequenz des Integrins $\alpha\beta 3$ nimmt. Dafür wurden humane kultivierte OV-MZ-6-Zellen, die die Integrin $\alpha\beta 3$ TMD/GpA-Mutanten exprimieren, durch Aufstellen der Zellkulturflaschen der adhäsionsfördernden Wachstumsflächen beraubt und so über insgesamt 60 h in Suspension gehalten - mit dem Ziel, einen apoptotischen *Response* zu induzieren. Als Kontrolle dienten OV-MZ-6-Zellen, die mit $\alpha\beta 3$ -TMD ($\alpha\beta 3$ -WT) oder dem leerem Expressionsvektor transfiziert worden waren (OV-VEC).

Die Ovarialkarzinomzellen wurden in einer Konzentration von 500.000 Zellen/ml über einen Zeitraum von insgesamt 60 h in Suspensionskultur gehalten. Innerhalb dieses Zeitraums erfolgte mittels FACS alle 12 h eine Analyse der Zellen hinsichtlich ihrer Viabilität. Die wie unter Kapitel 2.2.2 beschriebene Doppelfärbung mit Propidiumjodid und Annexin-V-Fluos erlaubte hierbei die Unterscheidung in apoptotische und nekrotische Zellen. Als zusätzliche Kontrollen dienten dieselben transfizierten Zellklone, die jedoch adhärent kultiviert worden waren. Diese zeigten alle einen Anteil nekrotischer Zellen bei unter 10%. Nach 48 h in Suspensionskultur blieb der Gesamtanteil der nekrotischen Subpopulation bei $\leq 20\%$. Zellen mit Überexpression der Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-GpA-Mutante, welche ein Integrin im *non-signaling* Modus darstellt, zeigten anteilig mit 20% die meisten nekrotischen Zellen. Die geringste Rate nekrotischer Zellen (10%) zeigten die Zellen, die mit der Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-GpA-I-Mutante transfiziert worden waren, die eine konstitutiv aktive Form des Integrin $\alpha\beta 3$ darstellt. Intermediäre Werte zeigten zu diesem Messzeitpunkt Zellen, die den Integrin $\alpha\beta 3$ -WT exprimieren mit 11,2%. Vektor-transfizierte Zellen nahmen ebenfalls einen intermediären Wert ein mit 17% nekrotischer Zellen. Nach 60 h Beraubung von Adhärenzmöglichkeiten in der Suspensionskultur kam es zu einem weiteren Anstieg der Subpopulation nekrotischer Zellen. Die Zellen, die die Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-GpA-Mutante exprimierten, zeigten auch zu diesem Messzeitpunkt die höchste Rate nekrotischer Zellen mit 28%, wohingegen Zellen mit Überexpression der Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-GpA-I-Mutante, des Integrin $\alpha\beta 3$ -WT und Vektor-transfizierte Zellen, einen Anteil nekrotischer Zellen von 12-13% zeigten (s. Abbildung 11).

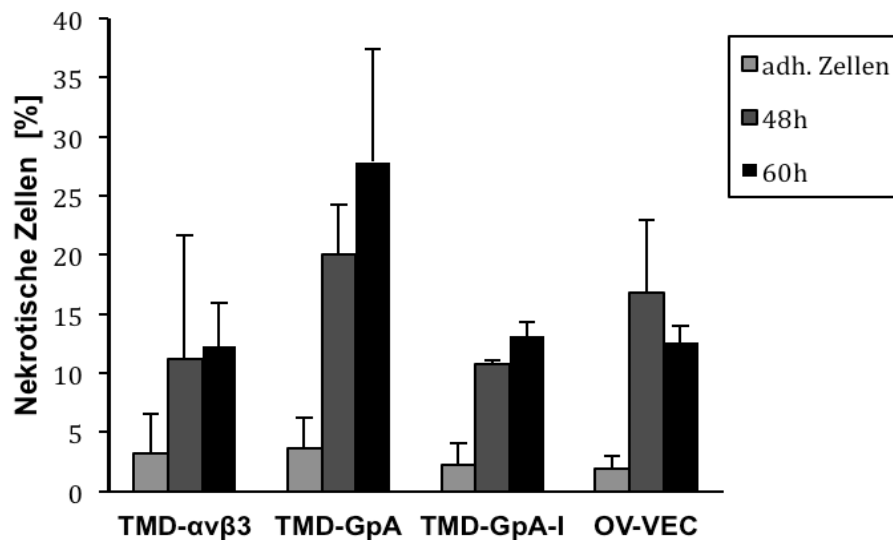


Abbildung 11: Untersuchung des Einflusses des Status der Integrinaktivierung als Funktion der TMD-Konformation auf die Nekrose in humanen kultivierten OV-MZ-6-Zellen mittels Annexin-V-Fluos Apoptose-Assay

OV-MZ-6-Zellen, die mit dem Integrin TMD- α v β 3, TMD-GpA, TMD-GpA-I oder dem leeren Expressionsvektor (OV-VEC) transfiziert worden waren, wurden über insgesamt 60 h in einer Konzentration von 500.000 Zellen/ml Medium in Suspensionskultur gehalten. Zum jeweiligen Zeitpunkt (48 und 60 h) wurden die Zellen mittels Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und PI ausgewertet, um den Anteil an vitalen, nekrotischen und apoptotischen Zellen zu bestimmen. Adhärenente Zellen dienten als Kontrolle. Zellen mit Expression der Integrin TMD-GpA-Mutante (geschlossene TMD-Konformation) zeigten jeweils die höchste Rate an nekrotischen Zellen. Eine offene TMD-Konformation, wie sie bei der Integrin TMD-GpA-I-Mutante vorliegt, zeigte im Vergleich eine geringere Subpopulation nekrotischer Zellen. Zellen mit Expression des Integrin α v β 3-WT sowie Vektor-transfizierte Zellen nahmen intermediäre Werte ein. Angegeben sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils nekrotischer Zellen ($n=2$, \pm SD).

Neben dem Einfluss der Integrin TMD auf die Zellnekrose interessierte vor allem das Apoptoseverhalten der transfizierten humanen Ovarialkarzinomzellen in Suspensionskultur.

Abbildung 12 zeigt einen Vergleich der Integrin α v β 3 Zelltransfektanten TMD-GpA, TMD-GpA-I, α v β 3-WT und OV-VEC mit adhärenente Zellen sowie nach 48 und 60 h Kultivierung der Zellen in Suspension. Die adhärenente Zellen dienten hierbei als Kontrolle. Der Anteil apoptotischer Zellen lag bei den adhärenente Zellen bei den verschiedenen Zellklonen zwischen 5-10%. Zum Zeitpunkt 48 h zeigten Zellen, die die

Integrin $\alpha\beta 3$ Mutante TMD-GpA-I exprimieren, mit 11% an apoptotischen Zellen 3,2-fach weniger apoptotische Zellen als die Vektor-transfizierten Zellen OV-VEC (35% apoptotische Zellen). Die mit der Integrin $\alpha\beta 3$ Mutante TMD-GpA transfizierten Zellen zeigten im Gegensatz dazu mit 49% apoptotischen Zellen 1,4-fach mehr apoptotische Zellen im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen OV-VEC. Zellen, die das Integrin $\alpha\beta 3$ in der WT-Form exprimieren, nahmen mit 26% eine intermediäre Stellung zwischen den OV-MZ-6-Zellen, die Integrin $\alpha\beta 3$ -TMD-GpA und -TMD-GpA-I exprimieren, ein. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich nach 60 h Zellkultivierung in Suspension. Zelltransfektanten mit Expression der Integrin $\alpha\beta 3$ Mutante TMD-GpA zeigten mit 58% apoptotischen Zellen 1,2-fach so viele apoptotische Zellen wie die Vektor-transfizierten OV-MZ-6-Zellen und 1,1-fach so viele wie Zellen mit Expression des Integrin $\alpha\beta 3$ -Wildtyps. Zellen, die die Integrin $\alpha\beta 3$ Mutante TMD-GpA-I exprimieren (38,5% apoptotische Zellen), zeigten 1,3-fach weniger apoptotische Zellen als die Vektor-transfizierten Zellen und die Zellen mit Expression des Integrin $\alpha\beta 3$ -Wildtyps. OV-MZ-6-Zellen mit Expression des Vektors oder des Integrin $\alpha\beta 3$ -Wildtyps nahmen wie bereits nach 48 h mit einer Subpopulation apoptotischer Zellen von 48% (für OV-VEC) und von 52% (für den Integrin $\alpha\beta 3$ -Wildtyp) eine intermediäre Stellung ein.

3.1.2 Untersuchungen zum Effekt der Serum-Deprivation auf das Apoptoseverhalten in Suspension kultivierter OV-MZ-6-Zellen als Funktion der Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung

Es ist bekannt, dass auch unter Nahrungsmangel in Zellen apoptotische Prozesse verstärkt werden können. Serum-Deprivation als alleiniger Faktor kann zum apoptotischen Zelltod führen (Kulkarni and McCulloch, 1994). Um diesen Effekt zu studieren, wurde das Apoptoseverhalten der verschiedenen Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Zelltransfektanten unter Serum-Deprivation untersucht. Hierzu wurde die Konzentration an fetalem Kälberserum (FCS) von 10% auf 1% reduziert, der sonstige Versuchsaufbau wie unter Kapitel 2.2.2 beschrieben belassen.

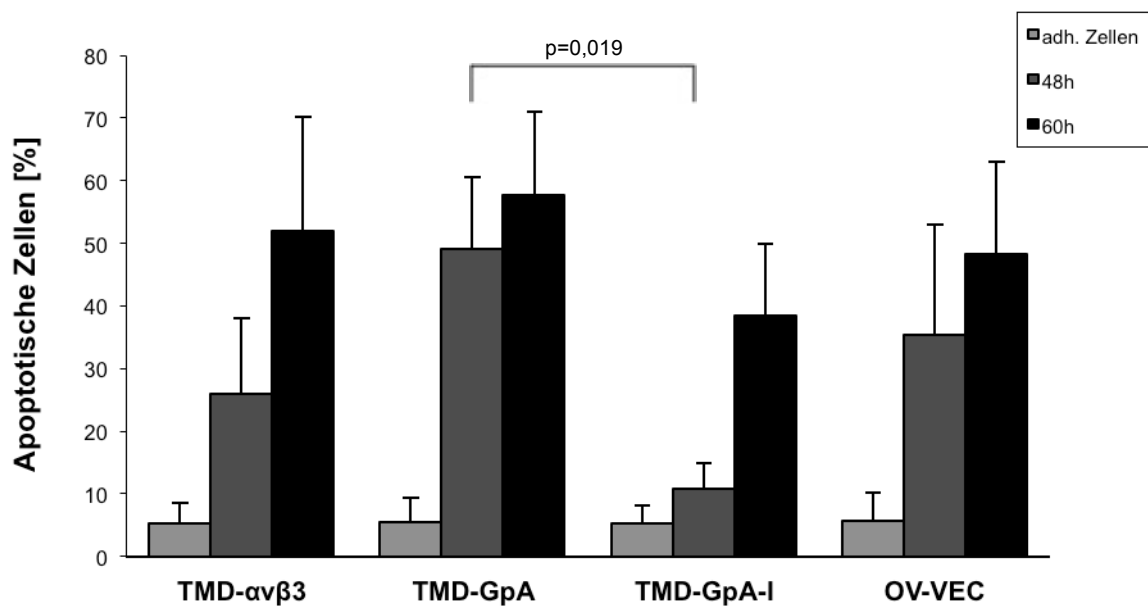


Abbildung 12: Untersuchung des Einflusses des Status der Integrinaktivierung als Funktion der TMD-Konformation auf die Apoptose in humanen kultivierten OV-MZ-6-Zellen mittels Annexin-V-Fluos Apoptose-Assay

OV-MZ-6-Zellen, die mit dem Integrin $\alpha\beta 3$ -WT, der Integrin $\alpha\beta 3$ -Mutante TMD-GpA, der Integrin $\alpha\beta 3$ -Mutante TMD-GpA-I oder dem leeren Expressionsvektor (OV-VEC) transfiziert worden waren, wurden über insgesamt 60 h in einer Konzentration von 500.000 Zellen/ml Medium in Suspension kultiviert. Nach 48 h und 60 h wurden mittels FACS-Analyse nach Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und PI die Subpopulationen an vitalen, nekrotischen und apoptotischen Zellen bestimmt. Die Abbildung zeigt die Anteile apoptotischer Zellen in %. Als Kontrolle dienten adhärenente Zellen, welche nicht verankerungsunabhängig reagieren können. Die adhärenente Zellen zeigten bei den verschiedenen Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Mutanten vergleichbare Werte um die 5-6% apoptotischer Zellen. Nach 48 und nach 60 h zeigte die konstitutiv aktive Integrin $\alpha\beta 3$ Mutante TMD-GpA-I einen geringeren Anteil an apoptotischen Zellen als die Integrin $\alpha\beta 3$ Mutante TMD-GpA. Die Vektor-transfizierten Zellen (OV-VEC) sowie die Zellen mit Expression des Integrin $\alpha\beta 3$ -Wildtyps nahmen nach 48 h und nach 60 h der Zellen in Suspension jeweils intermediäre Werte ein. Angegeben sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils an apoptotischen Zellen ($n=3$, \pm SD). Die p-Werte wurden mithilfe des T-Tests ermittelt. Eine statistische Signifikanz wird ab einem p-Wert $< 0,05$ (5%- Signifikanzniveau) angenommen.

Die stabil transfizierten OV-MZ-6-Zellen wurden über insgesamt 60 h in Suspension kultiviert. Durch die Reduktion des Serum-Gehalts auf 1% kam es zu einem starken Anstieg nekrotischer Zellen, so dass die Inkubationszeit von 60 h auf 48 h verkürzt wurde und die Messzeitpunkte nach 24 h und 48 h gewählt wurden. Als Kontrolle dienten Zellen, die in Zellkulturmedium mit 10% FCS in Suspension kultiviert wurden. Die Bestimmung der Anteile an lebendigen, nekrotischen und apoptotischen Zellen

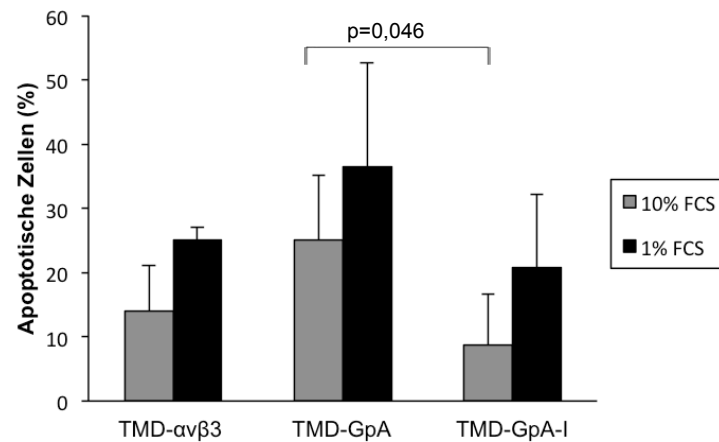
erfolgte mittels FACS-Analyse nach Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und PI (s. Abbildung 13).

Nach 24 h Suspensionskultur mit 1% FCS zeigten die Zellen mit Expression der Integrin $\alpha\beta 3$ Mutante TMD-GpA-I mit 21% anteilig am wenigsten apoptotische Zellen. Im Vergleich dazu zeigten Zellen in Anwesenheit von 10% Serum eine apoptotische Subpopulation von 8%. Die Zellen, die die Integrin $\alpha\beta 3$ Mutante TMD-GpA exprimieren, zeigten nach 24 h Kultivierung in Medium mit 1% Serum bereits 37% apoptotische Zellen, bei 10% Serum-Gehalt zeigten sich 25%. Zellen mit Expression des Integrin $\alpha\beta 3$ in WT-Form nahmen mit 25% in Medium mit 1% Serum und mit 14% in Medium mit 10% Serum jeweils einen intermediären Wert ein.

Nach 48 h Suspensionskultur bei 1% Serum zeigten die Zellen, die die Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-GpA Mutante exprimieren, wiederum anteilig die meisten apoptotischen Zellen mit 46%. Die Zellen, die die Integrin $\alpha\beta 3$ -WT Mutante exprimieren, zeigten den geringsten Anteil apoptotischer Zellen mit 25%. Zellen mit Expression der Integrin $\alpha\beta 3$ Mutante TMD-GpA-I nahmen hier mit 36% apoptotische Zellen einen intermediären Wert ein. Nach 48 h in Suspensionskultur mit 10% Serum im Medium fand sich die geringste Subpopulation apoptotischer Zellen bei Zellen mit Expression der konstitutiv aktiven Integrin $\alpha\beta 3$ Mutante TMD-GpA-I mit 9%. Der größte Anteil apoptotischer Zellen zeigte sich nach 48 h Kultivierung in Suspension bei 10% Serum bei Zellen mit Expression der Integrin $\alpha\beta 3$ Mutante TMD-GpA (25%) und des Integrin $\alpha\beta 3$ -WT (26%).

Die Reduktion der Nahrungsquelle im Zellkulturmedium (hier von 10% auf 1% Serum) steigerte den prozentualen Anteil apoptotischer Zellen per se, jedoch ließen sich die Unterschiede zwischen den mit den verschiedenen Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Mutanten transfizierten Zellen in der Relation nicht deutlicher zeigen. Die Auswertung und Vergleichbarkeit des Versuchs wurden durch den größeren Anteil an nekrotischen Zellen erschwert.

A) Zeitpunkt 24 h



B) Zeitpunkt 48 h

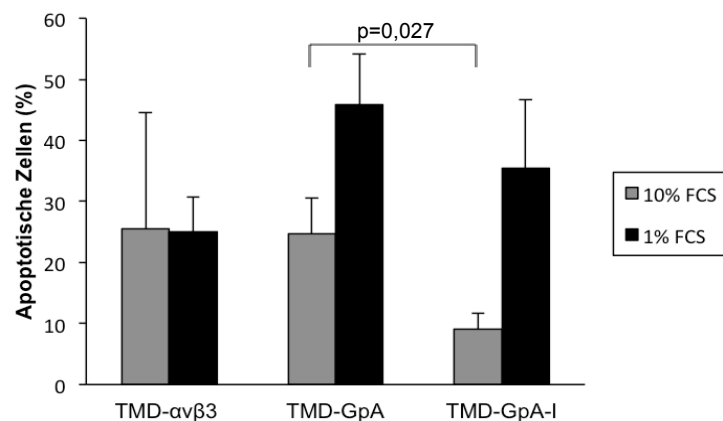


Abbildung 13: Einfluss der Serum-Deprivation auf frühe Apoptoseereignisse suspendierter OV-MZ-6-Zellen, die die verschiedenen Integrin α v β 3 TMD-Mutanten exprimieren

Zellen, die den Integrin α v β 3-WT oder die Integrin α v β 3-TMD-Mutanten TMD-GpA oder TMD-GpA-I exprimieren, wurden über insgesamt 48 h in einer Konzentration von 500.000 Zellen/ml Medium in Suspension kultiviert. Um den Einfluss der Serum-Deprivation auf das Apoptoseverhalten der verschiedenen Integrin α v β 3 TMD-Zelltransfektanten zu studieren, wurde der Serum-Gehalt im Medium von 10% auf 1% reduziert. Es ließ sich eine insgesamt gesteigerte Apoptoserate unter Serum-Deprivation (1% FCS Gehalt) beobachten. Nach 24 h und nach 48 h der Zellen in Suspension zeigte die Integrin α v β 3 TMD-GpA Transfektante die höchste Subpopulation apoptotischer Zellen. Zellen mit Expression der Integrin α v β 3-Mutante TMD-GpA-I zeigten im Vergleich dazu anteilig weniger apoptotische Zellen. Zellen, die den Integrin α v β 3-WT exprimieren, zeigten nach 24 h einen intermediären Wert sowohl in Medium mit 10% wie auch mit 1%igen Serum. Nach 48 h entsprach der Anteil apoptotischer Zellen (mit Integrin α v β 3-WT Expression) in etwa dem der Zellen mit Expression der Integrin α v β 3-Mutante TMD-GpA. Angegeben sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils an apoptotischen Zellen ($n=3$, \pm SD). Die p-Werte wurden mithilfe des T-Tests ermittelt. Eine statistische Signifikanz wird ab einem p-Wert $< 0,05$ (5%-Signifikanzniveau) angenommen.

3.1.3 Nachweis später Apoptoseereignisse mittels Detektion von durch Caspase generierten Spaltprodukten des Cytokeratins 18

Cytokeratine, insbesondere das Cytokeratin 18 (CK 18), sind prominente Substrate für eine Spaltung durch Caspasen und tragen somit zum Verlauf der Apoptose bei (Caulin et al., 1997). Durch den M30 CytoDEATH Antikörper können CK-18-Fragmente nach Caspasespaltung detektiert und angefärbt werden, welche nur in apoptotischen Zellen, nicht aber in lebenden Zellen gefunden werden (Leers et al., 1999). Im Durchflusszytometer können die Zellen, in denen bereits CK-18-Spaltprodukte vorliegen, bestimmt werden.

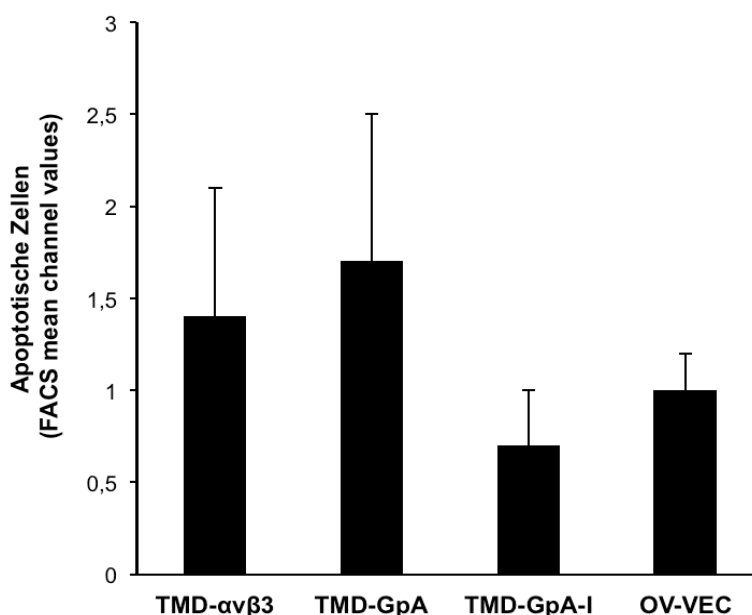


Abbildung 14: Nachweis von CK 18-Fragmenten nach Spaltung durch Caspase als Nachweis später Apoptoseereignisse in Abhängigkeit von der Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung

OV-MZ-6-Zellen, die mit dem Integrin $\alpha\beta 3$ -WT, der Integrin $\alpha\beta 3$ -Mutante TMD-GpA, der Integrin $\alpha\beta 3$ -Mutante TMD-GpA-I oder dem leeren Expressionsvektor (OV-VEC) transfiziert worden waren, wurden in einer Konzentration von 500.000 Zellen/ml über 48 h in Suspension gehalten. Nach Färbung mit dem M30-CytoDEATH Antikörper wurden mittels FACS-Analyse apoptotische Zellen nachgewiesen, die bereits CK-18-Fragmente aufweisen. Die Zellen, die die TMD-Mutante $\alpha\beta 3$ TMD-GpA exprimieren, zeigten anteilig die höchste, Zellen, die die TMD-Mutante $\alpha\beta 3$ TMD-GpA-I exprimieren, die geringste Anzahl apoptotischer Zellen. Die Zellen, die das Integrin $\alpha\beta 3$ -WT exprimieren bzw. die Vektor-Transfektanten (OV-VEC), nahmen intermediäre Werte ein. Angegeben sind die Mittelwerte als normalisierte mean channel values, wobei die Vektor-transfizierten Zellen gleich „1“ gesetzt wurden (n=3, \pm SD).

OV-MZ-6-Zellen wurden wie unter 2.2.1.3 beschrieben zur Apoptoseinduktion über 48 h in Suspension kultiviert und dadurch ihrer adhäsionsfördernden Wachstumsflächen beraubt. Es folgte die Färbung mit dem M30 CytoDeath Antikörper, wie in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben, sowie die anschließende Auswertung mittels FACS-Analyse.

Bei Zellen, die die Integrin $\alpha\beta3$ Mutante TMD-GpA-I exprimieren, war die Apoptoserate um das 0,7-fache im Vergleich zu den Vektor transfizierten OV-MZ-6-Zellen OV-VEC erniedrigt. Zellen mit Expression des Integrin $\alpha\beta3$ Wildtyps zeigten doppelt so viele apoptotische Zellen wie Zellen, die die Integrin $\alpha\beta3$ Mutante TMD-GpA-I exprimieren. Bei Zellen, die die Integrin $\alpha\beta3$ Mutante TMD-GpA exprimieren, war der Anteil an apoptotischen Zellen im Vergleich zu den Vektor transfizierten OV-MZ-6-Zellen (OV-VEC) um das 1,7-fache erhöht und im Vergleich zu den Zellen mit Expression des Integrins $\alpha\beta3$ in WT-Form um das 1,2-fache erhöht. Integrin $\alpha\beta3$ TMD-GpA-Transfektanten zeigten also die höchste Population apoptotischer Zellen, wohingegen Integrin $\alpha\beta3$ TMD-GpA-I-Transfektanten anteilig am wenigsten apoptotische Zellen aufwiesen.

3.2 Untersuchungen zum Einfluss der Integrin $\alpha\beta3$ -Aktivierung als Funktion der Ausbildung einer zytoplasmatischen Salzbrücke auf das zelluläre Apoptoseverhalten suspendierter OV-MZ-6-Zelltransfektanten

Analog zu den Zellen, die die Integrin $\alpha\beta3$ TMD-Mutanten exprimieren, wurde auch der Einfluss der Integrinaktivierung in Abhängigkeit von der Ausbildung einer zytoplasmatischen Salzbrücke in Hinsicht auf das zelluläre Apoptoseverhalten suspendierter OV-MZ-6 Zelltransfektanten untersucht.

3.2.1 Nachweis früher Apoptoseereignisse durch Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und Propidiumjodid

Die Zellen, die die Integrin $\alpha\beta3$ -Zellmutanten $\alpha_{R995D}\beta_{D723R}$, $\alpha\beta_{D723R}$, $\alpha_{R995D}\beta$ exprimieren, sowie Zellen mit Expression des Integrin $\alpha\beta3$ in WT-Form und die Vektor-Transfektanten wurden über 60 h in Suspension kultiviert und alle 12 h mittels FACS-Analyse und Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und PI ausgewertet (s. Kapitel

2.2.2). Als Kontrolle dienten adhärenente Zellen, welche die verschiedenen Integrin $\alpha\beta3$ SB-Mutanten exprimieren. Die adhärenente Zellen zeigten einen Anteil nekrotischer Zellen unter 10%.

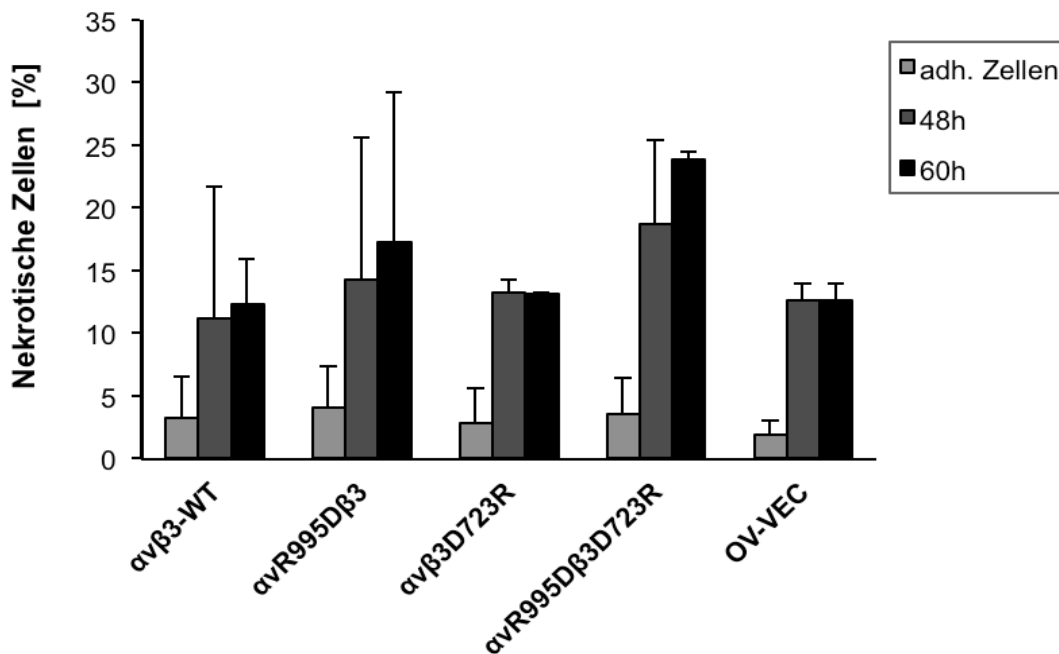


Abbildung 15: Untersuchung des Einflusses der Integrin $\alpha\beta3$ -Aktivierung als Funktion der Ausbildung einer zytoplasmatischen Salzbrücke auf das Nekroseverhalten suspendierter OV-MZ-6-Zellen mittels Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und PI

OV-MZ-6-Zellen, die mit dem Integrin $\alpha\beta3$ -WT, $\alpha_{R995D}\beta3_{D723R}$, $\alpha\beta3_{D723R}$, $\alpha_{R995D}\beta3$ oder dem leeren Expressionsvektor transfiziert worden waren, wurden über insgesamt 60 h in einer Konzentration von 500.000 Zellen/ml Medium in Suspension gehalten. Zum jeweiligen Zeitpunkt (nach 48 und 60 h) wurden die Zellen mittels FACS-Analyse und Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und PI ausgewertet und die Anteile an vitalen, nekrotischen und apoptotischen Zellen ermittelt. Adhärenent kultivierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Abbildung zeigt den Anteil nekrotischer Zellen in %. Zellen mit Expression der Integrin $\alpha\beta3$ -Mutante $\alpha_{R995D}\beta3_{D723R}$ (mögliche Ausbildung einer Salzbrücke) zeigten anteilig die höchsten Subpopulationen nekrotischer Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils an nekrotischen Zellen in % ($n=2$, \pm SD).

Nach 48 h, in denen die verschiedenen Zelltransfektanten ihrer Verankerungsmöglichkeiten in Suspensionskultur beraubt worden waren, belief sich der Gesamtanteil der nekrotischen Subpopulation auf <20%. Die Zellen mit Überexpression von Integrin $\alpha_{R995D}\beta3_{D723R}$ zeigten die höchste Rate nekrotischer Zellen mit 19%. Diese Integrin SB-Variante steht durch Austausch der Salzbrücken-

bildenden Aminosäuren für eine mögliche Ausbildung einer zytoplasmatischen Salzbrücke mit Ladungsumkehr. Der geringste Anteil nekrotischer Zellen fand sich nach 48 h der Zellen in Suspensionskultur bei den Zelltransfektanten mit Expression des $\alpha\beta 3$ -WT. Intermediäre Werte nahmen die Integrin $\alpha\beta 3$ -Zellmutanten $\alpha\beta 3_{D723R}$ (13%), $\alpha_{R995D}\beta 3$ (14%) und die Vektor-transfizierten Zellen (12%) ein. Die Integrin SB-Mutanten $\alpha\beta 3_{D723R}$ und $\alpha_{R995D}\beta 3$ sollen die Ausbildung einer zytoplasmatischen Salzbrücke unterbinden.

Nach 60 h in Suspensionskultivierung der OV-MZ-6-Zellen kam es zu einem weiteren Anstieg der Subpopulation nekrotischer Zellen, so dass spätere Messzeitpunkte nicht in die Auswertung aufgenommen wurden. Die Zellen mit Überexpression von Integrin $\alpha_{R995D}\beta 3_{D723R}$ zeigten auch zum späteren Messzeitpunkt von 60 h anteilig die meisten nekrotischen Zellen mit 23,9%, gefolgt von Zellen mit Überexpression von Integrin $\alpha_{R995D}\beta 3$ mit 17%. Zellen mit Überexpression des Integrins $\alpha\beta 3_{D723R}$, des Integrins $\alpha\beta 3$ -WT sowie die Vektor-transfizierten Zellen zeigten eine vergleichbare Rate nekrotischer Zellen um die 12-13%, s. Abbildung 15.

Abbildung 16 zeigt das unterschiedliche Apoptoseverhalten der Integrin $\alpha\beta 3$ Zelltransfektanten $\alpha\beta 3$ -WT, $\alpha_{R995D}\beta 3_{D723R}$, $\alpha\beta 3_{D723R}$, $\alpha_{R995D}\beta 3$ und OV-VEC in adhären Zellen sowie nach 48 h und 60 h in Suspensionskultur. Der Anteil an apoptotischen Zellen in den adhären kultivierten Zellen lag bei 5-10%. Nach 48 h Zellkultivierung in Suspension zeigten die Zellen, die die Integrin $\alpha\beta 3$ -Mutante $\alpha_{R995D}\beta 3_{D723R}$ (vermutliche Ausbildung einer Salzbrücke mit Ladungsumkehr) exprimieren, den größten Anteil apoptotischer Zellen mit 45%. Die zweithöchste Subpopulation apoptotischer Zellen nahmen Zellen mit Überexpression von Integrin $\alpha\beta 3_{D723R}$ ein (37%). Dies entsprach in etwa der Rate apoptotischer Zellen der Vektor-transfizierten OV-MZ-6-Zellen OV-VEC (35%). Die niedrigsten Apoptoseraten zeigten die Zellen, die das Integrin $\alpha\beta 3$ -WT exprimieren, mit 26%, sowie mit 28% die Zellen mit Überexpression von Integrin $\alpha_{R995D}\beta 3$.

Nach 60 h in Suspensionskultur ließ sich erneut bei der Integrin Salzbrücken-Variante $\alpha_{R995D}\beta 3_{D723R}$ der höchste apoptotische *Response* messen (55%).

Ähnlich hoch liegt die Apoptoserate bei den Zellen mit Expression des Integrin $\alpha\beta 3$ -WT (52%). Es folgen die Vektor-transfizierten Zellen mit 48% apoptotischer Zellen. Die kleinste Subpopulation apoptotischer Zellen (41%) fand sich bei Expression von Integrin $\alpha_{R995D}\beta 3$.

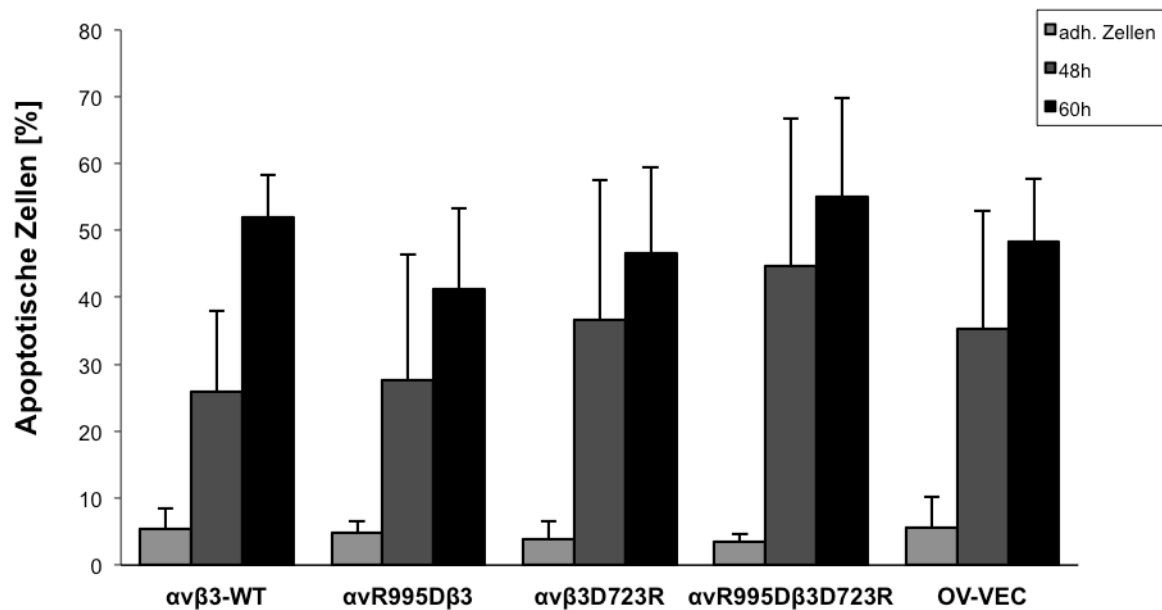


Abbildung 16: Untersuchung des Einflusses der Integrin $\alpha 5\beta 3$ Aktivierung in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Salzbrücke auf das Apoptoseverhalten suspendierter OV-MZ-6-Zellen mittels Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und PI

OV-MZ-6-Zellen, die mit dem Integrin $\alpha 5\beta 3$ -WT, $\alpha V_{R995D}\beta 3_{D723R}$, $\alpha 5\beta 3_{D723R}$, $\alpha V_{R995D}\beta 3$ oder dem leeren Expressionsvektor (OV-VEC) transfiziert wurden, wurden über insgesamt 60 h in einer Konzentration von 500.000 Zellen/ml Medium in Suspension gehalten und damit ihrer Adhäsionsmöglichkeit beraubt. Zum jeweiligen Zeitpunkt (48 und 60 h) wurden die Zellen mittels FACS-Analyse und Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und PI ausgewertet und der Anteil vitaler, nekrotischer und apoptotischer Zellen bestimmt. Als Kontrolle dienten dieselben Transfektanten, welche adhären kultiviert worden waren. Die Abbildung stellt die Subpopulationen apoptotischer Zellen in % dar. Die adhären kultivierten Zelltransfektanten zeigten vergleichbare Werte um die 5-6%. Nach 48 h verankerungs-unabhängigem Wachstum in Suspensionskultur zeigten die Zellen, die die Integrin $\alpha 5\beta 3$ Mutante $\alpha V_{R995D}\beta 3_{D723R}$ exprimieren, prozentual am meisten apoptotische Zellen (45%), während die Zellen, die die Integrin $\alpha 5\beta 3$ -WT Mutante exprimieren (26%) sowie die Zellen, die die Mutante $\alpha V_{R995D}\beta 3$ exprimieren (28%), am wenigsten apoptotische Zellen zeigten. Nach 60 h lag der Anteil apoptotischer Zellen bei Zellen mit Expression der Integrin $\alpha 5\beta 3$ Mutante $\alpha V_{R995D}\beta 3_{D723R}$ noch leicht über dem der Vektor-transfizierten Zellen OV-VEC mit 55% zu 48%. Angegeben sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation innerhalb der jeweiligen Zelltransfektante (n=3, \pm SD).

3.2.2 Nachweis später Apoptoseereignisse mittels Detektion von Fragmenten des Cytokeratins 18 nach Spaltung durch Caspase

Die OV-MZ-6-Zellen wurden wie unter 2.2.1.3 beschrieben zur Apoptoseinduktion über 48 h in Suspension kultiviert. Es folgte die Färbung mit dem M30 CytoDeath Antikörper (s. Kapitel 2.2.2.3) sowie die anschließende Auswertung mittels FACS-Analyse. Bei diesem Test dient der Nachweis von CK-18-Spaltprodukten als Maß für spätere Apoptoseereignisse.

Die Zellen, die die Integrin $\alpha\beta 3$ -Mutante $\alpha_{R995D}\beta_{D723R}$ exprimieren, zeigten den größten Anteil apoptotischer Zellen. Die Vektor-transfizierten OV-MZ-6-Zellen und die Zellen mit Expression des Integrin $\alpha\beta 3$ -WT zeigten eine vergleichbare Rate apoptotischer Zellen und nahmen einen intermediären Wert ein. Die Größe der Subpopulation apoptotischer Zellen war bei den Integrin $\alpha_{R995D}\beta_{D723R}$ -Transfektanten im Vergleich zu den Zellen mit Expression des Integrin $\alpha\beta 3$ -WT und den Vektor-transfizierten Zellen 1,4-fach erhöht und im Vergleich zu Zellen, die die Integrin Mutante $\alpha_{R995D}\beta 3$ exprimieren, 2-fach erhöht. Zellen mit Überexpression von Integrin $\alpha_{R995D}\beta 3$ zeigten die kleinste Subpopulation apoptotischer Zellen (0,7-fach im Vergleich zu Zellen mit Expression des Integrin $\alpha\beta 3$ -WT und den Vektor-transfizierten Zellen). Integrin $\alpha\beta_{D723R}$ -Transfektanten verhielten sich ähnlich wie die Vektor-transfizierten Zellen, die den WT von Integrin $\alpha\beta 3$ exprimierten (1,1-fach erhöhte Apoptoserate), s. Abbildung 17.

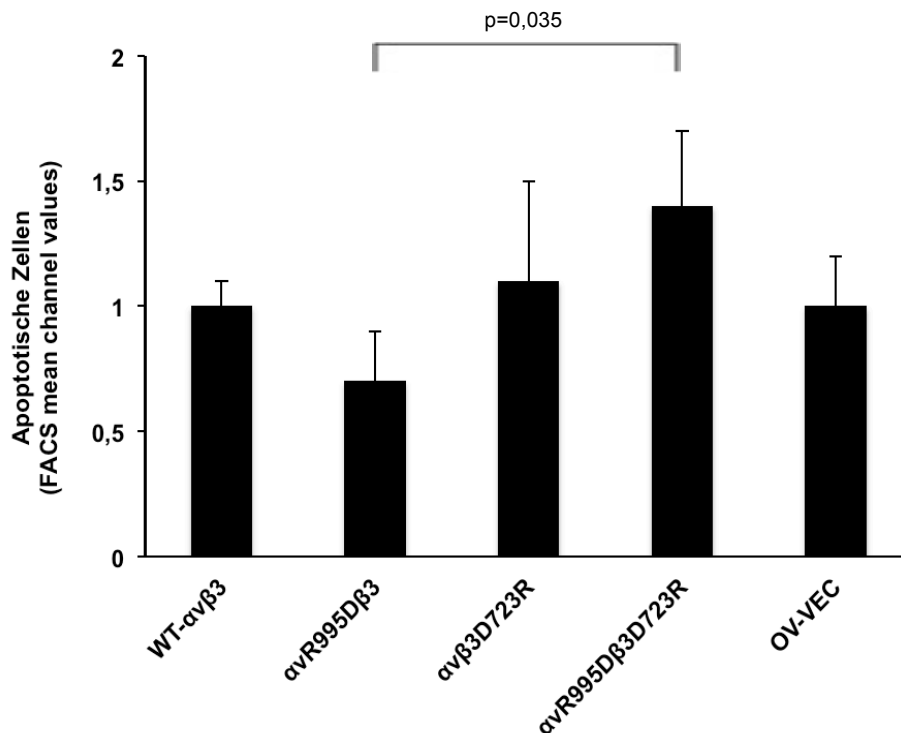


Abbildung 17: Nachweis von Fragmenten des CK 18 nach Spaltung durch Caspase als Nachweis später Apoptoseereignisse in Abhängigkeit von der Integrin α V β 3-Aktivierung

Stabil transfizierte OV-MZ-6-Zellen, die die Integrin SB-Mutanten α V $R995D\beta$ 3 $D723R$, α V β 3 $D723R$, α V $R995D\beta$ 3 sowie Zellen mit Expression von Integrin α V β 3 in WT-Form und Vektor-transfizierte Zellen, wurden in einer Konzentration von 500.000 Zellen/ml Medium über 48 h verankerungsfrei kultiviert. Nach Färbung mit dem M30-CytoDEATH Antikörper wurden mittels FACS-Analyse apoptotische Zellen nachgewiesen, die bereits CK-18-Fragmente aufweisen. Diese Fragmente können am Ende der Apoptosekaskade nach Aktivierung von Caspasen nachgewiesen werden. Zellen mit Expression der Integrin α V β 3-Mutante α V $R995D\beta$ 3 $D723R$ zeigten die höchste Apoptoserate (1,4-fach im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen und zum Integrin α V β 3-WT), wohingegen die Zellen, die die Integrin Mutante α V $R995D\beta$ 3 exprimieren, den geringsten Anteil apoptotischer Zellen aufwies (0,7-fach im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen). Die Zellen mit Expression der Integrin α V β 3-Mutante α V β 3 $D723R$ zeigten eine geringfügig höhere Apoptoserate als die Vektor-transfizierten Zellen OV-VEC (1,1-fach), welche zusammen mit den Zellen, die das Integrin α V β 3-WT exprimierten, einen intermediären Wert einnahmen. Angegeben sind die Mittelwerte als normalisierte FACS mean channel values, wobei die Vektor-transfizierten Zellen gleich „1“ gesetzt wurden (n=3, \pm SD). Die p-Werte wurden mithilfe des T-Tests ermittelt. Eine statistische Signifikanz wird ab einem p-Wert < 0,05 (5%- Signifikanzniveau) angenommen.

3.3 Einfluss der Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung auf die Signaltransduktion unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Integrine sind außerdem auch über eine Expression oder Hochregulierung anti-apoptotisch wirkender Proteine oder Signalmoleküle, darunter PI3K-AKT und NF- κ B an der Regulierung von Zellüberleben und Zelltod beteiligt (Scatena et al., 1998).

Transkriptionsfaktoren der Rel-Familie mit ihrem bekannten Mitglied NF- κ B reagieren sensibel auf Integrin-vermittelte Veränderungen der Zelladhäsion und nachfolgende Signaltransduktionsereignisse mit einer Steigerung oder Verminderung ihres Aktivitätslevels. Deshalb untersuchten wir den Einfluss der Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung auf die Signaltransduktion unter Beteiligung des TF NF- κ B.

3.3.1 Aktivierung von Rel Transkriptionsfaktoren bei der Integrin $\alpha\beta 3$ -vermittelten Signaltransduktion in Abhängigkeit von der Integrinaktivierung (TMD-Konformation)

Hierfür wurden Integrin $\alpha\beta 3$ -WT-, $\alpha\beta 3$ -GpA-, $\alpha\beta 3$ -GpA-I- und Vektor-transfizierte OV-MZ-6-Zellen transient mit einem Luziferase-Reporter-Gen-Vektor transfiziert, der als Promotor drei konsekutive κ B-Bindungsmotive trägt. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde das Luziferase-Reporterplasmid, welches zur Expression von Renilla-Luziferase führt, kotransfiziert, s.a. Kapitel 2.2.1.4. Nach der Zelltransfektion und Lyse wurde die Luziferase-Aktivität als Maß für die NF- κ B-Expression mittels Luminometrie gemessen. Gezeigt ist in Abbildung 18 jeweils die relative NF- κ B-Promotoraktivität, angegeben als Quotient aus den relativen Lichteinheiten (RLU) für Firefly und der Renilla-Luziferase-Aktivität.

In Zellen, die die konstitutiv aktive Integrin $\alpha\beta 3$ Variante TMD-GpA-I exprimieren, wurde die höchste NF- κ B Aktivierung gemessen (4-fach erhöht im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen OV-VEC), gefolgt von Zellen, die den Integrin $\alpha\beta 3$ -WT exprimieren (2,8-fach erhöht). Zellen, die die Integrin $\alpha\beta 3$ -Mutante TMD-GpA exprimieren, zeigten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen OV-VEC.

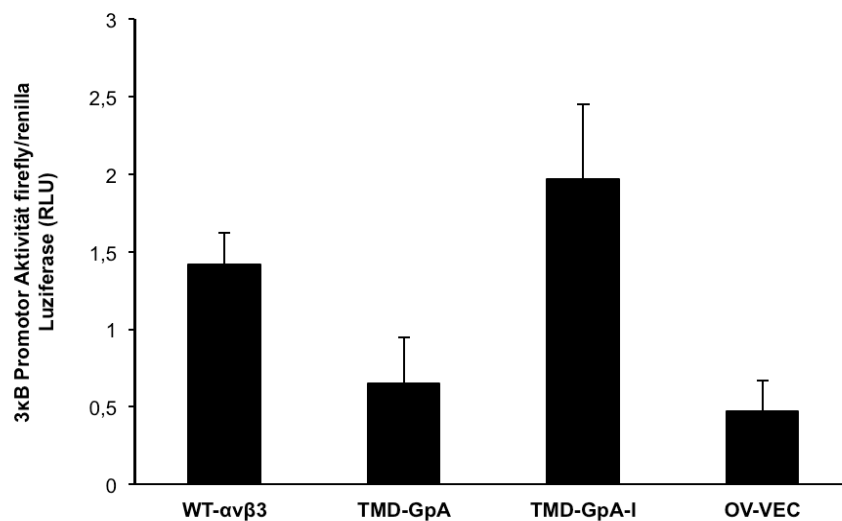


Abbildung 18: Aktivierung von Rel Transkriptionsfaktoren im Zuge der Integrin-vermittelten Signaltransduktion als Funktion der Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Aktivierung (TMD-Konformation)

Zellen, die entweder die Integrin TMD-Mutanten TMD- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, TMD-GpA oder TMD-GpA-I exprimieren, wurden transient transfiziert mit einem Luziferase Reporter gen Plasmid, welches als Promotor drei aufeinanderfolgende κB -Bindungsmotive trägt. Die Luziferase-Aktivität wurde als Maß der Rel Protein-Aktivierung gemessen. Die höchste NF- κB Aktivierung zeigten Zellen mit Expression der Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Variante TMD-GpA-I mit offener TMD-Konformation. Die Abbildung zeigt die Werte als Quotient der relativen Lichteinheiten (RLU) für Firefly versus konstitutiv aktivierte Renilla-Luziferase (Mittelwerte von $n=3$, \pm SD) (Müller et al., 2013).

3.3.2 Aktivierung von Rel Transkriptionsfaktoren bei der Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -vermittelten Signaltransduktion in Abhängigkeit von der Integrinaktivierung (SB-Konformation)

Weiterhin untersuchten wir, ob auch die zytoplasmatischen Domänen des Integrins $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ mit Ausbildung einer putativen Salzbrücke einen Einfluss auf die Transaktivierungseffizienz der Rel-Protein-Familie ausüben. Für diesen Zweck wiederholten wir den Versuchsaufbau mit Zellen mit Expression von Integrin $\alpha\text{V}_{\text{R995D}}\beta\text{3}_{\text{D723R}}$, $\alpha\text{v}\beta\text{3}_{\text{D723R}}$ und $\alpha\text{V}_{\text{R995D}}\beta\text{3}$. Als Kontrolle dienten die mit $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -transfizierten WT-Zellen sowie die Vektor-transfizierten Zellen OV-VEC, s. Abbildung 19.

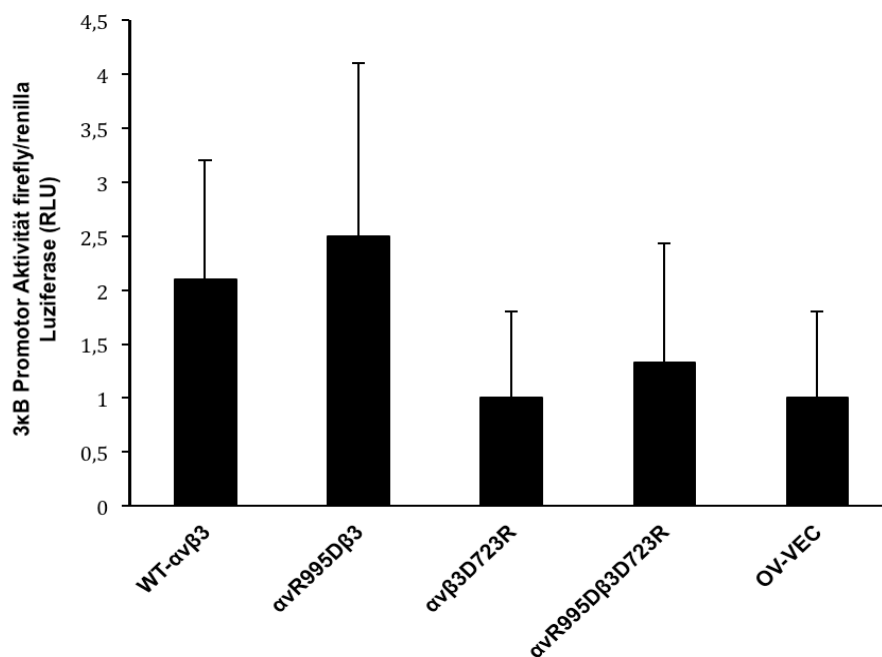


Abbildung 19: Aktivierung von Rel Transkriptionsfaktoren als Maß für Integrin $\alpha\beta 3$ -vermittelte Signaltransduktion in Abhängigkeit von der Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung (SB-Konformation)

Zellen, die die unterschiedlichen Integrin $\alpha\beta 3$ Salzbrücken-Mutanten ($\alpha V_{R995D}\beta 3_{D723R}$, $\alpha\beta 3_{D723R}$ und $\alpha V_{R995D}\beta 3$) exprimieren, wurden transient transfiziert mit einem Luziferase Reporter gen Plasmid, welches als Promotor drei aufeinanderfolgende kB-Bindungsmotive trägt. Die Luziferase-Aktivität wurde als Maß für die Rel Protein-Aktivierung gemessen. Die höchste NF- κB Aktivierung zeigten Zellen mit Expression der Integrin $\alpha\beta 3$ Salzbrücken Mutante $\alpha V_{R995D}\beta 3$, welche für die Aufhebung einer zytoplasmatischen Salzbrücke steht, gefolgt von Zellen mit Expression des Integrin $\alpha\beta 3$ -WT. Die geringste NF- κB Aktivierung zeigten Zellen mit Expression der Integrin $\alpha\beta 3$ Salzbrücken Mutante $\alpha\beta 3_{D723R}$. Die Abbildung zeigt die Werte als Quotient der relativen Lichteinheiten (RLU) für Firefly versus konstitutiv aktivierte Renilla-Luziferase (Mittelwerte von $n=3$, \pm SD).

In Integrin $\alpha V_{R995D}\beta 3$ -Transfektanten (Aufhebung der zytoplasmatischen Salzbrücke) wurde die höchste NF- κB Aktivierung gemessen (2,5-fach erhöht im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen OV-VEC), gefolgt von Zellen, die den Integrin $\alpha\beta 3$ -WT exprimieren (2,1-fach erhöht im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen OV-VEC). Integrin $\alpha\beta 3$ $\alpha V_{R995D}\beta 3_{D723R}$ (mögliche Ausbildung einer Salzbrücke mit Ladungsumkehr) und $\alpha\beta 3_{D723R}$ -Transfektanten (Aufhebung der zytoplasmatischen Salzbrücke), zeigten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich mit den Vektor-transfizierten Zellen OV-VEC. Diese Ergebnisse lassen auf weitere mögliche, elektrostatische Wechselwirkungen im zytoplasmatischen Bereich der Salzbrücke schließen, die entscheidend für die Integrinaktivierung sein könnten.

4 Diskussion

Ein wichtiger Grund für die hohen Mortalitätsraten beim Ovarialkarzinom ist das Fehlen typischer Frühsymptome. Bisher gibt es allerdings keine effektive Screening-Maßnahme zur Früherkennung, so dass die meisten Fälle erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden. Hier findet sich bereits häufig eine intraperitoneale Ausbreitung der Karzinomzellen durch Tumorzell dissemination. Normalerweise treten epitheliale Tumorzellen ohne Adhäsionsmöglichkeit oder Ligandenbindung in die Apoptose ein (Frisch and Francis, 1994). Die im Aszites frei flottierenden Tumorzell-Cluster zeigen beim Ovarialkarzinom jedoch ein verankerungs-unabhängiges Wachstum und haften an anderer Stelle wieder an, so dass es zur Metastasenbildung und weiterem Progress der Tumorerkrankung kommt. Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss der Integrinaktivierung auf dieses verankerungs-unabhängige Überleben von Karzinomzellen epithelialen Ursprungs, denn eine genauere Kenntnis der zellbiologischen Grundlagen ist wünschenswert, um zukünftig gezielte Therapieansätze zu entwickeln. Als Beispiel für diese Studie wurde das tumorbiologisch relevante Integrin $\alpha\beta 3$ gewählt, bei dem für das Ovarialkarzinom eine Korrelation der Expression mit der Tumorprogression hinreichend bekannt ist (Liapis et al., 1997, Carreiras et al., 1996). Hapke et al. (2003) zeigten außerdem, dass eine Überexpression des Integrin $\alpha\beta 3$ zu gesteigerter Adhäsion, Motilität und Proliferation humaner Ovarialkarzinomzellen führt, insbesondere auf dem für das Integrin $\alpha\beta 3$ wichtige EZM-Protein VN.

4.1 Einfluss des Aktivierungsstatus (TMD-Konformation) des Integrins $\alpha\beta 3$ auf das Apoptoseverhalten von nicht-adhärenenten OV-MZ-6 Zellen

Die Integrin-TMD transduzieren bidirektional Signale über die Zellmembran hinweg und regulieren über deren allosterische Konformationsänderungen die Ligandenbindungsaffinität eines Integrins. Ein hochaffiner, aktivierter Zustand des Integrins fordert die Extension des Integrinrezeptors sowie die Trennung der TMD und der intrazellulären Domänen (Hantgan et al., 1999, Xiao et al., 2004, Zhu et al., 2009) Die

Aufdeckung der Kristallstruktur der Extrazellulärdomäne des Integrins $\alpha\beta3$ im Jahre 2001 durch Xiong et al. brachte hierzu zum ersten Mal strukturelle Informationen (Xiong et al., 2001). Die Rolle der Wechselwirkungen zwischen den TMD der beiden Integrinuntereinheiten über allosterische Konformationsänderungen im Zuge der Integrinaktivierung ist inzwischen weitreichend charakterisiert worden, s.a. Kapitel 1.4 (2013). Die Struktur der helikalen TMD wurde zuletzt am Beispiel des Plättchen Integrin $\alpha11\beta3$ im ruhenden Zustand durch NMR-spektroskopische Untersuchungen aufgelöst und zeigt sich übereinstimmend mit früheren theoretischen Annahmen (Gottschalk et al., 2002, Hoefling et al., 2009, Lau et al., 2009).

Müller et al. (2013) generierten TMD-Konstrukte des bekanntermaßen in die Angiogenese und Tumormetastasierung involvierten Integrins $\alpha\beta3$. Durch veränderte TMD-Sequenzen in den Untereinheiten war es möglich, Integrin-kontrollierte zelluläre Prozesse als Funktion der Integrin $\alpha\beta3$ -Aktivierung in kultivierten humanen Ovarialkarzinomzellen genauer zu untersuchen. Die Dimerisierung der GpA-TMD zeichnet sich als eine starke Interaktion aus. Wird ein solches TMD-Motiv gegen die Integrin-TMD ausgetauscht, entsteht eine Integrin/GpA-Chimäre, bei der die TMD konstitutiv geschlossen vorliegt. Müller et al. zeigten, dass diese Integrin $\alpha\beta3$ TMD-GpA-Chimäre keine Signaltransduktion initiieren kann. Die Integrin $\alpha\beta3$ TMD-GpA-Chimäre zeigte außerdem eine geringe basale Ligandenbindungsaffinität, welche unter Krafteinwirkung stark adhärent war mit den Charakteristika eines putativen intermediären Integrinaktivierungszustandes, wie er direkt nach dem Prozess des *inside-out signaling*, aber noch vor dem *outside-in signaling* vorkommt. Da die GpA-TMD stark dimerisiert, verliert hier das Integrin im Gegensatz zu seiner originären Integrin-TMD die konformative Plastizität, welche es dem Wildtyp-Integrin normalerweise erlaubt, transiente Konformationszustände einzunehmen und aktiviert zu werden. Als Kontrolle diente eine GpA-TMD-Mutante des Integrins $\alpha\beta3$, in der das zentrale GxxxG Motiv der GpA-TMD zu GxxxI (TMD-GpA-I) verändert wurde. Diese Mutation führt beim GpA zu einer Dissoziation der TMD. Die Integrin $\alpha\beta3$ -TMD-GpA-I-Mutante zeigte eine - bei nun konstitutiv offenen TMD - gesteigerte *inside-out*-Aktivierung und ein konstitutives *outside-in signaling* (Müller et al., 2013). Diese Daten bestärken die essenzielle Rolle der Konformationsänderungen der TMD bei der Integrinaktivierung. Zusammenfassend sind die zwei TMD-Konstrukte TMD-GpA und TMD-GpA-I somit wohl als Extreme anzusehen für eine entweder dimerisierte TMD-

Helix oder eine dissoziierte TMD-Helix, wobei die bidirektionale Signaltransduktion des Integrins entkoppelt wurde (Müller et al., 2013, Senes et al., 2004).

Die eben genannten Integrin $\alpha\beta 3$ -Konstrukte wurden in kultivierte humane Ovarialkarzinomzellen transfiziert und in Suspension kultiviert. Dieser Verlust des Zell-EZM-Kontakts in Zellen epithelialen Ursprungs führt normalerweise nach kurzer Zeit zur Initiierung der Apoptosekaskade, die in der Aktivierung von Caspasen kulminiert (Meredith et al., 1993, Frisch and Francis, 1994). Es stellt sich daher die Frage, wie Tumorzellen in Aszites, wie er beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom auftritt, überleben und proliferieren können.

Die kleinste Subpopulation apoptotischer Zellen zeigte sich jeweils bei Zellen mit Expression der Integrin-GpA-TMD-Chimäre TMD-GpA-I (dissoziierte TMD-Helix). Ein konstitutiv aktives Integrin $\alpha\beta 3$ scheint somit in Zellen zu einer gesteigerten Apoptoseresistenz zu führen, welche unter physiologischen Bedingungen durch den Verlust von Adhäsionsmöglichkeiten der Zellen eingeleitet wird. Dadurch kommt es zu einem erhöhten Tumorzellüberleben und zur weiteren Förderung der Tumorprogression und der Tumormetastasierung, wie sie beim Ovarialkarzinom beobachtet wird. Es wäre zudem eine mögliche Erklärung für das aggressive Verhalten mancher Integrin $\alpha\beta 3$ exprimierender Tumorzellen. Übereinstimmend mit diesen Resultaten zeigten Zellen mit Expression der Integrin-Chimäre TMD-GpA (dimerisierte TMD) die höchste Rate an apoptotischen Zellen. Diese Tumorzellen, welche durch ihre dimerisierte TMD-Helix ein inaktives Integrin beschreiben, besitzen demnach nur eine reduzierte Möglichkeit, der Apoptose zu entgehen.

Ein weiterer möglicher Weg, zellbiologisches Verhalten zu beeinflussen, stellt die Expression oder Hochregulierung anti-apoptotisch wirkender Proteine oder Signalmoleküle, darunter NF- κ B und PI3K-AKT, dar (Scatena et al., 1998). So vermittelt eine Zelle, deren Integrine zum größten Teil in ligandengebundener Form vorliegen, Zellüberleben durch erhöhte NF- κ B oder PI3K-Akt-Aktivität (Scatena et al., 1998, Dummler and Hemmings, 2007). Rel-Proteine mit ihrem bekannten Familienmitglied NF- κ B reagieren mit einer Veränderung ihres Aktivitätslevels auf Veränderungen der Zelladhäsion, welche wiederum durch Integrin-vermittelte Signaltransduktion alteriert wird (Higgins et al., 1993, Yebra et al., 1995, Sokoloski et al., 1993). Es wurde in weiteren Untersuchungen mittels Reporter-gen-Promotoraktivitätsstudien die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Ovarialkarzinomzelltransfektanten als Funktion der Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung

analysiert. Konform mit vorangehenden Ergebnissen der Arbeitsgruppe, welche bereits für Zellen mit Überexpression der Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-GpA-I Mutante eine erhöhte Signaltransduktion für z.B. FAK und Akt (Müller et al., 2013) zeigen konnten, zeigten auch hier die Zellen, die die Integrin-GpA-TMD-Chimäre mit der offenen TMD exprimieren, das höchste Aktivitätsniveau von NF- κ B. Diese Beobachtung kann sich auch auf das anti-apoptotische Verhalten der Karzinomzellen auswirken.

4.2 Integrin $\alpha\beta 3$ /c-Src-vermittelte Signaltransduktion als Mediator verankerungs-unabhängigen Zellwachstums

Integrine nehmen interessanterweise eine duale Rolle bei der Apoptose ein. Ob Integrine anti- oder pro-apoptotische Signale vermitteln, hängt maßgeblich vom Ligationsstatus der auf der jeweilig adhärenen Zelle exprimierten Integrine ab. Eine Zelle, deren Integrine zum größten Teil ligandengebunden sind, vermittelt Zellüberleben durch erhöhte NF- κ B- oder PI3K-Akt-Aktivität (Scatena et al., 1998), erniedrigte p53-Aktivierung oder erhöhte Expression der anti-apoptotischen Moleküle Bcl-2 und FLIP (Matter and Ruoslahti, 2001, Aoudjit and Vuori, 2001). Ist der Großteil der von der adhärenen Zelle exprimierten Integrine in einem unligierten Zustand, wird die Apoptose durch Aktivierung von Caspase-8 eingeleitet. Dieser Vorgang wird als Integrin-vermittelter Zelltod (IMD) bezeichnet (Stupack et al., 2001, Desgrosellier and Cheresch, 2010). Der IMD wiederum muss von der Anoikis abgegrenzt werden, einer Sonderform der Apoptose, die auftritt als Folge des kompletten Verlusts der Zelladhäsion in epithelialen Zellen. Studien konnten zeigen, dass der Verlust von Caspase-8 ein Mechanismus ist, durch welchen Tumorzellen den IMD vermeiden können und somit zu Tumorzell dissemination und Metastasierung führen (Stupack et al., 2006). Dieses tumorzellbiologische Verhalten kann auch beim Ovarialkarzinom beobachtet werden, wo im Aszites in der Peritonealhöhle schwimmende Tumorzellcluster durch verankerungs-unabhängiges Wachstum zur Metastasierung führen. Desgrosellier et al. zeigten, dass in IMD-resistenten Tumorzellen unligiertes Integrin $\alpha\beta 3$ verankerungs-unabhängiges Tumorzellwachstum *in vitro* und Metastasierung *in vivo* fördert (Desgrosellier et al., 2009). Dies erfordert die Rekrutierung von c-src an die $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit, was zur Aktivierung von c-src, der Phosphorylierung von CAS und zum Tumorzellüberleben führt.

Überraschenderweise war dieser Signalweg FAK-unabhängig. Desgrosellier et al. zeigten außerdem, dass eine erniedrigte Expression von endogenem Integrin $\alpha\beta3$ oder c-src nicht nur verankerungs-unabhängiges Wachstum unterdrückt, sondern auch zu einer verminderten Metastasierungsrate *in vivo* führt, dabei allerdings keine Auswirkungen auf Zellmigration und -invasion zeigt. Diese Daten sprechen für eine unerwartete Rolle des Integrins als Mediator von verankerungs-unabhängigem Wachstum, so dass ein Integrin $\alpha\beta3$ /c-src Signalmodul eine mögliche Erklärung für das aggressive Verhalten von Integrin $\alpha\beta3$ exprimierenden Tumoren beim Menschen sein könnte (Desgrosellier et al., 2009). Für die Klinik ergäbe sich daraus die Folgerung, dass Integrin $\alpha\beta3$ -Antagonisten, die durch Blockierung der Ligandenbindungsstelle funktionieren, ineffektiv bei der Behandlung von Integrin $\alpha\beta3$ positiven Karzinomen wären, dafür aber SFK-Inhibitoren wie Dasatinib eventuell eine Therapieoption durch Blockade des eben beschriebenen Signalwegs eröffnen könnten. Ein genaueres Verständnis der hochkomplexen molekularen und dynamischen Mechanismen und Prozesse bei der Integrinaktivierung und den daraus resultierenden zell- und tumorbiologischen Aspekten ist für die Weiterentwicklung von gezielten Therapieansätzen also zwingend erforderlich.

4.3 Einfluss der zytoplasmatischen Salzbrücke des Integrins $\alpha\beta3$ auf das Apoptoseverhalten in Suspension kultivierter OV-MZ-6 Zellen

Der Einfluss der zytoplasmatischen Integrindomänen auf die Integrinaktivierung (*inside-out* Aktivierung) wird von verschiedenen Autoren widersprüchlich diskutiert. Angesichts der unklaren Datenlage erschien es sinnvoll, die Rolle der zytoplasmatischen Salzbrücke und ihren Einfluss auf die Integrinaktivierung mit den Folgen für das Zellverhalten genauer zu untersuchen. Hierzu wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Reuning verschiedene Integrin $\alpha\beta3$ - Salzbrücken-Mutanten generiert, welche entweder eine Salzbrücke ausbilden (α -WT/ $\beta3$ -WT oder $\alpha_{V_{R995D}}/\beta3_{D723R}$ mit Ladungsumkehr) oder aufheben ($\alpha_{V_{R995D}}/\beta3$ -WT oder α -WT/ $\beta3_{D723R}$). Ausgehend von diesem Zellmodell konnte bereits gezeigt werden, dass die Ausbildung einer Salzbrücke beim Integrin $\alpha\beta3$ eine notwendige Voraussetzung für ein funktionierendes *inside-out* und *outside-in signaling* und der daraus resultierenden (tumor-)zellbiologischen Ereignissen darstellt (Müller et al., 2014). Es

interessierte nun der mögliche Einfluss der Ausbildung einer zytoplasmatischen Salzbrücke und damit des Status der Integrinaktivierung auf das Apoptoseverhalten der verschiedenen stabil transfizierten Ovarialkarzinomzellen in Suspensionskultur.

Im Annexin-V-Fluos Assay, welcher dem Nachweis früher Apoptoseereignisse dient, zeigten Zellen mit Überexpression der Integrin $\alpha\beta3$ SB-Mutante $\alpha_{V_{R995D}}\beta3$ und des Integrin $\alpha\beta3$ -WT nach 48 h verankerungsfreier Kultivierung in Suspension, den geringsten Anteil an apoptotischen Zellen. Nach 60 h in Suspensionskultur zeigten die Zellen, die die Integrin $\alpha_{V_{R995D}}\beta3$ -Mutante exprimieren, weiterhin die geringste Apoptoserate, was darauf hinweist, dass sich das Integrin durch die fehlende Salzbrücke bereits in einem höheren Aktivitätsstatus befindet. Es folgten Zellen mit Expression von Integrin $\alpha\beta3_{D723R}$, wengleich hier der Anteil apoptotischer Zellen dem der Vektor-transfizierten Zellen ähnelte. Zellen mit Überexpression der Integrin SB-Mutante $\alpha_{V_{R995D}}/\beta3_{D723R}$, für die die Formation einer Salzbrücke mit Ladungsumkehr diskutiert wurde, zeigten nach 48 und 60 h in Suspensionskultur jeweils die höchsten Apoptoseraten. Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass eine ausgebildete Salzbrücke - wie sie bei Zellen mit Expression des Integrin $\alpha\beta3$ -WT und des Integrin $\alpha_{V_{R995D}}/\beta3_{D723R}$ vorkommt - maßgeblich für ein funktionelles *inside-out* und *outside-in signaling* ist (Müller et al., 2013). Zellen mit Expression des Integrin $\alpha\beta3$ -WT zeigten nach 60 h in Suspension, in denen sie ihrer Adhärenzmöglichkeiten beraubt worden waren, die zweithöchste Rate apoptotischer Zellen. Es wurde ein weiterer Apoptose-Assay durchgeführt, der durch Detektion von CK 18-Spalprodukten als Folge der Aktivierung von Caspasen den Nachweis späterer Apoptoseereignisse erlaubte. Hier zeigten Zellen mit Überexpression der Integrin SB-Mutante $\alpha_{V_{R995D}}/\beta3_{D723R}$ erneut die höchste Apoptoserate und Zellen mit Überexpression der Integrin SB-Mutante $\alpha_{V_{R995D}}\beta3$ die kleinste Subpopulation apoptotischer Zellen. Zellen, die die Integrin SB-Mutante $\alpha\beta3_{D723R}$ exprimierten, zeigten eine geringfügig höhere Apoptoserate als die Vektor-transfizierten Zellen, welche zusammen mit den Zellen, die den Integrin $\alpha\beta3$ -WT exprimieren, einen intermediären Wert einnahmen.

Entsprechend den Integrin $\alpha\beta3$ /GpA/TMD-Mutanten wurden auch die mit den Integrin $\alpha\beta3$ -Salzbrücken-Mutanten stabil transfizierten Ovarialkarzinomzellen mittels Promotoraktivitätsstudien bezüglich ihrer NF- κ B-Aktivierung untersucht. Hier zeigten Zellen, die die Integrin Mutante $\alpha_{V_{R995D}}\beta3$ exprimierten, die stärkste Aktivierung von NF- κ B, gefolgt von den Integrin $\alpha\beta3$ -WT exprimierenden Zellen. Zellen, die die Integrin SB-Mutanten $\alpha_{V_{R995D}}/\beta3_{D723R}$ (mögliche Ausbildung einer Salzbrücke) und

$\alpha\beta_{D723R}$ (Aufhebung der Bildung einer putativen Salzbrücke) exprimierten, verhielten sich ähnlich wie Vektor-transfizierte Zellen.

Die Integrin SB-Mutante $\alpha\beta_{D723R}$ scheint einen intermediären Zustand bei der Integrinaktivierung und dem *outside-in signaling* einzunehmen. Grund hierfür könnten weitere elektrostatische Interaktionen zwischen den zytoplasmatischen Domänen sein. Eine NMR-spektroskopische Darstellung der Struktur des Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ erlaubte Einblick in die zytoplasmatischen hydrophoben und elektrostatischen Assoziationen, in welche eine Aminosäure der αIIb -Untereinheit, aber mehr als eine Aminosäure in der β_3 zytoplasmatischen Region involviert zu sein scheint (Vinogradova et al., 2002). Diese Interaktionen finden zwischen αIIb_{R995} (Guanidylgruppe) und β_{D723} (Carboxylgruppe), αIIb_{R995} (Guanidylgruppe) und β_{E726} (Carboxylgruppe) und αIIb_{R995} (Guanidylgruppe) und β_{H722} (Imidazolgruppe) statt. Bei der α_{R995D} Mutation wird also nicht nur die Hauptinteraktion mit β_{D723} verändert, sondern es werden auch die umliegenden elektrostatischen Interaktionen aufgehoben. Im Gegensatz dazu könnten bei der Integrin SB-Mutante β_{D723R} Teile der elektrostatischen Interaktion mit α_{R995} durch β_{E726} und β_{H722} wiederhergestellt werden. Somit wäre der zytoplasmatische elektrostatische Kontakt in Zellen mit Expression der Integrin SB-Mutante $\alpha_{R995D}\beta_3$ instabiler als bei Zellen mit Expression der Integrin SB-Mutante $\alpha\beta_{D723R}$, was die experimentellen Daten erklären könnte. Dieses Erklärungsmodell findet sich physiologischerweise bei der vererbaren Thrombozytopenie wieder. Von dieser Krankheit befallene Patienten sind Träger einer $\alpha\text{IIb}\beta_{D723H}$ -Mutation, welche aufgrund der Salzbrückenunterbrechung zu einer konstitutiven, aber nur partiellen $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -Aktivierung führt, was sich wiederum als Diathese aufgrund einer Prothrombozyten-Malformation manifestiert (Hughes et al., 1996, Ghevaert et al., 2008, Hughes et al., 1995).

Die in der vorliegenden Dissertation erarbeiteten wissenschaftlichen Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung zu den zuvor gemachten Beobachtungen der Arbeitsgruppe (Müller et al., 2014). So führte der Verlust der Salzbrücke zu einer verstärkten Integrin $\alpha\beta_3$ -vermittelten Adhäsion an Vitronektin, einem Hauptliganden der EZM für das Integrin $\alpha\beta_3$. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Abbruch der Salzbrückenformation zwischen α_{R995} und β_{D723} die Rekrutierung von zytoskelettalen Komponenten wie Talin an die Integrin $\alpha\beta_3$ assoziierte zytoplasmatische Domäne erleichtert mit nachfolgender Aktivierung Integrin-vermittelter Signalmoleküle. Dies führt wiederum zu einer entscheidenden

Beeinflussung des (tumor-) zellbiologischen Verhaltens. Humane Ovarialkarzinomzellen, die SB-Mutanten des Integrin $\alpha\beta 3$ exprimieren, die zur Aufhebung der zytoplasmatischen Salzbrücke führen, zeigten einen verstärkten migratorischen und proliferativen Phänotyp – ein wichtiges und essenzielles Kennzeichen der Tumorprogression. Ebenso kann davon ausgegangen werden, dass ein konstitutiv aktives Integrin die Ruptur der zytoplasmatischen Salzbrücke fördert (Müller et al., 2014). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen zudem die Vermutung, dass zusätzlich zur gesteigerten Zellproliferation die Integrin-Mutanten mit rupturierter Salzbrücke resistenter gegenüber der Apoptose sind, auch dies ein Schlüsselpunkt der Tumorprogression und Voraussetzung für Tumorzell dissemination sowie Metastasierung. Nur ein genaues Verständnis der Bedeutung der zytoplasmatischen Salzbrücke kann sie zu einem möglichen Angriffspunkt für neue Therapieversuche machen auf der Suche nach Möglichkeiten, unerwünschte und persistierende Integrin-getriggerte Signalwege mit ihren biologischen Auswirkungen zu verhindern. Dennoch ist die aktuelle Datenlage bezüglich der zytoplasmatischen Salzbrücke widersprüchlich. Hughes und Mitarbeiter fanden heraus, dass die zytoplasmatischen Domänen der beiden Integrinuntereinheiten ein bestimmtes Motiv mit polaren und apolaren Sequenzen zeigen, mit einem GFFKR-Motiv in der α -Untereinheit und einem LLxxxHDRE-Motiv in der β -Untereinheit, so dass hier membranah eine elektrostatische Wechselwirkung über eine intrazelluläre, zytoplasmatische, putative Salzbrücke (α R995; β D723) vermutet wird. Vinogradova et al. (2002) beobachteten beim Integrin $\alpha 11\beta 3$ in der NMR-Spektroskopie eine elektrostatische Interaktion zwischen $\alpha 11_{R995}$ und $\beta 3_{D723/E726}$. Bei diesen Untersuchungen benutzten sie aufgereinigte, zytoplasmatische Domänen dieses Integrins. Andere Studien konnten dies jedoch nicht belegen; hier stellten sich die zytoplasmatischen Integrindomänen als unstrukturierte, flexible Domänen ohne erkennbare Interaktionen dar, so dass am ehesten von einer schwachen Assoziation der α - und β -zytoplasmatischen Untereinheiten ausgegangen werden könnte. Spätere NMR-spektroskopische strukturelle Daten, die vor allem die TMD des Integrin $\alpha 11\beta 3$ untersuchen sollten, in denen aber auch die proximalen zytoplasmatischen Untereinheiten miterfasst wurden, wiesen auf das Vorhandensein einer Salzbrücke hin, welche dazu beitragen könnte, das Integrin in einem ruhenden, niedrig-affinen Zustand zu halten (Hughes et al., 1996, Lau et al., 2009). Diese stabilisierende Funktion der Salzbrücke wurde bereits früher durch *in vitro* Studien am Beispiel des Integrin $\alpha 11\beta 3$ und des Integrin $\alpha 5\beta 1$

beobachtet; hier führte nämlich die Ruptur der Salzbrücke zu einer konstitutiven Signaltransduktion in den untersuchten Integrinen (O'Toole et al., 1994). Assoziierte Integrin-TMD stellen hierbei die Voraussetzung für die Ausbildung einer Salzbrücke dar, da erst hierdurch die erforderliche Nähe der proximalen zytoplasmatischen Untereinheiten erreicht werden kann. Czuchra et al. (2006) untersuchten die physiologische Relevanz der Salzbrücke in einem *in vivo* Mausmodell: Hierzu führten sie eine phänotypische Analyse mit transgenen Mäusen durch, die Punktmutationen in der Salzbrücken-beteiligten Aminosäure in der $\beta 1$ -Untereinheit ($\beta 1_{D759A}$) trugen. Es konnte hierbei keine evidente Veränderung im Phänotyp festgestellt werden. Auch zeigten von diesen transgenen Mäusen isolierte primäre Keratinozyten im Vergleich zu den korrespondierenden WT-Zellen keine Veränderung bezüglich ihres adhäsiven und migratorischen Verhaltens. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde postuliert, dass der Salzbrücke *in vivo* keine Bedeutung zukommt. Dazu im Widerspruch steht ein anderes Mausmodell. Hier führte die Unterbrechung der Salzbrückenausbildung in der zytoplasmatischen Domäne des Integrin $\alpha 4 \beta 7$ ($\alpha 4 R/A_{GFFKR}$) zu einer Veränderung der Zelladhäsionseigenschaften und außerdem zur Destabilisierung der nicht-adhäsiven Integrinkonformation. Es konnte gezeigt werden, dass diese Veränderungen die Leukozytenadhäsion und -migration förderten (Imai et al., 2008).

4.4 Therapeutische Ansatzpunkte und klinische Folgen

Seine wichtige Rolle in der Tumorprogression als auch in der Angiogenese prädestiniert das Integrin $\alpha \nu \beta 3$ als Ziel für die Entwicklung neuer antitumoraler Therapien. Ein Beispiel stellt der monoklonale Antikörper Etaracizumab (synonym Vitaxin, Abegrin) dar, der darauf abzielt, die Integrin $\alpha \nu \beta 3$ -EZM-Interaktion zu antagonisieren. Leider konnten die in präklinischen Studien gezeigten anti-angiogenetischen Effekte nicht bestätigt werden und der Nutzen für den Einsatz am Patienten bleibt bislang relativ gering (Brooks et al., 1994 Hersey et al., 2010). Cilengitid (cyclo-[RGDfN(Me)V]), ein zyklisches Pentapeptid, bindet spezifisch an Integrin $\alpha \nu \beta 3$ und unterbricht dessen RGD-abhängige Anbindung, z.B. an Vitronektin und Fibronektin. Hiermit soll u.a. die Unterdrückung der Angiogenese bewirkt werden, was in den Karzinomzellen zur Auslösung der Apoptose führt (Goodman et al., 2002). Cilengitid schaffte es bisher als einziger Integrin-Antagonist, durch viel versprechende Studienergebnisse in Phase-II-Studien auch in Phase III-Studien untersucht zu

werden. Leider zeigte sich im Vergleich zur Standardtherapie - bestehend aus Radiochemotherapie - bei Patienten mit Glioblastom mit oder ohne Cilengitid keine Verbesserung des *Overall survival* (OS) oder des progressionsfreien Überlebens (PFS) (Stupp et al., 2014, Nabors et al., 2015). Auch wenn die bisherigen Ansatzpunkte nicht den Einzug in den klinischen Alltag finden konnten, so bleiben Integrine dennoch ein attraktives Ziel als therapeutische Angriffspunkte. Definitiv sollte weiter nach neuen möglichen Therapieansätzen gesucht werden. Denkbar wäre z.B. die Entwicklung allosterischer Inhibitoren mit der Fähigkeit, Integrine in ihrer inaktiven Konformation zu halten, um somit die Signaltransduktion mit den (tumor-) zellbiologischen Konsequenzen zu unterdrücken. Das Wissen um mögliche Signalwege ist auch deshalb so wichtig, weil z.B. für Integrine, die resistent gegen den Integrin-vermittelten Zelltod sind (der unter physiologischen Bedingungen durch den Entzug von Liganden und damit einer Verankerung an die EZM eingeleitet wird), ein Blockieren der Ligandenbindungsstelle unwirksam wäre. Beim Kolorektalkarzinom konnten z.B. am *in vitro* Zellkulturmodell durch die Kombination des Src-Inhibitors Dasatinib mit dem α -Inhibitor Intemumumab bessere anti-angiogenetische Ergebnisse als durch die jeweilige Hemmung der einzelnen Signalwege erreicht werden (Jia et al., 2013).

5 Zusammenfassung

Integrine sind heterodimere Transmembranproteine, die die Zelle mit anderen Zellen und ihrer EZM in Verbindung setzen. Sie vermitteln Zelladhäsion, Motilität, Invasion, Proliferation sowie Zellüberleben. Diese Eigenschaften erklären ihre wichtige Rolle bei der Tumorprogression. Integrine besitzen die Fähigkeit, Signale bidirektional über die Zellmembran zu transduzieren, sog. *inside-out und outside-signaling*. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl den Transmembrandomänen als auch den zytoplasmatischen Domänen der Integrinuntereinheiten eine essenzielle Rolle bei der Rezeptoraktivierung und -regulation zukommt. Am Beispiel des tumorbiologisch relevanten Integrin $\alpha\beta3$, bei dem für das Ovarialkarzinom eine Korrelation der Expression mit der Tumorprogression hinreichend bekannt ist (Liapis et al., 1997, Carreiras et al., 1996), beschäftigte sich die vorliegende Arbeit damit, welchen Einfluss die strukturelle Konformation der TMD und die zytoplasmatischen Domänen auf die Aktivierung dieses Integrins haben, und wie sich dieser Status auf das Apoptoseverhalten und auf ausgewählte Integrin-vermittelte Signaltransduktionswege in nicht adhären, humanen Ovarialkarzinomzellen, wie sie auch flottierend als Zellcluster in Aszites vorkommen, auswirkt.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Reuning, die als Basis für die vorliegende Arbeit dienten, zeigten, dass sowohl die Integrin Transmembrandomänen als auch die zytoplasmatischen Domänen entscheidend an der allosterischen Feinregulation im Zuge der Integrinaktivierung beteiligt sind. Eine Integrin $\alpha\beta3$ -Mutante mit dissoziierter TMD (TMD-GpA-I) zeigte eine gesteigerte bidirektionale Signaltransduktion, wohingegen eine Integrin-Mutante mit dimerisierter TMD (TMD-GpA) einen intermediären Aktivierungszustand annimmt, wie er nach dem *inside-out* aber vor dem *outside-in signaling* postuliert wird. Außerdem scheint zur vollen Integrinaktivierung die Ruptur der zytoplasmatischen Salzbrücke notwendig zu sein (Müller et al., 2013, Müller et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit zeigten nicht-adhären Ovarialkarzinomzellen, die die Integrin $\alpha\beta3$ -Mutante mit der dissoziierten TMD (TMD-GpA-I) exprimieren, eine verminderte Apoptoserate, was mit der beobachteten konstitutiven Aktivierung dieses Integrins einhergeht. Im Gegensatz dazu zeigten Zelltransfektanten, die die dimerisierte Integrin $\alpha\beta3$ -Mutante TMD-GpA exprimieren, die eine niedrige

Ligandenbindungsaffinität und einen Verlust der Signaltransduktionskapazität aufweist, die höchste Rate an apoptotischen Zellen. Es kommt den Integrin Transmembrandomänen im Zuge ihrer konformationellen Umlagerungen während der Integrinaktivierung also auch bezüglich der Regulation des Zellüberlebens eine wichtige Rolle zu. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch die zytoplasmatischen Domänen der Integrinuntereinheiten das tumorzellbiologische Verhalten beeinflussen. Wurde die Ausbildung einer Salzbrücke in entsprechenden Mutationen aufgehoben, so wirkte sich dies auch auf das Apoptoseverhalten der Karzinomzellen entscheidend aus; die Ovarialkarzinomzellen, bei denen das Integrin $\alpha\beta 3$ keine Salzbrücke ausbildete, zeigten eine größere Fähigkeit zum Hinauszögern der Apoptose. Auch wenn zusätzliche Kontakte zwischen den zytoplasmatischen Domänen nicht ausgeschlossen werden können, scheinen diese in der hochaffinen Integrinkonformation aufgrund der zu großen Distanz zwischen den zytoplasmatischen Untereinheiten eher eine geringe Rolle zu spielen. Die zytoplasmatischen Domänen könnten, neben den Transmembrandomänen, Zielorte für zukünftige therapeutische Angriffspunkte werden.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der bidirektionalen Integrin-vermittelten Signaltransduktion	3
Abbildung 2: Die Integrinstruktur am Beispiel des Integrins $\alpha\beta3$	5
Abbildung 3: Schema der Integrin-Transmembrandomänen und einer putativen Salzbrücke zwischen den zytoplasmatischen Domänen beider Untereinheiten.....	8
Abbildung 4: Ovarialkarzinomzellen in Aszites bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom	12
Abbildung 5: Auslösen der Apoptose via des intrinsischen und extrinsischen Signalwegs	14
Abbildung 6: Integrin-vermittelte intrazelluläre Signalkaskaden	17
Abbildung 7: Integrin $\alpha\beta3$ /c-Src-vermittelte Signaltransduktion als Mediator verankerungs-unabhängigen Zellwachstums	20
Abbildung 8: Der NF- κ B Signaltransduktionsweg.....	21
Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Integrin $\alpha\beta3$ -Mutanten	25
Abbildung 9: Prinzip der Detektion apoptotischer Zellen durch Bindung von Annexin-V-Fluos an Phosphatidylserin	33
Abbildung 10: Diskriminierung der Zellviabilität im Durchflusszytometer mittels Annexin-V-Fluos-Bindung.....	34
Abbildung 11: Untersuchung des Einflusses der Integrin $\alpha\beta3$ TMD-Domänen auf das Nekroseverhalten humaner kultivierter OV-MZ-6-Zellen mittels Annexin-V-Fluos Apoptoseassay	38
Abbildung 12: Untersuchung des Einflusses der Integrin $\alpha\beta3$ TMD-Domänen auf das Apoptoseverhalten humaner kultivierter OV-MZ-6-Zellen mittels Annexin-V-Fluos Apoptoseassay	40
Abbildung 13: Einfluss des FCS-Deprivation auf frühe Apoptoseereignisse suspendierter OV-MZ-6-Zellen, die die verschiedenen Integrin $\alpha\beta3$ TMD-Mutanten exprimieren	42
Abbildung 14: Nachweis von Caspasenspaltprodukten des CKs 18 als Nachweis später Apoptoseereignisse mittels FACS-Analyse in stabil transfizierten OV-MZ-6-Zellen	43
Abbildung 15: Untersuchung des Einflusses der Integrin $\alpha\beta3$ -Aktivierung als Funktion der Ausbildung einer zytoplasmatischen Salzbrücke auf das Nekroseverhalten	

suspendierter OV-MZ-6-Zellen mittels Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und PI	45
Abbildung 16: Untersuchung des Einflusses der Integrin $\alpha\beta 3$ Aktivierung in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Salzbrücke auf das Apoptoseverhalten suspendierter OV-MZ-6-Zellen mittels Doppelfärbung mit Annexin-V-Fluos und PI	47
Abbildung 17: Nachweis von Caspasenspaltprodukt CK 18 als Nachweis später Apoptoseereignisse mittels FACS-Analyse in stabil transfizierten, suspendierten OV-MZ-6-Zellen	49
Abbildung 18: Aktivierung von Rel Transkriptionsfaktoren als Funktion der Integrin $\alpha\beta 3$ -TMD.....	51
Abbildung 19: Aktivierung von Rel Transkriptionsfaktoren als Funktion der Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung in Abhängigkeit von der Ausbildung einer zytoplasmatischen Salzbrücke	52

6 Literaturverzeichnis

6.1 Zeitschriftenartikel

- ADAIR, B. D. & YEAGER, M. 2002. Three-dimensional model of the human platelet integrin alpha IIb beta 3 based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14059-64.
- ALMEIDA, E. A., ILIC, D., HAN, Q., HAUCK, C. R., JIN, F., KAWAKATSU, H., SCHLAEPFER, D. D. & DAMSKY, C. H. 2000. Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Cell Biol*, 149, 741-54.
- ANDREE, H. A., REUTELINGSPERGER, C. P., HAUPTMANN, R., HEMKER, H. C., HERMENS, W. T. & WILLEMS, G. M. 1990. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem*, 265, 4923-8.
- ANTHIS, N. J. & CAMPBELL, I. D. 2011. The tail of integrin activation. *Trends Biochem Sci*, 36, 191-8.
- AOUDJIT, F. & VUORI, K. 2001. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*, 20, 4995-5004.
- ASKARI, J. A., BUCKLEY, P. A., MOULD, A. P. & HUMPHRIES, M. J. 2009. Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci*, 122, 165-70.
- AURELIAN, L. 2005. Cross talk of signaling and apoptotic cascades in the CNS: target for virus modulation. *Front Biosci*, 10, 2776-87.
- BANKHEAD, C. R., KEHOE, S. T. & AUSTOKER, J. 2005. Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. *BJOG*, 112, 857-65.
- BAO, W. & STROMBLAD, S. 2004. Integrin alphav-mediated inactivation of p53 controls a MEK1-dependent melanoma cell survival pathway in three-dimensional collagen. *J Cell Biol*, 167, 745-56.
- BASSERES, D. S. & BALDWIN, A. S. 2006. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*, 25, 6817-30.
- BERAL, V., DOLL, R., HERMON, C., PETO, R. & REEVES, G. 2008. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet*, 371, 303-14.
- BOETTIGER, D., HUBER, F., LYNCH, L. & BLYSTONE, S. 2001. Activation of alpha(v)beta3-vitronectin binding is a multistage process in which increases in

- bond strength are dependent on Y747 and Y759 in the cytoplasmic domain of beta3. *Mol Biol Cell*, 12, 1227-37.
- BRASSARD, D. L., MAXWELL, E., MALKOWSKI, M., NAGABHUSHAN, T. L., KUMAR, C. C. & ARMSTRONG, L. 1999. Integrin alpha(v)beta(3)-mediated activation of apoptosis. *Exp Cell Res*, 251, 33-45.
- BROOKS, P. C., MONTGOMERY, A. M., ROSENFELD, M., REISFELD, R. A., HU, T., KLIER, G. & CHERESH, D. A. 1994. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 79, 1157-64.
- BURGES, A. & SCHMALFELDT, B. 2011. Ovarian cancer: diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int*, 108, 635-41.
- BUYS, S. S., PARTRIDGE, E., BLACK, A., JOHNSON, C. C., LAMERATO, L., ISAACS, C., REDING, D. J., GREENLEE, R. T., YOKOCHI, L. A., KESSEL, B., CRAWFORD, E. D., CHURCH, T. R., ANDRIOLE, G. L., WEISSFELD, J. L., FOUAD, M. N., CHIA, D., O'BRIEN, B., RAGARD, L. R., CLAPP, J. D., RATHMELL, J. M., RILEY, T. L., HARTGE, P., PINSKY, P. F., ZHU, C. S., IZMIRLIAN, G., KRAMER, B. S., MILLER, A. B., XU, J. L., PROROK, P. C., GOHAGAN, J. K. & BERG, C. D. 2011. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 305, 2295-303.
- CALALB, M. B., POLTE, T. R. & HANKS, S. K. 1995. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*, 15, 954-63.
- CALALB, M. B., ZHANG, X., POLTE, T. R. & HANKS, S. K. 1996. Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src. *Biochem Biophys Res Commun*, 228, 662-8.
- CALDERWOOD, D. A. 2004. Integrin activation. *J Cell Sci*, 117, 657-66.
- CARREIRAS, F., DENOUX, Y., STAEDL, C., LEHMANN, M., SICHEL, F. & GAUDUCHON, P. 1996. Expression and localization of alpha v integrins and their ligand vitronectin in normal ovarian epithelium and in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 62, 260-7.
- CAULIN, C., SALVESEN, G. S. & OSHIMA, R. G. 1997. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol*, 138, 1379-94.
- CUI, S., BA, M., TANG, Y., LIU, J., WU, Y., WANG, B., ZHANG, X., TANG, H. & ZHONG, S. 2012. B ultrasound-guided hyperthermic intraperitoneal perfusion chemotherapy for the treatment of malignant ascites. *Oncol Rep*, 28, 1325-31.
- DANEN, E. H., VAN KRAATS, A. A., CORNELISSEN, I. M., RUITER, D. J. & VAN MUIJEN, G. N. 1996. Integrin beta 3 cDNA transfection into a highly metastatic alpha v beta 3-negative human melanoma cell line inhibits invasion and experimental metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*, 226, 75-81.

- DANIAL, N. N. & KORSMEYER, S. J. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*, 116, 205-19.
- DEREGOWSKI, V., DELHALLE, S., BENOIT, V., BOURS, V. & MERVILLE, M. P. 2002. Identification of cytokine-induced nuclear factor-kappaB target genes in ovarian and breast cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 64, 873-81.
- DESGROSELLIER, J. S., BARNES, L. A., SHIELDS, D. J., HUANG, M., LAU, S. K., PREVOST, N., TARIN, D., SHATTIL, S. J. & CHERESH, D. A. 2009. An integrin alpha(v)beta(3)-c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nat Med*, 15, 1163-9.
- DESGROSELLIER, J. S. & CHERESH, D. A. 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, 10, 9-22.
- DUMMLER, B. & HEMMING, B. A. 2007. Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem Soc Trans*, 35, 231-5.
- DUTTA, J., FAN, Y., GUPTA, N., FAN, G. & GELINAS, C. 2006. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene*, 25, 6800-16.
- FAN, Y., DUTTA, J., GUPTA, N., FAN, G. & GELINAS, C. 2008. Regulation of programmed cell death by NF-kappaB and its role in tumorigenesis and therapy. *Adv Exp Med Biol*, 615, 223-50.
- FELDING-HABERMANN, B. 2003. Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 20, 203-13.
- FELDING-HABERMANN, B., O'TOOLE, T. E., SMITH, J. W., FRANSVEA, E., RUGGERI, Z. M., GINSBERG, M. H., HUGHES, P. E., PAMPORI, N., SHATTIL, S. J., SAVEN, A. & MUELLER, B. M. 2001. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1853-8.
- FRANKEL, A., ROSEN, K., FILMUS, J. & KERBEL, R. S. 2001. Induction of anoikis and suppression of human ovarian tumor growth in vivo by down-regulation of Bcl-X(L). *Cancer Res*, 61, 4837-41.
- FRISCH, S. M. & FRANCIS, H. 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 124, 619-26.
- FRISCH, S. M., VUORI, K., RUOSLAHTI, E. & CHAN-HUI, P. Y. 1996. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol*, 134, 793-9.
- FULLARD, N., WILSON, C. L. & OAKLEY, F. 2012. Roles of c-Rel signalling in inflammation and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 851-60.
- GERONDAKIS, S., FULFORD, T. S., MESSINA, N. L. & GRUMONT, R. J. 2014. NF-kappaB control of T cell development. *Nat Immunol*, 15, 15-25.

- GHEVAERT, C., SALSMANN, A., WATKINS, N. A., SCHAFFNER-RECKINGER, E., RANKIN, A., GARNER, S. F., STEPHENS, J., SMITH, G. A., DEBILI, N., VAINCHENKER, W., DE GROOT, P. G., HUNTINGTON, J. A., LAFFAN, M., KIEFFER, N. & OUWEHAND, W. H. 2008. A nonsynonymous SNP in the ITGB3 gene disrupts the conserved membrane-proximal cytoplasmic salt bridge in the α IIb β 3 integrin and cosegregates dominantly with abnormal proplatelet formation and macrothrombocytopenia. *Blood*, 111, 3407-14.
- GIANCOTTI, F. G. & MAINIERO, F. 1994. Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1198, 47-64.
- GIANCOTTI, F. G. & RUOSLAHTI, E. 1990. Elevated levels of the α 5 β 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell*, 60, 849-59.
- GILMORE, T. D. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25, 6680-4.
- GOFF, B. A. 2012. Ovarian cancer: screening and early detection. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 39, 183-94.
- GOLSTEIN, P. & KROEMER, G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 32, 37-43.
- GOODMAN, S. L., HOLZEMANN, G., SULYOK, G. A. & KESSLER, H. 2002. Nanomolar small molecule inhibitors for α v β 6, α v β 5, and α v β 3 integrins. *J Med Chem*, 45, 1045-51.
- GOTTSCHALK, K. E. 2005. A coiled-coil structure of the α IIb β 3 integrin transmembrane and cytoplasmic domains in its resting state. *Structure*, 13, 703-12.
- GOTTSCHALK, K. E., GUNTHER, R. & KESSLER, H. 2002. A three-state mechanism of integrin activation and signal transduction for integrin α (v) β (3). *ChemBiochem*, 3, 470-3.
- GUO, W. & GIANCOTTI, F. G. 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 816-26.
- HAN, L. Y., LANDEN, C. N., TREVINO, J. G., HALDER, J., LIN, Y. G., KAMAT, A. A., KIM, T. J., MERRITT, W. M., COLEMAN, R. L., GERSHENSON, D. M., SHAKESPEARE, W. C., WANG, Y., SUNDARAMOORTH, R., METCALF, C. A., 3RD, DALGARNO, D. C., SAWYER, T. K., GALLICK, G. E. & SOOD, A. K. 2006. Antiangiogenic and antitumor effects of SRC inhibition in ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 66, 8633-9.
- HANTGAN, R. R., PAUMI, C., ROCCO, M. & WEISEL, J. W. 1999. Effects of ligand-mimetic peptides Arg-Gly-Asp-X (X = Phe, Trp, Ser) on α IIb β 3 integrin conformation and oligomerization. *Biochemistry*, 38, 14461-74.
- HAPKE, S., KESSLER, H., LUBER, B., BENGE, A., HUTZLER, P., HOFER, H., SCHMITT, M. & REUNING, U. 2003. Ovarian cancer cell proliferation and

- motility is induced by engagement of integrin $\alpha(v)\beta3$ /Vitronectin interaction. *Biol Chem*, 384, 1073-83.
- HERSEY, P., SOSMAN, J., O'DAY, S., RICHARDS, J., BEDIKIAN, A., GONZALEZ, R., SHARFMAN, W., WEBER, R., LOGAN, T., BUZOIANU, M., HAMMERSHAIMB, L., KIRKWOOD, J. M. & ETARACIZUMAB MELANOMA STUDY, G. 2010. A randomized phase 2 study of etaracizumab, a monoclonal antibody against integrin $\alpha(v)\beta3$, + or - dacarbazine in patients with stage IV metastatic melanoma. *Cancer*, 116, 1526-34.
- HIGGINS, K. A., PEREZ, J. R., COLEMAN, T. A., DORSHKIND, K., MCCOMAS, W. A., SARMIENTO, U. M., ROSEN, C. A. & NARAYANAN, R. 1993. Antisense inhibition of the p65 subunit of NF-kappa B blocks tumorigenicity and causes tumor regression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 9901-5.
- HOEFLING, M., KESSLER, H. & GOTTSCHALK, K. E. 2009. The transmembrane structure of integrin $\alpha5\beta3$: significance for signal transduction. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48, 6590-3.
- HOOD, J. D. & CHERESH, D. A. 2002. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*, 2, 91-100.
- HOSOTANI, R., KAWAGUCHI, M., MASUI, T., KOSHIBA, T., IDA, J., FUJIMOTO, K., WADA, M., DOI, R. & IMAMURA, M. 2002. Expression of integrin $\alpha V\beta3$ in pancreatic carcinoma: relation to MMP-2 activation and lymph node metastasis. *Pancreas*, 25, e30-5.
- HU, P. & LUO, B. H. 2013. Integrin bi-directional signaling across the plasma membrane. *J Cell Physiol*, 228, 306-12.
- HUGHES, P. E., DIAZ-GONZALEZ, F., LEONG, L., WU, C., MCDONALD, J. A., SHATTIL, S. J. & GINSBERG, M. H. 1996. Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem*, 271, 6571-4.
- HUGHES, P. E., O'TOOLE, T. E., YLANNE, J., SHATTIL, S. J. & GINSBERG, M. H. 1995. The conserved membrane-proximal region of an integrin cytoplasmic domain specifies ligand binding affinity. *J Biol Chem*, 270, 12411-7.
- HUMPHRIES, J. D., BYRON, A. & HUMPHRIES, M. J. 2006. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*, 119, 3901-3.
- HUNGERFORD, J. E., COMPTON, M. T., MATTER, M. L., HOFFSTROM, B. G. & OTEY, C. A. 1996. Inhibition of pp125FAK in cultured fibroblasts results in apoptosis. *J Cell Biol*, 135, 1383-90.
- HYNES, R. O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 48, 549-54.
- HYNES, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25.

- HYNES, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673-87.
- IMAI, Y., PARK, E. J., PEER, D., PEIXOTO, A., CHENG, G., VON ANDRIAN, U. H., CARMAN, C. V. & SHIMAOKA, M. 2008. Genetic perturbation of the putative cytoplasmic membrane-proximal salt bridge aberrantly activates alpha(4) integrins. *Blood*, 112, 5007-15.
- ISHIZAWAR, R. & PARSONS, S. J. 2004. c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell*, 6, 209-14.
- JIA, J., STARODUB, A., CUSHMAN, I., LIU, Y., MARSHALL, D. J., HURWITZ, H. I. & NIXON, A. B. 2013. Dual inhibition of alphaV integrins and Src kinase activity as a combination therapy strategy for colorectal cancer. *Anticancer Drugs*, 24, 237-50.
- KANAMORI, M., VANDEN BERG, S. R., BERGERS, G., BERGER, M. S. & PIEPER, R. O. 2004. Integrin beta3 overexpression suppresses tumor growth in a human model of gliomagenesis: implications for the role of beta3 overexpression in glioblastoma multiforme. *Cancer Res*, 64, 2751-8.
- KARIN, M. 2006. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, 441, 431-6.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- KIM, C., YE, F. & GINSBERG, M. H. 2011. Regulation of integrin activation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 321-45.
- KIM, M., CARMAN, C. V. & SPRINGER, T. A. 2003. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science*, 301, 1720-5.
- KULKARNI, G. V. & MCCULLOCH, C. A. 1994. Serum deprivation induces apoptotic cell death in a subset of Balb/c 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci*, 107 (Pt 5), 1169-79.
- KUMAR, C. C. 2003. Integrin alpha v beta 3 as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis. *Curr Drug Targets*, 4, 123-31.
- KUWANA, T., MACKEY, M. R., PERKINS, G., ELLISMAN, M. H., LATTERICH, M., SCHNEITER, R., GREEN, D. R. & NEWMAYER, D. D. 2002. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 111, 331-42.
- LANDEN, C. N., KIM, T. J., LIN, Y. G., MERRITT, W. M., KAMAT, A. A., HAN, L. Y., SPANNUTH, W. A., NICK, A. M., JENNNINGS, N. B., KINCH, M. S., TICE, D. & SOOD, A. K. 2008. Tumor-selective response to antibody-mediated targeting of alphavbeta3 integrin in ovarian cancer. *Neoplasia*, 10, 1259-67.

- LAU, T. L., KIM, C., GINSBERG, M. H. & ULMER, T. S. 2009. The structure of the integrin $\alpha 5 \beta 3$ transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *EMBO J*, 28, 1351-61.
- LEERS, M. P., KOLGEN, W., BJORKLUND, V., BERGMAN, T., TRIBBICK, G., PERSSON, B., BJORKLUND, P., RAMAEKERS, F. C., BJORKLUND, B., NAP, M., JORNVALL, H. & SCHUTTE, B. 1999. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol*, 187, 567-72.
- LEMMON, M. A., FLANAGAN, J. M., HUNT, J. F., ADAIR, B. D., BORMANN, B. J., DEMPSEY, C. E. & ENGELMAN, D. M. 1992. Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices. *J Biol Chem*, 267, 7683-9.
- LI, R., MITRA, N., GRATKOWSKI, H., VILAIRE, G., LITVINOV, R., NAGASAMI, C., WEISEL, J. W., LEAR, J. D., DEGRADO, W. F. & BENNETT, J. S. 2003. Activation of integrin $\alpha 5 \beta 3$ by modulation of transmembrane helix associations. *Science*, 300, 795-8.
- LIAPIS, H., ADLER, L. M., WICK, M. R. & RADER, J. S. 1997. Expression of $\alpha (v) \beta 3$ integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas. *Hum Pathol*, 28, 443-9.
- LIN, Y., BAI, L., CHEN, W. & XU, S. 2010. The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 14, 45-55.
- LUO, B. H., CARMAN, C. V. & SPRINGER, T. A. 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*, 25, 619-47.
- LUO, B. H., SPRINGER, T. A. & TAKAGI, J. 2004. A specific interface between integrin transmembrane helices and affinity for ligand. *PLoS Biol*, 2, e153.
- MATTER, M. L. & RUOSLAHTI, E. 2001. A signaling pathway from the $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha (v) \beta 3$ integrins that elevates bcl-2 transcription. *J Biol Chem*, 276, 27757-63.
- MENON, U. 2012. Ovarian cancer screening has no effect on disease-specific mortality. *Evid Based Med*, 17, 47-8.
- MEREDITH, J. E., JR., FAZELI, B. & SCHWARTZ, M. A. 1993. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell*, 4, 953-61.
- MÖBUS, V., GERHARZ, C. D., PRESS, U., MOLL, R., BECK, T., MELLIN, W., POLLOW, K., KNAPSTEIN, P. G. & KREIENBERG, R. 1992. Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, 52, 76-84.
- MULLAUER, L., GRUBER, P., SEBINGER, D., BUCH, J., WOHLFART, S. & CHOTT, A. 2001. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res*, 488, 211-31.

- MÜLLER, M. A., BRUNIE, L., BACHER, A. S., KESSLER, H., GOTTSCHALK, K. E. & REUNING, U. 2014. Cytoplasmic salt bridge formation in integrin α v β 3 stabilizes its inactive state affecting integrin-mediated cell biological effects. *Cell Signal*, 26, 2493-503.
- MÜLLER, M. A., OPFER, J., BRUNIE, L., VOLKHARDT, L. A., SINNER, E. K., BOETTIGER, D., BOCHEN, A., KESSLER, H., GOTTSCHALK, K. E. & REUNING, U. 2013. The glycoporphin A transmembrane sequence within integrin α v β 3 creates a non-signaling integrin with low basal affinity that is strongly adhesive under force. *J Mol Biol*, 425, 2988-3006.
- MURPHY, J. F., BORDET, J. C., WYLER, B., RISSOAN, M. C., CHOMARAT, P., DEFRANCE, T., MIOSSEC, P. & MCGREGOR, J. L. 1994. The vitronectin receptor (α v β 3) is implicated, in cooperation with P-selectin and platelet-activating factor, in the adhesion of monocytes to activated endothelial cells. *Biochem J*, 304 (Pt 2), 537-42.
- NABORS, L. B., FINK, K. L., MIKKELSEN, T., GRUJICIC, D., TARNAWSKI, R., NAM DO, H., MAZURKIEWICZ, M., SALACZ, M., ASHBY, L., ZAGONEL, V., DEPENNI, R., PERRY, J. R., HICKING, C., PICARD, M., HEGI, M. E., LHERMITTE, B. & REARDON, D. A. 2015. Two cilengitide regimens in combination with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma and unmethylated MGMT gene promoter: results of the open-label, controlled, randomized phase II CORE study. *Neuro Oncol*, 17, 708-17.
- NIP, J., SHIBATA, H., LOSKUTOFF, D. J., CHERESH, D. A. & BRODT, P. 1992. Human melanoma cells derived from lymphatic metastases use integrin α v β 3 to adhere to lymph node vitronectin. *J Clin Invest*, 90, 1406-13.
- O'TOOLE, T. E., KATAGIRI, Y., FAULL, R. J., PETER, K., TAMURA, R., QUARANTA, V., LOFTUS, J. C., SHATTIL, S. J. & GINSBERG, M. H. 1994. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol*, 124, 1047-59.
- OWENS, L. V., XU, L., CRAVEN, R. J., DENT, G. A., WEINER, T. M., KORNBERG, L., LIU, E. T. & CANCE, W. G. 1995. Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res*, 55, 2752-5.
- PARSONS, J. T. 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*, 116, 1409-16.
- PARTRIDGE, A. W., LIU, S., KIM, S., BOWIE, J. U. & GINSBERG, M. H. 2005. Transmembrane domain helix packing stabilizes integrin α 5 β 3 in the low affinity state. *J Biol Chem*, 280, 7294-300.
- PERKINS, N. D. 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 49-62.
- PETITCLERC, E., STROMBLAD, S., VON SCHALSCHA, T. L., MITJANS, F., PIULATS, J., MONTGOMERY, A. M., CHERESH, D. A. & BROOKS, P. C. 1999. Integrin α (v) β 3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res*, 59, 2724-30.

- PLAYFORD, M. P. & SCHALLER, M. D. 2004. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene*, 23, 7928-46.
- PYTELA, R., PIERSCHBACHER, M. D. & RUOSLAHTI, E. 1985. A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 5766-70.
- REED, J. C. 2002. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov*, 1, 111-21.
- REUNING, U. 2011. Integrin alphavbeta3 promotes vitronectin gene expression in human ovarian cancer cells by implicating rel transcription factors. *J Cell Biochem*, 112, 1909-19.
- ROBERT KOCH-INSTITUT. 2015. Krebs in Deutschland 2011/2012. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 10. Ausgabe, 90-93.
- RUOSLAHTI, E. 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12, 697-715.
- SAAD, A. F., HU, W. & SOOD, A. K. 2010. Microenvironment and pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Horm Cancer*, 1, 277-90.
- SCATENA, M., ALMEIDA, M., CHAISSON, M. L., FAUSTO, N., NICOSIA, R. F. & GIACHELLI, C. M. 1998. NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol*, 141, 1083-93.
- SCHALLER, M. D., HILDEBRAND, J. D., SHANNON, J. D., FOX, J. W., VINES, R. R. & PARSONS, J. T. 1994. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol*, 14, 1680-8.
- SCHLAEPFER, D. D., HANKS, S. K., HUNTER, T. & VAN DER GEER, P. 1994. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, 372, 786-91.
- SENES, A., ENGEL, D. E. & DEGRADO, W. F. 2004. Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol*, 14, 465-79.
- SHATTIL, S. J., KIM, C. & GINSBERG, M. H. 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 288-300.
- SIMPSON, C. D., ANYIWE, K. & SCHIMMER, A. D. 2008. Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett*, 272, 177-85.
- SLACK, J. K., ADAMS, R. B., ROVIN, J. D., BISSONETTE, E. A., STOKER, C. E. & PARSONS, J. T. 2001. Alterations in the focal adhesion kinase/Src signal transduction pathway correlate with increased migratory capacity of prostate carcinoma cells. *Oncogene*, 20, 1152-63.

- SOKOLOSKI, J. A., SARTORELLI, A. C., ROSEN, C. A. & NARAYANAN, R. 1993. Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B block CD11b expression and alter adhesion properties of differentiated HL-60 granulocytes. *Blood*, 82, 625-32.
- SONODA, Y., MATSUMOTO, Y., FUNAKOSHI, M., YAMAMOTO, D., HANKS, S. K. & KASAHARA, T. 2000. Anti-apoptotic role of focal adhesion kinase (FAK). Induction of inhibitor-of-apoptosis proteins and apoptosis suppression by the overexpression of FAK in a human leukemic cell line, HL-60. *J Biol Chem*, 275, 16309-15.
- STUPACK, D. G., PUENTE, X. S., BOUTSABOULOY, S., STORGARD, C. M. & CHERESH, D. A. 2001. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol*, 155, 459-70.
- STUPACK, D. G., TEITZ, T., POTTER, M. D., MIKOLON, D., HOUGHTON, P. J., KIDD, V. J., LAHTI, J. M. & CHERESH, D. A. 2006. Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature*, 439, 95-9.
- STUPP, R., HEGI, M. E., GORLIA, T., ERRIDGE, S. C., PERRY, J., HONG, Y. K., ALDAPE, K. D., LHERMITTE, B., PIETSCH, T., GRUJICIC, D., STEINBACH, J. P., WICK, W., TARNAWSKI, R., NAM, D. H., HAU, P., WEYERBROCK, A., TAPHOORN, M. J., SHEN, C. C., RAO, N., THURZO, L., HERRLINGER, U., GUPTA, T., KORTMANN, R. D., ADAMSKA, K., MCBAIN, C., BRANDES, A. A., TONN, J. C., SCHNELL, O., WIEGEL, T., KIM, C. Y., NABORS, L. B., REARDON, D. A., VAN DEN BENT, M. J., HICKING, C., MARKIVSKYY, A., PICARD, M., WELLER, M., EUROPEAN ORGANISATION FOR, R., TREATMENT OF, C., CANADIAN BRAIN TUMOR, C. & TEAM, C. S. 2014. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 15, 1100-8.
- TADOKORO, S., SHATTIL, S. J., ETO, K., TAI, V., LIDDINGTON, R. C., DE PEREDA, J. M., GINSBERG, M. H. & CALDERWOOD, D. A. 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science*, 302, 103-6.
- TAKAGI, J., PETRE, B. M., WALZ, T. & SPRINGER, T. A. 2002. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, 110, 599-11.
- TAMKUN, J. W., DESIMONE, D. W., FONDA, D., PATEL, R. S., BUCK, C., HORWITZ, A. F. & HYNES, R. O. 1986. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell*, 46, 271-82.
- THOMPSON, C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-62.
- THORNBERRY, N. A. & LAZEBNIK, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281, 1312-6.

- VAN DER FLIER, A. & SONNENBERG, A. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*, 305, 285-98.
- VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H. & REUTELINGSPERGER, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184, 39-51.
- VINOGRADOVA, O., VELYVIS, A., VELYVIENE, A., HU, B., HAAS, T., PLOW, E. & QIN, J. 2002. A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell*, 110, 587-97.
- WALSH, C. S. & KARLAN, B. Y. 2007. Contemporary progress in ovarian cancer screening. *Curr Oncol Rep*, 9, 485-93.
- WANG, D., GRAMMER, J. R., COBBS, C. S., STEWART, J. E., JR., LIU, Z., RHODEN, R., HECKER, T. P., DING, Q. & GLADSON, C. L. 2000. p125 focal adhesion kinase promotes malignant astrocytoma cell proliferation in vivo. *J Cell Sci*, 113 Pt 23, 4221-30.
- WEGENER, K. L. & CAMPBELL, I. D. 2008. Transmembrane and cytoplasmic domains in integrin activation and protein-protein interactions (review). *Mol Membr Biol*, 25, 376-87.
- WEIS, S. M. & CHERESH, D. A. 2011a. alphaV Integrins in Angiogenesis and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1, a006478.
- WEIS, S. M. & CHERESH, D. A. 2011b. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*, 17, 1359-70.
- XIAO, T., TAKAGI, J., COLLIER, B. S., WANG, J. H. & SPRINGER, T. A. 2004. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature*, 432, 59-67.
- XIONG, J. P., STEHLE, T., DIEFENBACH, B., ZHANG, R., DUNKER, R., SCOTT, D. L., JOACHIMIAK, A., GOODMAN, S. L. & ARNAOUT, M. A. 2001. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science*, 294, 339-45.
- YAWATA, A., ADACHI, M., OKUDA, H., NAISHIRO, Y., TAKAMURA, T., HAREYAMA, M., TAKAYAMA, S., REED, J. C. & IMAI, K. 1998. Prolonged cell survival enhances peritoneal dissemination of gastric cancer cells. *Oncogene*, 16, 2681-6.
- YEBRA, M., FILARDO, E. J., BAYNA, E. M., KAWAHARA, E., BECKER, J. C. & CHERESH, D. A. 1995. Induction of carcinoma cell migration on vitronectin by NF-kappa B-dependent gene expression. *Mol Biol Cell*, 6, 841-50.
- ZANETTI, A., CONFORTI, G., HESS, S., MARTIN-PADURA, I., GHIBAUDI, E., PREISSNER, K. T. & DEJANA, E. 1994. Clustering of vitronectin and RGD peptides on microspheres leads to engagement of integrins on the luminal aspect of endothelial cell membrane. *Blood*, 84, 1116-23.

- ZHANG, L. & ZOU, W. 2015. Inhibition of integrin beta1 decreases the malignancy of ovarian cancer cells and potentiates anticancer therapy via the FAK/STAT1 signaling pathway. *Mol Med Rep*, 12, 7869-76.
- ZHAO, H., ROSS, F. P. & TEITELBAUM, S. L. 2005. Unoccupied alpha(v)beta3 integrin regulates osteoclast apoptosis by transmitting a positive death signal. *Mol Endocrinol*, 19, 771-80.
- ZHU, J., LUO, B. H., BARTH, P., SCHONBRUN, J., BAKER, D. & SPRINGER, T. A. 2009. The structure of a receptor with two associating transmembrane domains on the cell surface: integrin alpha11beta3. *Mol Cell*, 34, 234-49.
- ZONG, W. X. & THOMPSON, C. B. 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*, 20, 1-15.

6.2 Internetquellen

Universität de Fribourg/ Faculté des Sciences/ Médecine. Integrin signaling.
(<http://www.unifr.ch/pathology/en/background/tumorangiogenesis>). Stand 16.04.2017.

Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kits, Principle of the Assay
(<http://www.abgabs.com/pdf2/KA1001.pdf>). Stand 16.04.2017.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Ute Reuning für die Überlassung des Promotionsthemas, die intensive Betreuung mit steter Erreichbarkeit und für die geduldige Unterstützung über den gesamten Zeitraum meiner Arbeit, sowie für die Korrektur meiner Dissertationsschrift.

Herrn Prof. Manfred Schmitt danke ich für die Möglichkeit meine Arbeit in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik, Klinikum Rechts der Isar, durchführen zu dürfen.

Frau Anke Benge möchte ich ganz herzlich danken für die kompetente und schnelle praktische Einarbeitung und für viele kurzweilige Stunden zusammen im Labor.

Frau Dr. rer. nat. Martina Müller danke ich für die Überlassung der Integrin-Mutanten sowie für den fachlichen und menschlichen Austausch, die kollegiale Zusammenarbeit und die Motivation.

Allen Mitarbeitern der Klinischen Forschung der Frauenklinik möchte ich für die gute Zusammenarbeit und jegliche Hilfe danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, Berta und Franz Bächer, bedanken, die mir Studium und Promotion ermöglicht haben, für ihre endlose Geduld und die fortwährende Unterstützung.