

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie des
Klinikum rechts der Isar der Technische Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Molls)

Untersuchungen zur Rolle von Integrin-gebundener Kinase
(ILK) und Zelladhäsion für die zelluläre Strahlenantwort und
die pharmakologische Inhibition des epidermalen
Wachstumsfaktorrezeptors

Iris Eke

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. N. Cordes
2. Univ.-Prof. Dr. M. Molls
3. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher

Die Dissertation wurde am 01.02.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.04.2008 angenommen.

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
2	Grundlagen	12
2.1	Extrazelluläre Matrix	12
2.2	Integrine	14
2.2.1	ILK, integrin linked kinase	17
2.2.2	FAK, focal adhesion kinase	23
2.3	ErbB-Rezeptoren	27
3	Material	34
3.1	Zelllinien	34
3.2	Medium	35
3.3	Geräte und Hilfsmittel	36
3.3.1	Zellkultur	36
3.3.2	Transfektion	36
3.3.3	Bestrahlung	36
3.3.4	Integrinoberflächenmessung und Adhäsionsassay	36
3.3.5	Koloniebildungsassay	37
3.3.6	Western-Blot	37
3.3.7	ILK Kinase Assay	37
3.3.8	Immunfluoreszenz	37
3.3.9	Zellzyklus-Analyse	38
3.4	Reagenzien	38
3.4.1	Zellkultur und Transfektion	38
3.4.2	Integrinoberflächenmessung und Adhäsionsassay	39
3.4.3	Koloniebildungsassay	39
3.4.4	Western Blot	39
3.4.5	ILK Kinase Assay	43
3.4.6	Immunfluoreszenz	44
3.4.7	Zellzyklus-Analyse	44

3.5	Rezeptorliganden	44
3.6	Inhibitoren	44
3.7	Antikörper	45
3.7.1	Primärantikörper	45
3.7.2	Sekundärantikörper	46
4	Methoden	47
4.1	Zellkultur	47
4.1.1	Subkultivierung	47
4.1.2	Einfrieren	47
4.1.3	Auftauen	47
4.2	Transfektion	47
4.2.1	Ermittlung der optimalen G418-Konzentration	47
4.2.2	Ermittlung der optimalen Zellzahl	48
4.2.3	Restriktion des Plasmids	48
4.2.4	Elektroporation und Genklonierung	48
4.2.5	Selektion der transfizierten Zellen	48
4.2.6	Klonisolierung	48
4.3	Bestrahlung	49
4.4	Integrinoberflächenmessung	49
4.4.1	Ansatz	49
4.4.2	Messung	49
4.4.3	Auswertung	49
4.5	Adhäsionsassay	50
4.5.1	Ansatz	50
4.5.2	Immunfluoreszenz	50
4.5.3	Western-Blot	50
4.5.4	Koloniebildungsassay	50
4.6	Koloniebildungsassay	51
4.6.1	Ansatz	51
4.6.2	Fixierung	52
4.6.3	Auswertung	53
4.7	Western Blot	53
4.7.1	Ansatz	53
4.7.2	Proteinextraktion	54
4.7.3	Proteinbestimmung	54

4.7.4	SDS-Gelelektrophorese und Proteintransfer	55
4.7.5	Detektion	55
4.7.6	Auswertung	56
4.8	ILK Kinase Assay	56
4.8.1	Ansatz	56
4.8.2	ILK Immunpräzipitation	56
4.8.3	Kinase Assay	57
4.8.4	Western Blot und Detektion	57
4.9	Immunfluoreszenz	57
4.9.1	Ansatz	57
4.9.2	Fixierung	57
4.9.3	Färbung	57
4.9.4	Bildaquisition	58
4.10	Wachstumskurve	58
4.10.1	Ansatz	58
4.10.2	Zählung	58
4.10.3	Auswertung	59
4.11	Zellzyklus-Analyse	59
4.11.1	Ansatz	59
4.11.2	Fixierung	59
4.11.3	Messung	59
4.11.4	Auswertung	60
4.12	Statistik	60
5	Ergebnisse	61
5.1	In Suspension zeigen murine Fibroblasten eine verstärkte Oberflächenexpression von β_1 - und α_5 -Integrinen	61
5.2	ILK ^{-/-} Zellen weisen einen Zellausbreitungsdefekt und eine gestörte Organisation des Aktinzytoskeletts auf	62
5.3	PI3K-Inhibition moduliert AKT-, GSK3 β - und FAK-Phosphorylierung	63
5.4	Adhäsion an Fibronectin moduliert in Abhängigkeit von ILK und PI3K das Überleben nach Bestrahlung	66
5.5	Adhäsion an EZM reduziert den Einfluss von ILK auf die Strahlensensibilität	67
5.6	ILK sensibilisiert FaDu-Zellen gegenüber ionisierender Strahlung	69
5.7	ILK-Expression beeinflusst EGF-Rezeptor, FAK, GSK3 β und AKT in murinen Fibroblasten	70

5.8	BIBX inhibiert dosisabhängig die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors	72
5.9	EGF-Rezeptor TK-Inhibition beeinflusst weder Zellüberleben noch Proliferation von murinen Fibroblasten	73
5.10	BIBX inhibiert AKT- und MAPK-Phosphorylierung in FaDu-Zellen	76
5.11	BIBX führt in FaDu-Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Proliferation aber nicht des Überlebens	77
5.12	Fibronektin verbessert ILK-abhängig Überleben und Proliferation	80
5.13	BIBX moduliert den Effekt von Fibronektin auf Überleben und Proliferation in FaDu-Zellen	82
5.14	EGF-Rezeptor TK-Inhibition führt zur Akkumulation von G1-Phase Zellen	84
5.15	BIBX-Exposition besitzt einen Langzeit-Effekt auf die Proteinphosphorylierung	85
5.16	BIBX reduziert die Zellgröße und steigert die E-Cadherin Expression in FaDu-ILK-Transfektanten	87
6	Diskussion	89
7	Zusammenfassung	97
	Tabellenverzeichnis	98
	Abbildungsverzeichnis	99
	Literaturverzeichnis	101
	Danksagung	127

Abkürzungen

<i>AKT</i>	<i>engl.</i> v-akt (AKR transforming) murine thymoma viral oncogene
<i>ANOVA</i>	<i>engl.</i> analysis of variance
<i>APS</i>	Ammonium Persulfat
<i>BCA</i>	Bicinchoninsäure Assay
<i>Bcl-2</i>	B-Zell Lymphom Protein-2
<i>BSA</i>	bovines Serumalbumin
<i>CAM-RR</i>	<i>engl.</i> cell adhesion mediated radioresistance
<i>Cas</i>	Crk assoziiertes Substrat
<i>CDK</i>	<i>engl.</i> cyclin dependent kinase
<i>cDNA</i>	<i>engl.</i> complementary DNA
<i>CH</i>	Calponin-Homologie
<i>Cre</i>	<i>engl.</i> cyclization recombination
<i>Cys</i>	Cystein
<i>DAG</i>	Diacylglycerol
<i>DMEM</i>	<i>engl.</i> Dulbecco's modified Eagle medium
<i>DOCK180</i>	dedicator of cytokinesis, 180 kDa protein downstream of CRK
<i>EDTA</i>	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EGF</i>	epidermaler Wachstumsfaktor
<i>ELISA</i>	<i>engl.</i> enzyme linked immunosorbent assay
<i>ErbB</i>	<i>engl.</i> erythroblastic leukaemia viral (v-erb-b) oncogene homologue, avian
<i>EZM</i>	extrazelluläre Matrix
<i>FA</i>	fokale Adhäsionen
<i>FAK</i>	fokale Adhäsionskinase
<i>FAT</i>	<i>engl.</i> focal adhesion targeting
<i>FERM</i>	Protein 4.1 Ezrin Radixin Moesin
<i>FITC</i>	Fluoreszeinisothiocyant
<i>FCS</i>	<i>engl.</i> fetal calf serum
<i>FN</i>	Fibronektin

Inhaltsverzeichnis

<i>GDP</i>	Guanosin-5-diphosphat
<i>Grb</i>	<i>engl.</i> growth factor receptor-bound protein
<i>GSK</i>	Glykogen Synthase Kinase
<i>GTP</i>	Guanosin-5'-triphosphat
<i>Gy</i>	Gray
<i>His</i>	Histidin
<i>HRP</i>	<i>engl.</i> horseradish peroxidase
<i>IF</i>	Immunfluoreszenz
<i>ILK</i>	<i>engl.</i> integrin linked kinase
<i>ILKAP</i>	ILK assoziierte Phosphatase
<i>IP₃</i>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
<i>IPP</i>	ILK-Pinch-Parvin
<i>IRS</i>	Insulin Rezeptor Substrat
<i>JNK</i>	Jun N-terminale Kinase
<i>Lar</i>	<i>engl.</i> leukocyte common related antigen
<i>Lef</i>	<i>engl.</i> lymphoid enhancer-binding factor
<i>LIM</i>	Lin-1, Isl-1, Mec-3
<i>LoxP</i>	<i>engl.</i> Locus of Crossover
<i>MAPK</i>	Mitogen aktivierte Proteinkinase
<i>MBq</i>	Megabecquerel
<i>MEM</i>	Minimum essentielles Medium
<i>MMP</i>	Matrix Metalloproteinase
<i>MW</i>	Molekulargewicht
<i>Nck-2</i>	<i>engl.</i> non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2
<i>NEA</i>	nichtessentielle Aminosäuren
<i>Neo-TK</i>	Neomycin Resistenz und Herpes Thymidinkinase
<i>NMR</i>	<i>engl.</i> nuclear magnetic resonance
<i>NRG</i>	Neuregulin
<i>p53BP</i>	p53 bindendes Protein
<i>PAGE</i>	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
<i>PAK</i>	p21-aktivierte Kinase
<i>PBS</i>	<i>engl.</i> phosphate buffered saline
<i>PDGF</i>	<i>engl.</i> platlet derived growth factor receptor
<i>PDK</i>	Phosphoinositol-abhängige Kinase
<i>PFA</i>	Paraformaldehyd
<i>PH</i>	Pleckstrin-Homologie

<i>PI3K</i>	Phosphatidylinositol 3-kinase
<i>Pinch</i>	<i>engl.</i> particularly interesting new cys-his protein
<i>PIP₂</i>	Phosphotidylinositol 4,5-Bisphosphat
<i>PIP₃</i>	Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat
<i>PIX</i>	PAK interaktiver Austausch-Faktor
<i>PKB</i>	Proteinkinase B
<i>PLC</i>	Phospholipase C
<i>PML</i>	Progressive multifokale Leukoenzephalopathie
<i>PTEN</i>	<i>engl.</i> phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
<i>Ras</i>	<i>engl.</i> rat sarcoma
<i>RNA</i>	<i>engl.</i> ribonucleic acid
<i>rpm</i>	<i>engl.</i> rounds per minute
<i>RTK</i>	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
<i>T</i>	Threonin
<i>S</i>	Serin
<i>SAPK</i>	stressaktivierte Proteinkinase
<i>SFK</i>	Src family kinases
<i>SH2</i>	Src Homologie 2
<i>SH3</i>	Src Homologie 3
<i>Shc</i>	<i>engl.</i> Src homology collagen-like protein
<i>Src</i>	<i>engl.</i> Src homology domain containing phosphatase-2
<i>siRNA</i>	<i>engl.</i> small interfering RNA
<i>STAT3</i>	<i>engl.</i> signal transducer and activator of transcription 3
<i>TGF</i>	<i>engl.</i> transforming growth factor
<i>TK</i>	Tyrosin-Kinase
<i>TRITC</i>	Tetramethyl Rhodamin iso-Thiocyanat
<i>VEGFR</i>	<i>engl.</i> vascular endothelial growth factor receptor
<i>XIAP</i>	<i>engl.</i> X-linked inhibitor of apoptosis
<i>Y</i>	Tyrosin

1 Einleitung

Tumorerkrankungen zählen heute bei der immer älter werdenden Bevölkerung zusammen mit Herz-Kreislaufkrankungen zu den häufigsten Todesursachen und die Inzidenz ist weiterhin ansteigend. Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts in Berlin konnten die Überlebensraten von einigen Malignomen jedoch deutlich gesteigert werden, was zum einen der verbesserten Früherkennung zum anderen einer Optimierung der Behandlung zu verdanken ist.

Zu den klassischen Therapiemaßnahmen gehören, neben der operativen Entfernung des Tumors, die Bestrahlung sowie die systemische Zytostatikaapplikation. In den letzten Jahren führte das Wissen über zellbiologische Zusammenhänge bei der Entstehung von malignen Erkrankungen zur Entwicklung von weiteren zielgerichteten Therapieansätzen (Molecular Targeting). Die Idee hierbei ist, die molekularen Unterschiede zwischen neoplastischen Zellen und Normalgewebe zu nutzen, um so eine spezifische Sensibilisierung des Tumors zu erreichen. Bis heute ließen sich bereits zahlreiche Erfolge verbuchen. Der Tyrosin-Kinase-Inhibitor Imatinib (Glivec) revolutionierte die Therapie der chronisch myeloischen Leukämie und erzielte auch bei der Behandlung von gastrointestinalen Stromatumoren ermutigende Ergebnisse. Cetuximab (Erbix) und Trastuzumab (Herceptin), als Antikörper gegen die in vielen Karzinomen überexprimierten ErbB-Rezeptoren, fanden Eingang in standardisierte Therapieschemata.

Trotz dieser Erfolge zeigen viele Substanzen bei klinischer Anwendung eine geringere Wirksamkeit, als sich durch *in vitro* Experimente vermuten lässt. Ein Grund hierfür ist, dass die Sensibilität von Zellen gegenüber genotoxischen Einflüssen entscheidend von der Beschaffenheit des zellulären Mikromilieus beeinflusst zu werden scheint. So führt zum Beispiel ein geringer Sauerstoffgehalt im Tumorgewebe zu einer Zunahme der Strahlenresistenz. Auch die extrazellulären Matrixproteine, wie Kollagen und Fibronectin, welche *in vivo* die Zellen umgeben, spielen eine große Rolle für das Zellüberleben [46, 44]. Diese Proteine sind nicht nur für die Stabilität des Gewebes wichtig, sondern interagieren auch mit Oberflächenrezeptoren der Zellen, den sogenannten Integrinen, wodurch verschiedene das Überleben und die Tumorprogression fördernde Signalkaskaden aktiviert werden.

Ein zentrales Molekül bei der Übermittlung dieser durch Integrine vermittelten Zell-

Matrix-Interaktionen ist die «integrin linked kinase» (Integrin-gebundene Kinase, ILK), welche an die zytoplasmatischen Domäne von β_1 -, β_2 - und β_3 -Integrinuntereinheiten bindet [90]. Da eine Vielzahl von Tumoren, darunter kolorektales Karzinom [24, 25], Ovarialkarzinom [3] und malignes Melanom [48] eine Überexpression von ILK zeigen und ILK außerdem die zelluläre Strahlensensibilität und die Proliferation von Tumorzellen beeinflusst, scheint diese Proteinkinase als potentiell Zielmolekül bei der Therapie maligner Erkrankungen von großer Relevanz zu sein.

Neben der Interaktion mit Integrinen besitzt ILK auch eine Verbindung zu verschiedenen Wachstumsfaktorrezeptoren, wie dem «epidermal-growth-factor-receptor» (EGF-Rezeptor). Wie durch Cetuximab als humanisierten Antikörper bereits vielfach gezeigt, ist dieser zu den Tyrosin-Kinasen (TK) gehörende Rezeptor für die Tumorthherapie von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurden spezifische Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TK-Inhibitoren) gegen die Kinase-Domäne des EGF-Rezeptors entwickelt. Trotz der guten *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse bei dem Einsatz dieser Substanzen in Monotherapie sowie in Kombination mit Bestrahlung oder Zytostatikaapplikation [75, 122, 11], kommt es bei klinischer Anwendung zu einer Resistenzentwicklung von Tumorzellen, welche die Effektivität der TK-Inhibitoren beeinträchtigt. Möglicherweise spielen hierbei Integrine und nachgeschaltete Proteine wie ILK eine entscheidende Rolle.

Auf der Basis dieser Erkenntnisse wurde in dieser Arbeit die Funktion von ILK sowie der Effekt von Zelladhäsion an Fibronectin auf die Radiosensibilität muriner Fibroblasten und humaner Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs ohne und mit EGF-Rezeptor TK-Inhibition *in vitro* untersucht. In Zellkulturmodellen sollte auf molekularer Ebene geklärt werden, welchen Einfluss Zell-Matrix-Interaktionen auf die Wirksamkeit des potenten EGF-Rezeptor TK-Inhibitors BIBX1382BS haben.

2 Grundlagen

2.1 Extrazelluläre Matrix

Bestehende und erworbene Resistenzen von Tumoren gegen genotoxische Einflüsse, wie ionisierende Strahlen oder zytotoxische Medikamente sind ein weitverbreitetes, klinisch äußerst relevantes Phänomen. Untersuchungen haben ergeben, dass hierbei Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (EZM) eine wichtige Rolle spielen.

Unter der EZM versteht man die Gesamtheit der Makromoleküle, die sich im Zellzwischenraum befindet. Sie bildet nicht nur ein mechanisches Gerüst und gewährleistet so die strukturelle Integrität von Geweben und letztlich des Gesamtorganismus, sondern ist auch für das Mikromilieu der Einzelzelle, also für Faktoren wie Wasseranteil, Ionenkonzentrationen, Nährstoffe und Signalmoleküle verantwortlich. Zwischen der EZM und den Zellen besteht eine wechselseitige Beziehung. Während durch das Mikromilieu und Zell-Matrix-Kontakt verschiedene essentielle Vorgänge wie Differenzierung, Zellzyklusprogression, Migration, Adhäsion und Überleben der Zellen moduliert werden, verändern diese durch Sezernierung von Matrixproteinen die Beschaffenheit der EZM.

Hinsichtlich der Makromoleküle unterscheidet man zwischen Faserproteinen wie Kollagen, Laminin oder Elastin, die der EZM eine mechanische Stabilität verleihen sowie den Proteoglykanen und Hyaluronsäure, die aufgrund ihres sehr hohen Hydratisierungsgrades für die gelartige Beschaffenheit der EZM wichtig sind. Fibronektin, ein aus zwei sehr ähnlichen Polypeptiduntereinheiten bestehendes dimeres Protein, stellt eine Verbindung zwischen den Matrixstrukturproteinen und den in der EZM eingebetteten Zellen her, und spielt somit eine entscheidende Rolle für die EZM-Zell-Interaktion. Versuche an Fibronektin-defizienten Mäusen zeigen, dass der Verlust dieses Proteins bereits in der frühen Embryonalperiode zum Tod führt [76].

Klinisch ist die EZM bei einer Vielzahl von Krankheiten von Bedeutung. So ist beispielsweise die Erkrankung Osteogenesis imperfecta, auch bekannt als Glasknochenkrankheit, durch eine Störung in der Prokollagen-I-Synthese charakterisiert. Während die milden meist heterozygoten Ausprägungsformen mit quantitativ reduziertem aber normalem Kollagen-I einhergehen, kommt es bei Mutationen, die zu einem strukturellen Defekt in einer der Proteinketten führen, zu schweren, oft schon perinatal letalen Verlaufsformen

mit intrauterinen Knochenfrakturen und intrakraniellen Hämorrhagien [178].

Beim Ehlers-Danlos-Syndrom, einer Gruppe hereditärer Erkrankungen, liegt eine Reduktion und gestörte Architektur von Kollagenfaser-Bündeln vor. Je nach dem welcher Kollagentyp betroffen ist, kommt es zu verschiedenen dominierenden Krankheitssymptomen. So ist der klassische Typ mit Defekt von Kollagen-V überwiegend durch starke Dehnbarkeit der Haut und Hypermobilität der Gelenke geprägt. Dagegen führt eine Mutation im *Kollagen-III*-Gen zu Fragilität von Arterien und inneren Organen mit der Gefahr einer Ruptur großer Gefäße und gastrointestinaler Perforationen [73].

Doch auch für Tumorerkrankungen spielt die EZM eine wichtige Rolle. Zum einen stellt sie eine Barriere für ungehemmtes Wachstum dar und beeinflusst so sowohl Zellinvasion, als auch Metastasierung. Zum anderen moduliert sie die zelluläre Resistenz gegenüber genotoxischen Einflüsse wie Chemotherapeutika oder ionisierenden Strahlen. So besitzen viele klinisch verwendeten Zytostatika eine geringere Wirksamkeit, wenn die Zellen an Matrixproteinen adhären sind. Kleinzellige Bronchialkarzinomzellen zeigen in Matrigel genauso wie auf Laminin eine verminderte Zytotoxizität gegenüber Etoposid, Cisplatin und Doxorubicin [72], während auf Fibronectin wachsende Pankreaskarzinom-, Glioblastom-, Bronchialkarzinom- und Melanomzellen unabhängig von Differenzierungsgrad und Ursprungsgewebe eine reduzierte Radiosensibilität aufweisen [44]. Auch in Kolon-, Ovarial- [146], Mamma- [148], Gehirn- [222] und Lebertumoren [247] wurden vermehrt Therapieresistenzen durch Integrin vermittelte Adhäsion an EZM-Proteine gefunden. Interessanterweise zeigen auch an Fibronectin gebundene Leukämiezellen nach Bestrahlung [50, 99] sowie nach Fludarabin-Exposition [53] eine verminderte Apoptoserate.

Untersuchungen zur Identifizierung der zugrundeliegenden Mechanismen erbrachten eine Vielzahl von potentiellen Proteinen, die für diese klinisch relevanten Effekte verantwortlich sein könnten, darunter insbesondere Integrine und Integrin-Signalmediatoren wie ILK, FAK, p53, Proteinkinase $B\alpha$ /AKT (AKT) oder B-Zell Lymphom Protein-2 (Bcl-2) [94, 46, 39, 40, 115, 52]. Aufgrund der großen Anzahl von Integrinrezeptoren, der komplexen intrazellulären Vernetzung und der Kooperation von Integrin- und Wachstumsfaktorrezeptorsignalwegen, lässt sich eine Integrin vermittelte Modifikation aller wichtigen Signalwege für die zelluläre Antwort auf genotoxischen Stress vermuten. Die Integrin-Expression und -Signalgebung wie auch die EZM-Zusammensetzung scheinen wiederum von der Tumor-Stroma-Interaktion beeinflusst zu werden. So weist schnell wachsendes neoplastisches Gewebe eine hohe Umbildungsrate der EZM innerhalb und in unmittelbarer Umgebung des Tumors auf [234, 188], wobei auch die massive Freisetzung von Wachstumsfaktoren sowie die Neovaskularisation für die Resistenzentwicklung von

Malignomen gegenüber Therapiemaßnahmen von Bedeutung sein könnten.

2.2 Integrine

Wichtige Rezeptoren bei der bidirektionalen Vermittlung von Informationen zwischen EZM und Zelle stellen die Integrine dar. Diese großen transmembranösen Glykoproteine bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit mit jeweils einem extrazellulären, transmembranösen und intrazellulären Anteil. Bis heute wurden 18 verschiedene α - und 8 verschiedene β -Untereinheiten identifiziert. Abhängig von der Kombination besitzen die Heterodimere unterschiedliche Affinität zu den einzelnen EZM-Proteinen, wie z.B. Fibronektin, Laminin oder Kollagen (siehe Abb. 2.1).

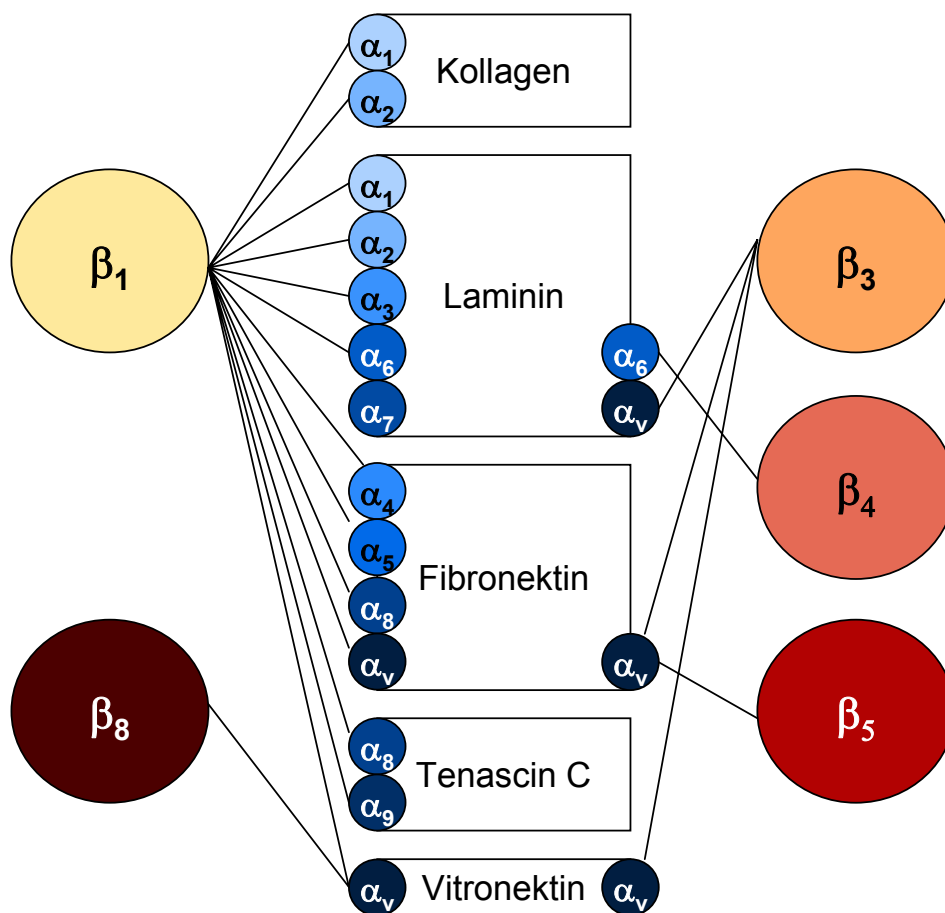


Abbildung 2.1: Übersicht über die verschiedenen Integrin-Heterodimere mit den entsprechenden EZM-Substraten

Der aminoterminal gelegene «Kopf» des Integrins setzt sich aus der «Propeller»-Sequenz der α -Untereinheit und der β A-Domäne der β -Untereinheit zusammen und

enthält die Region, die für die Ligandenbindung wichtig ist (siehe Abb. 2.2).

Bei der α -Untereinheit folgen drei hauptsächlich β -Faltblatt-Strukturen beinhaltende Domänen: Tigh, Calf-1 und Calf-2. Während die Untereinheiten Calf-1 und Calf-2 eine starre Einheit bilden, ermöglicht die Verbindung zwischen Calf-1 und Tigh die Bewegung der Domänen gegeneinander und wird ihrer Funktion nach «Genu» (Knie) genannt. Dagegen schließen sich bei der β -Untereinheit 4 auch im epidermalen Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF) vorkommende Sequenzen (I-EGF-1 bis 4) und die β -Tail-Domäne (β TD) an. Diesem extrazellulären Anteil folgen ein im Vergleich dazu kleiner transmembranöser und intrazellulärer Abschnitt.

Aufgrund seiner Struktur ist der Integrinrezeptor in der Lage die Affinität zum Liganden zu variieren («inside-out signaling») [109], indem er durch Konformationsänderung einen aktiven, gestreckten [232] oder einen inaktiven, zusammengeklappten [208] Zustand einnehmen kann (siehe Abb. 2.2). Umgekehrt werden bei Bindung an das Substrat verschiedene Signalwege innerhalb der Zelle aktiviert («outside-in signaling»), so dass der Informationsaustausch in beide Richtungen erfolgen kann. Da Integrine selbst keine katalytische Aktivität besitzen, bedienen sie sich verschiedener Adaptermoleküle und Proteinkinasen zur Signalübermittlung. Zusammen mit Wachstumsfaktor-Rezeptoren bilden sich an der Zellmembran Multi-Protein-Komplexe, die aufgrund ihrer Funktion und ihrer Lokalisation «fokale Adhäsionen» genannt werden.

Integrine erfüllen ein breites Aufgabenspektrum und sind essentiell für eine Reihe von vitalen Zellvorgängen.

So interagieren sie mit Proteinen des Zytoskeletts und beeinflussen auf diese Weise Zellausbreitung und Migration. Sowohl das an Aktin bindende Talin [28], als auch Filamin, welches wiederum über die p21-aktivierte Kinase (PAK) die Dynamik des Zytoskeletts moduliert [223], stehen im direkten Kontakt mit den β -Integrinuntereinheiten [173] und scheinen zusätzlich noch für die Lokalisierung der Integrine an der Membran verantwortlich zu sein [135].

Bei der Invasion spielt die β -Untereinheit ebenfalls eine entscheidende Rolle, wobei Versuche an verschiedenen Zelllinien gezeigt haben, dass hierfür ihre Verbindung zu den EZM-spaltenden Matrix-Metallo-Proteinasen von Bedeutung ist [43, 66].

Die Fähigkeit zur Metastasierung, neben der Invasivität ein weiteres Maligritätskriterium von Tumoren, wird ebenfalls von der Integrinfunktion beeinflusst. Verlässt eine Zelle ihre Umgebung, so ändert sich die Zusammensetzung der EZM. Eine hierdurch verminderte Aktivierung der Integrinrezeptoren führt zu einer Rekrutierung von Caspase-8, wodurch Apoptose ausgelöst und die abberante Migration unterbunden wird (Integrin vermittelter Zelltod). Dieser Mechanismus und die Gewebsspezifität des EZM-Musters

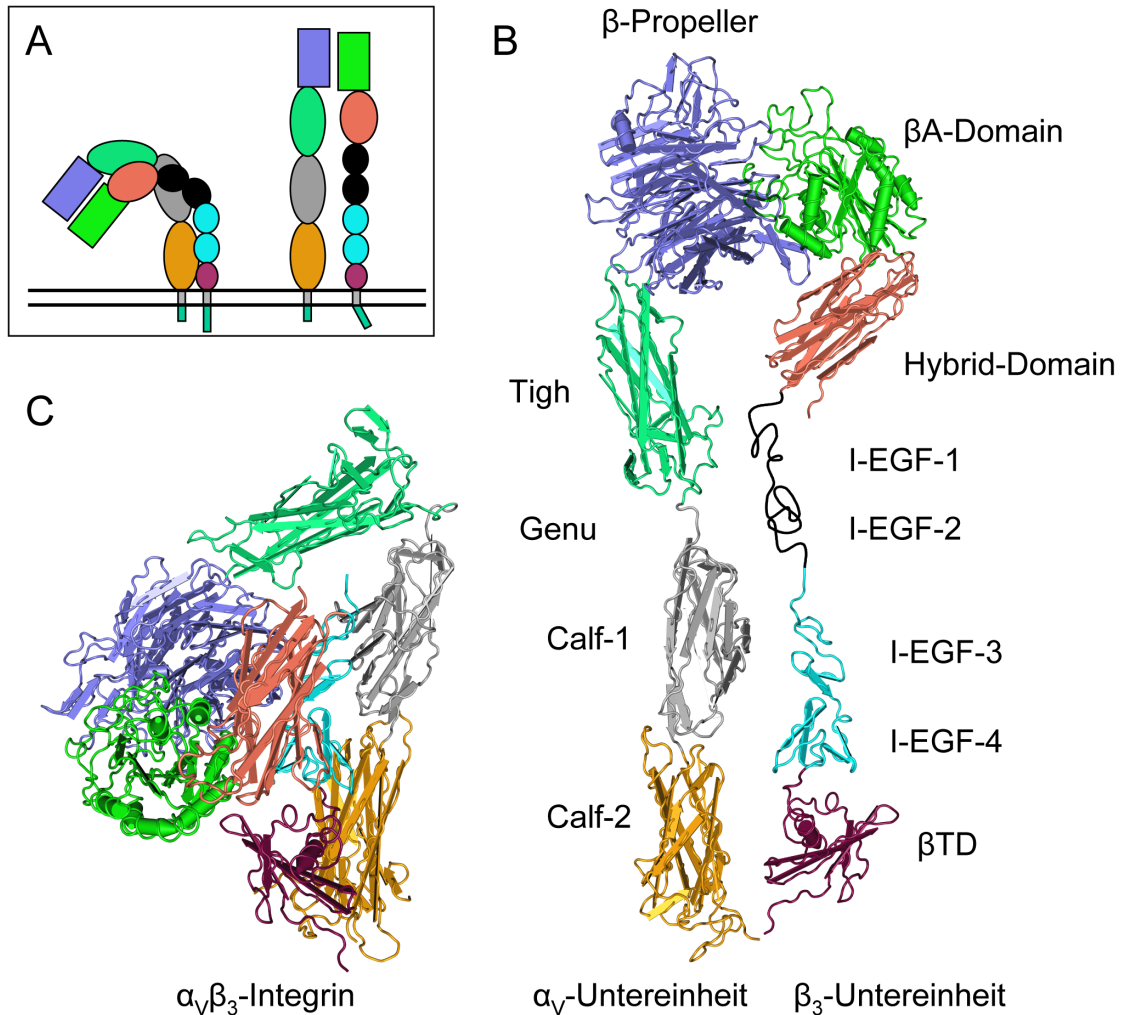


Abbildung 2.2: Struktur des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins: A ist eine schematische Darstellung der beiden Untereinheiten. B zeigt den aktiven Zustand des Integrinrezeptors, der sich durch Rotation der Domänen gegeneinander ergibt. [236]. C zeigt den inaktiven Zustand. Der «Kopf» des Integrins ist für die Ligandenbindung zuständig. Er besteht aus der Propeller-Sequenz der α -Untereinheit (dunkelblau) und der β A-Domäne der β -Untereinheit (hellgrün). Das «Genu» der α -Untereinheit zwischen der Tigh-Region (mintgrün) und Calf-1 (grau) ist wichtig für die Konformationsänderung vom inaktiven in den aktiven Zustand. Bei der β -Untereinheit ist die dreidimensionale Struktur dieser für den Klappmechanismus relevanten Region aufgrund hoher Variabilität nicht ausreichend aufgelöst und entspricht hier nur einer Schätzung. (Struktur: PDB 1JV2, Software Cn3d, nach [236, 109])

könnten als Erklärung dafür dienen, dass manche Tumoren nur in bestimmte Organe metastasieren [101, 204].

Integrine stehen möglicherweise auch mit einer erhöhten Resistenz von malignen Erkrankungen gegenüber therapeutischen Maßnahmen in Verbindung. $\alpha_5\beta_1$ -Integrin scheint als Antagonist gegen Zelltod nach Doxorubicin- oder Melphalan-Exposition in multiplen Myelomzellen zu fungieren [95], wobei dieser Effekt ebenfalls bei Mammatumoren nach Paclitaxel [4] und bei nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen nach Cisplatin- oder Mitomycin C-Behandlung [41] beobachtet wurde. Studien an murinen GD25 Fibroblasten deuten auf die wichtige regulatorische Funktion von β_1 -Integrinen für die zelluläre Strahlenantwort [195, 45] hin. Bei Bindung an die EZM-Proteine Fibronectin, Laminin und Kollagen-III wurde in Wildtyp- β_1 -Integrin exprimierenden Zellen die unter Entzug von Wachstumsfaktoren auf dem Kontrollsubstrat Poly-L-Lysin beobachtete Radiosensibilisierung aufgehoben. Dieser Effekt war in GD25 Fibroblasten, welche eine zytoplasmatisch mutierte Variante des Proteins besaßen, nicht nachzuweisen.

Nach Strahlenexposition zeigen humane Fibroblasten [44], Endothelzellen und Keratinozyten [147] sowie auch Zellen verschiedener Tumorentitäten [42, 43, 60, 198] ein verändertes Expressionsmuster bestimmter Integrinuntereinheiten, darunter β_1 -, β_3 - und α_5 -Integrin. Hallahan et al. nutzten die Induktion von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptoren nach Bestrahlung von Glioblastom- und Melanomzellen, um Radioisotope, welche an Integrinliganden gekoppelt waren, in die Zellen einzubringen und sie dadurch spezifisch zu schädigen [86]. Durch diese Methode könnte mit Hilfe von Integrinen eine lokale Wirkung von applizierten Zytostatika durch die Auswahl des Bestrahlungsfeldes erreicht werden. Interessanterweise lässt sich sowohl nach dreiwöchiger fraktionierter Radiotherapie, als auch nach Applikation von genotoxischen Substanzen wie Cisplatin und Cyclophosphamid eine Reduktion der Integrinexpression nachweisen [198].

Auch Differenzierung, Proliferation und Zellzyklus-Progression werden durch Integrine reguliert [1, 108, 45], wobei verschiedene Adapterproteine und assoziierte Kinasen wie ILK und FAK für die Signalwirkung von Bedeutung sind.

2.2.1 ILK, integrin linked kinase

Die «integrin linked kinase» wurde 1996 von Hannigan und Kollegen als Bindungspartner der zytoplasmatischen Domäne der β_1 -Integrinuntereinheit entdeckt [90]. In ihrer Position verbindet sie nicht nur den Integrinrezeptor mit dem Aktinzytoskelett und nimmt somit eine entscheidende Rolle bei der Signalübermittlung von der EZM in das Innere der Zelle ein, sondern interagiert auch direkt mit einer Reihe von Proteinen der fokalen Adhäsionen. Neben dieser Adapterfunktion besitzt ILK als Serin/Threonin-Kinase die Fähigkeit durch

Phosphorylierung anderer Signalmoleküle in wichtige Signalwege einzugreifen und so essentielle Zellvorgänge wie Überleben, Wachstum, Zellzyklus-Progression, Migration, Invasion und Angiogenese zu regulieren [88].

Analysen des menschlichen Genoms zeigen, dass nur ein ILK-Gen existiert, welches sich am distalen Ende des humanen Chromosoms 11p15,4/15,5 befindet [89]. Das translatierte Protein bestehend aus 452 Aminosäuren besitzt am aminoterminalen Ende vier Ankyrin-Repeats, eine zentrale Pleckstrin-Homologie-Domäne und carboxyterminal die katalytische Kinase-Einheit (siehe Abb. 2.3).

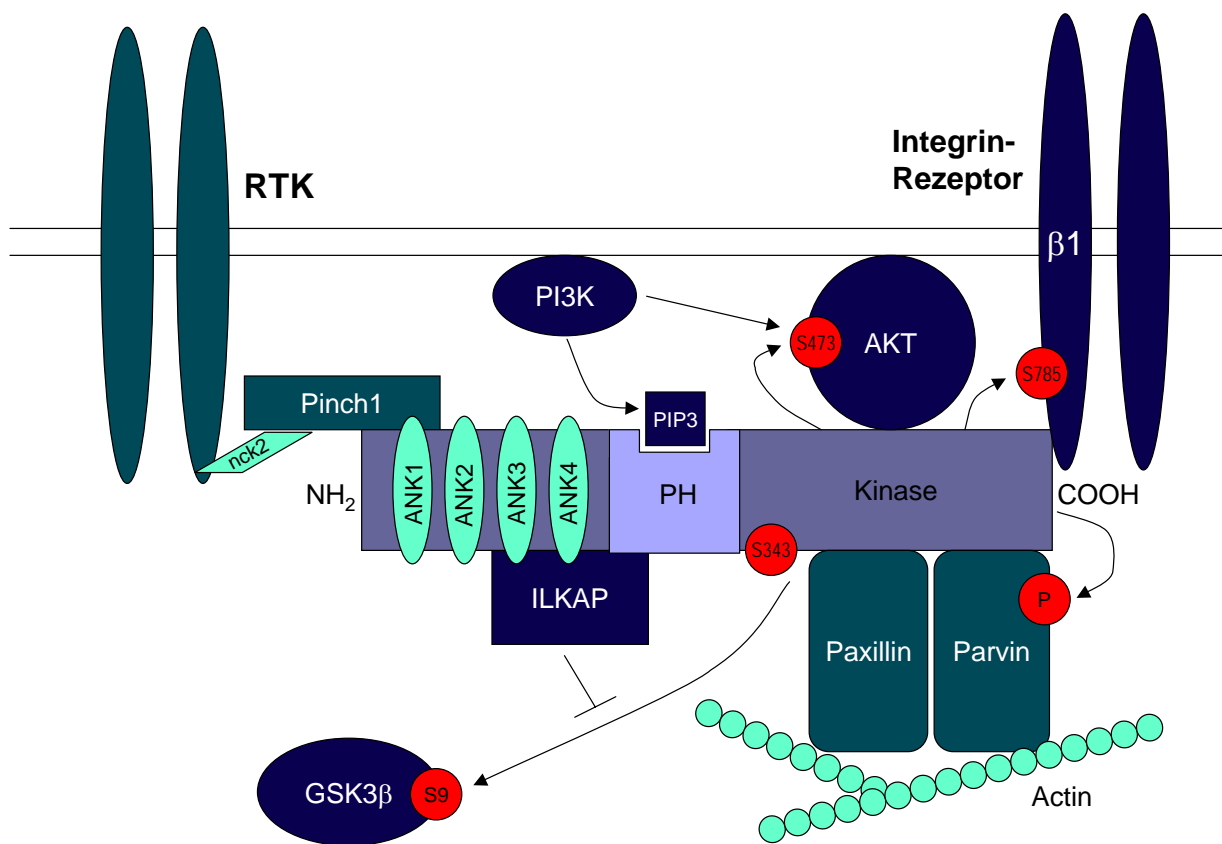


Abbildung 2.3: Übersicht ILK Struktur, Bindungspartner und potentielle Aminosäurereste, die durch die Kinasedomäne phosphoryliert werden. ILK beinhaltet 4 Ankyrin-Repeats (ANK 1-4), eine Pleckstrin-Homologie (PH) und die Kinase-Domäne. Die Ankyrin-Sequenz ist wichtig für die Verbindung über Pinch-1 zu Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) sowie für die Interaktion mit ILKAP, welche die Aktivität von ILK reduzieren kann. Die PH-Domäne ermöglicht die Bindung von PIP₃ und könnte so für eine PI3K-abhängige Regulation von ILK sprechen. Die Kinase-Einheit phosphoryliert *in vitro* sich selbst, AKT, β -Parvin, β ₁-Integrin und GSK3 β (rot). Inwieweit diese Interaktionen *in vivo* relevant sind, ist bis jetzt noch nicht ausreichend geklärt.

Ankyrin- und Pleckstrin-Homologie-Domäne

Ein Ankyrin-Repeat, benannt nach dem Protein Ankyrin, in dem 24 dieser Motive gefunden wurden [139], besteht aus 33 Aminosäuren, gefaltet in 2 antiparallel verlaufende α -Helices und in eine dazu rechtwinklig gerichtete β -Haarnadel-Region. Aufgrund dieser Anordnung ergibt sich eine L-förmige Struktur, welche in einer Reihe von Proteinen vorhanden ist und als bewegliches Gerüst für Protein-Protein-Interaktionen dient [152, 194].

Die Ankyrin-Domäne von ILK steht mit verschiedenen Signal- und Adapterproteinen wie Pinch-1 oder ILK assoziierter Phosphatase (ILKAP) in Verbindung.

Pinch-1 setzt sich aus 5 LIM-Domänen zusammen, wobei die erste mit ILK interagiert [224], während die vierte *in vitro* eine geringe Affinität zu dem Adapter Nck-2 besitzt, durch welchen auf diese Weise eventuell Integrin- und Wachstumsfaktor-Signalwege miteinander verknüpft werden. Ob diese Interaktion auch *in vivo* besteht, ist zur Zeit unklar. So zeigen Nck-2-defiziente Mäuse ein normales Erscheinungsbild, wohingegen ein Pinch-1-Knockout bereits bei Implantation zum Tod führt. Dies könnte darauf hinweisen, dass Nck-2 nicht essentiell für die Funktion von Pinch-1 ist [81]. Außer mit EGF- und PDGF-Rezeptor sowie IRS-1 ist Nck-2 auch mit den Aktin-Modulatoren DOCK180 [218] und der p21-aktivierten Kinase (PAK) [102] assoziiert, wodurch das Adapterprotein Einfluss auf die Dynamik des Zytoskeletts und somit auf Migration und Invasion nehmen könnte.

Mit ILKAP, einer Serin/Threonin-Phosphatase, wurde 2001 ein weiterer Bindungspartner von ILK identifiziert. Obwohl wenig über Wirkmechanismus und Zielproteine bekannt ist, scheint ILKAP als Inhibitor von EZM-stimulierter ILK-Signalwirkung zu fungieren [130, 123]. Während dieser Effekt durch Mutation der Phosphatase-Einheit aufgehoben werden kann, zeigt sich die Affinität von ILK und ILKAP unabhängig von der katalytischen Aktivität beider Partner [130]. Es wurde gezeigt, dass ILKAP auch den Zellzyklus modulieren kann, da durch ILKAP-Suppression mittels siRNA-Transfektion die Zellen vermehrt in die S-Phase eintreten. Dagegen führt eine Überexpression des Proteins zu reduziertem Wachstum von Prostata-Karzinom-Zellen, was vermuten lässt, dass ILKAP und damit auch ILK eine Rolle bei der Karzinomentstehung spielen [123].

Die Sequenzanalyse von ILK zeigt außerdem eine strukturelle Basis für eine Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) abhängige Regulation auf. So bilden das zentrale Verbindungsstück und das aminoternale Ende der Kinase-Einheit eine Domäne die Ähnlichkeit zu einer Pleckstrin-Homologie besitzt [81]. Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat (PIP₃) nicht aber Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) ist in der Lage die Kinaseaktivität

von gereinigter, rekombinanter ILK zu stimulieren. Außerdem zeigen Zellen mit konstitutiv aktiver PI3K eine verstärkte katalytische Aktivität von ILK, während PI3K-Inhibitoren diese abschwächen [54]. Die genauen Regulationsmechanismen von ILK durch PI3K sind bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Untersuchungen weisen aber darauf hin, dass die Akkumulation von PIP₃ an der Membran zur lokalen Rekrutierung miteinander interagierender Proteine darunter ILK, AKT und PI3K führt und dadurch verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden [215].

Antagonistisch zu PI3K agiert das «phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10» (PTEN), eine 3'Inositol-Lipidphosphatase, die PIP₃ zu PIP₂ dephosphorylieren kann. Mutationen von PTEN lassen sich in Tumoren von Prostata, Mamma und Gehirn, aber auch in hereditären Syndromen mit erhöhtem Risiko für maligne Entartung wie Morbus Cowden finden. In PTEN^{-/-} Glioblastomzellen ist eine vermehrte ILK-Aktivität nachweisbar, welche durch Transfektion mit PTEN inhibiert werden kann [161]. Reduktion der ILK-Expression mittels siRNA-Transfektion resultiert in einer Zunahme der Apoptose und verlangsamten Tumorstadium. Dies legt die Vermutung nahe, dass durch die Inhibition von ILK ein möglicher Therapieansatz für PTEN-mutierte Tumoren besteht [62].

Kinase-Domäne

Die carboxyterminal gelegene Kinase-Einheit beinhaltet neben der Bindungsregion für β_1 - und β_3 -Integrine, Paxillin, AKT, α - und β -Parvin [88] in ihrer Aktivierungsschleife den Serinrest 343 als mögliche Autophosphorylierungsstelle. Obwohl bis jetzt keine direkte Regulation der Aktivität durch Phosphorylierung von ILK nachgewiesen wurde, scheint diese Aminosäure wichtig für die Funktion der Kinase zu sein. So führt eine Mutation an Serin 343 zu Alanin, wodurch diese Stelle unphosphorylierbar wird, zur vollständigen Inhibition, während ein Austausch mit Aspartat die Kinase in eine konstitutiv aktive Form umwandelt [171].

Trotzdem ILK *in vitro* sich selbst und zahlreiche Proteine phosphorylieren kann, wurde ihre katalytische Funktion von einigen Autoren angezweifelt [140]. Ein Grund hierfür ist die Tatsache, dass bestimmte für Serin/Threonin-Kinasen als essentiell erachtete Aminosäuresequenzen in ILK verändert sind. In der Subdomäne I zum Beispiel stellt sich die präzise konservierte Abfolge GXGXXG bei ILK als NENHSG dar, während wiederum der für die ATP-Bindung wichtige Lysinrest zwischen Subdomäne I und II mit dem Aufbau anderer Serin/Threonin-Kinasen übereinstimmt [171]. Insgesamt überwiegen allerdings die Hinweise darauf, dass ILK nicht nur als Adapterprotein fungiert, sondern ihre katalytische Aktivität entscheidende Relevanz für die Signalwirkung besitzt [55].

Schon bei der Entdeckung von ILK zeigte sich, dass die Kinase nicht nur an die zytoplasmatische Domäne von β_1 -Integrin bindet, sondern diese auch *in vitro* an Serin 785 phosphorylieren kann [90]. Diese Phosphorylierung scheint zum Ausschluss von β_1 -Integrin aus den fokalen Adhäsionen und zu einer verminderten Interaktion mit anderen Proteinen zu führen, wodurch ILK als wichtiger Regulator von Integrin-Aktivität und -Signalwirkung in Betracht kommt [154].

GSK3 β wird von rekombinanter ILK phosphoryliert, wobei diese Phosphorylierung an Serin 9 die katalytische Aktivität der Kinase inhibiert. Hierdurch kommt es zur Reduktion von E-Cadherin und mittels Aktivierung von β -Catenin und den Transkriptionsfaktoren Lef1/Tcf [15] zu erhöhter Expression von Zellzyklus-Regulatoren wie den Cyclinen [159, 213]. Diese sind in der Lage «cyclin dependent kinases» (cyklinabhängige Kinase, CDK) zu binden und beeinflussen so DNA-Synthese und Mitogenese [74]. Die verminderte Synthese von E-Cadherin kann zum einen direkt durch den β -Catenin-Lef/Tcf-Komplex ausgelöst werden [159], zum anderen induziert ILK möglicherweise die Transkription des E-Cadherin-Repressors Snail [211, 9]. E-Cadherin wird als Vermittler von Zell-Zell-Interaktionen unter anderem auch deswegen eine wichtige Rolle bei der Transformation und Invasion zugeschrieben [155], da eine Mutation im Gen ein Risiko von 70 – 80 % beinhaltet, an einem diffusen Magenkarzinom zu erkranken [84]. Auch in Kolon-, Ovarial-, und Mamma-Karzinomen kann eine verminderte Aktivität von E-Cadherin nachgewiesen werden, wobei durch Wiederherstellung der Expression durch Transfektion mit E-Cadherin die Tumoren an Invasivität und Malignität verlieren [84].

Als weiteres mögliches Zielprotein von ILK wird AKT diskutiert, da Kopräzipitationsversuche gezeigt haben, dass in intakten Zellen beide Proteine einen Komplex bilden, wobei es zu einer Phosphorylierung von AKT kommt [171]. AKT ist ebenfalls wie ILK eine Serin/Threonin-Kinase, die sich unter anderem über Bad [51] und Caspase-9 [29] auf Apoptose, Überleben und Proliferation auswirkt. AKT wird in Abhängigkeit von PI3K an zwei Aminosäureresten phosphoryliert: An dem in der zentralen Kinasedomäne gelegenen Threoninrest 308 und an Serin 473, welches sich nahe dem C-terminalen Ende von AKT befindet. [21, 127]. Während für erstere Phosphorylierung die «3' phosphoinositol-dependent kinase 1» (Phosphoinositol-abhängige Kinase 1, PDK-1) verantwortlich zu sein scheint, bleibt die Bedeutung von ILK für die Phosphorylierung an Serin 473 umstritten. So konnte bei verstärkter Synthese von ILKAP als Inhibitor von ILK vermittelter GSK3 β -Phosphorylierung, kein Effekt auf die AKT-Phosphorylierung beobachtet werden [130]. Außerdem zeigen weder ILK-defiziente *Drosophila melanogasteres* [246], noch Mäuse-Chondrozyten nach Ablation des ILK Gens [80] eine veränderte AKT-Aktivität. Wenn ILK also AKT an Serin 473 phosphoryliert oder die Aktivierung indirekt unterstützt

[140], so scheinen auch noch andere Proteine diese Aufgabe erfüllen zu können.

Ebenfalls in der Kinase-Domäne befindet sich die Bindungsregion für α - und β -Parvin. Während neueren Studien zufolge α -Parvin die intrazelluläre Signalwirkung von ILK verstärkt [7], besitzt β -Parvin eher einen hemmenden Einfluss. Interessanterweise bewirkt sowohl eine Störung der ILK- α -Parvin-Bindung, als auch eine Überexpression von β -Parvin eine Zunahme der Apoptose [248].

Die Interaktion von α -Parvin mit ILK zeigt sich PIP₃-abhängig [7] und kann von «mitogen-activated protein kinase» (MAPK) mittels α -Parvin-Phosphorylierung beeinflusst werden [239]. Zusammen mit Pinch-1 bilden die zwei Proteine einen ternären Komplex, der zum einen größere Stabilität der Bindungspartner vermittelt, zum anderen für die Rekrutierung der einzelner Komponenten in die fokalen Adhäsionen wichtig ist [128], wobei hierfür auch der Adapter Paxillin von Bedeutung zu sein scheint [156].

Mit β -Parvin wurde ein weiteres mögliches Zielprotein für die Kinaseaktivität von ILK entdeckt, da β -Parvin *in vitro* von ILK an der carboxyterminalen CH-Domäne phosphoryliert wird [238]. Diese Phosphorylierung spielt für die Interaktion mit α -Actinin und damit für die Verbindung zum Aktingerüst eine zentrale Rolle [237]. Außerdem besitzt β -Parvin möglicherweise über den PAK-interactive exchange factor- α (PAK interaktiver Austausch-Faktor α , α -PIX) Einfluss auf die GTPase Rac1, welche entscheidend an der Dynamik des Zytoskeletts beteiligt ist [185].

Klinische Bedeutung

Mehrere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass ILK als vielversprechendes Zielmolekül in der Anti-Tumor-Therapie in Betracht kommt. Nicht nur, dass in einigen Tumoren, darunter Prostata-, Ovarial-, Magen-, Kolon-, nicht kleinzelligem Bronchial-Karzinom und malignem Melanom, ILK vermehrt synthetisiert wird, sondern die Proteinexpression korreliert auch mit Tumor-Grad und Metastasierungsstatus, und ist damit umgekehrt proportional zur 5-Jahres-Überlebensrate [79, 3, 111, 25, 209, 48].

Gegenüber genotoxischem Stress mittels ionisierender Strahlen scheint ILK einen sensibilisierenden Effekt zu besitzen. So zeigten sowohl mit ILK-DNA-Konstrukten transfizierte A549 Bronchialkarzinomzellen [39], als auch humane Leukämiezellen [99] ein reduziertes Überleben nach Bestrahlung. An Leukämiezellen konnte eine Interaktion von ILK mit Caspase 8 und 9 nachgewiesen werden, welche die Induktion von strahlenbedingter Apoptose fördert. Duxbury et al. hingegen beobachteten bei ILK überexprimierenden Pankreaskarzinomzellen verminderte Apoptose nach Behandlung mit dem Nukleosidanalogon Gemcitabin [61]. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese widersprüchlichen Ergebnisse zu erklären.

In Patienten mit malignem Ovarial-Karzinom ist im Serum eine verglichen mit gesunden Kontrollpersonen 6 - 9 fach erhöhte Expression von ILK nachweisbar, welche unter Chemotherapie synchron zum klinisch verwendeten Tumor-Marker CA 125 wieder absinkt. Somit könnte ILK bei dieser Erkrankung nicht nur bei der frühzeitigen Erkennung eine Rolle spielen, sondern auch zur Verlaufskontrolle für den Erfolg von Therapiemaßnahmen eingesetzt werden [2]. Auch bei Patienten mit familiärer adenomatöse Polyposis, einer genetischen Erkrankung, die bei den Betroffenen meist bis zum 20. Lebensjahr zu einer Entartung der zahlreichen Kolon-Polypen führt, wurde eine erhöhte ILK Expression in den Adenomen gefunden, weshalb die Vermutung nahe liegt, ILK könnte mit der Umwandlung von benignen zu malignen Läsionen in Zusammenhang stehen [142].

Neuere Studien zeigen, dass durch Einsatz von QLT0267, einem ILK-Inhibitor, bei Mäusen mit anaplastischem Schilddrüsenkarzinom das Tumolvolumen signifikant reduziert werden konnte [243], was nicht nur auf die prognostische, sondern auch auf die therapeutische Potenz von ILK hinweist. Allerdings müssen die genauen Zusammenhänge von ILK und Tumorgenese sowie von Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Proteinen in den fokalen Adhäsionen noch eingehender untersucht werden, bevor ein klinischer Einsatz befürwortet und realisiert werden kann.

2.2.2 FAK, focal adhesion kinase

Neben ILK fungiert die «focal adhesion kinase» als ein weiterer wichtiger Mediator von Integrin vermittelten Signalen. Diese rezeptorungebundene Tyrosin-Kinase (TK) ist wichtig für Zellmotilität [110, 197] und Überleben. Sie beinhaltet eine zentrale Kinase-Einheit, aminoterminal die «band F ezrin-radixin-moesin»-Homologie (FERM) und carboxyterminal die prolinreiche «focal adhesion targeting» (FAT) Sequenz (siehe Abb. 2.4).

Durch Integrin vermittelte Adhäsion kommt es zur Phosphorylierung von sechs verschiedenen Tyrosin-Resten: 397, 407, 576, 577, 861 und 925.

Phosphorylierung an Tyrosin 397, der Autophosphorylierungsstelle, schafft ein Motiv, welches von zahlreichen Proteinen mit SH2 Domänen, wie Kinasen der Src-Familie, Phospholipase-C γ (PLC γ), growth-factor-receptor-bound protein 7 (Grb-7), dem Adapterprotein Nck-2 und der p85 Untereinheit von PI3K, erkannt wird. Inwiefern diese verschiedenen Signalproteine aufgrund bestimmter Zellstimuli getrennt oder gleichzeitig binden, ist bis heute unklar.

Src, eine bedeutende TK in fokalen Adhäsionen, fungiert als wichtiger Bindungspartner von FAK [70, 242]. Beide Proteine bilden einen sich gegenseitig stimulierenden Komplex, wodurch es zu Konformationsänderung und Aktivierung von Src kommt, welches

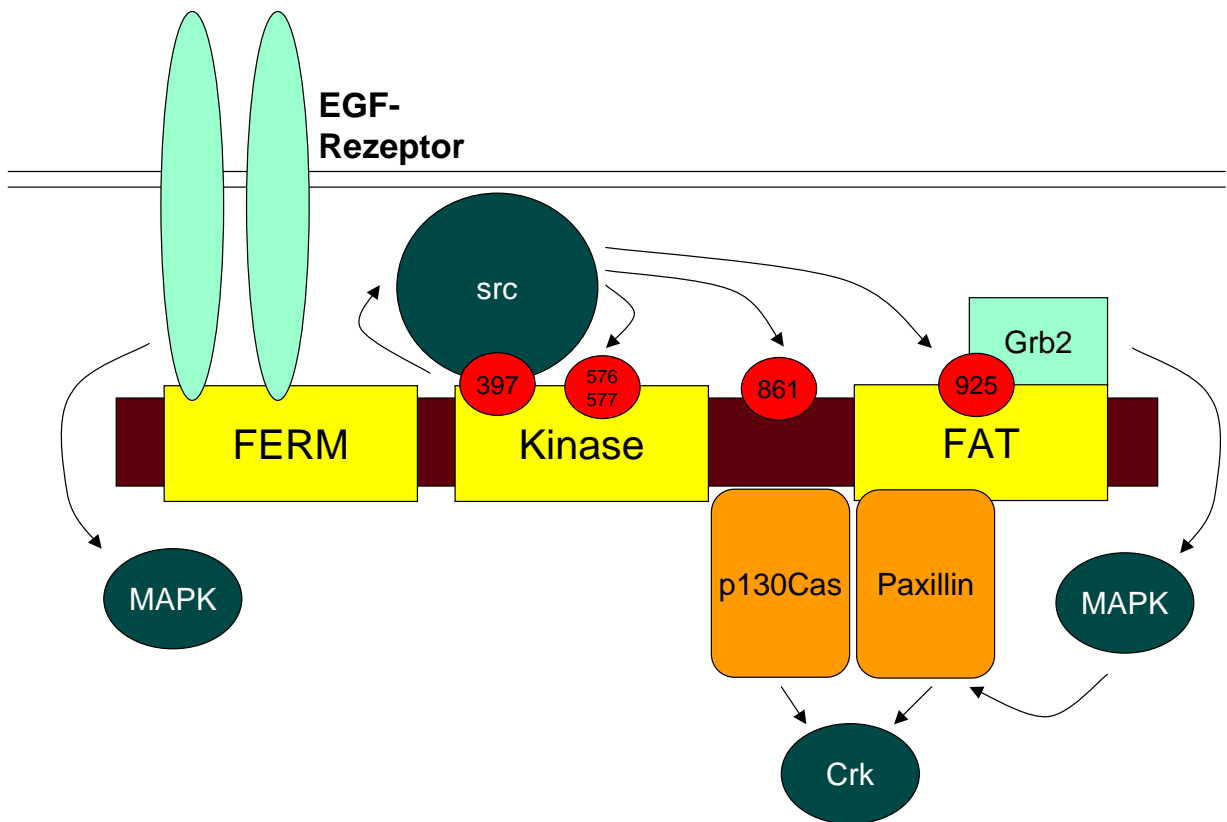


Abbildung 2.4: Übersicht FAK Struktur und Bindungspartner:

FAK beinhaltet eine FERM-Domäne, die Kinase-Einheit und die focal-adhesion-targeting (FAT) Sequenz. Durch Autophosphorylierung von Tyrosin 397 wird Src gebunden und aktiviert. Src phosphoryliert dann wiederum FAK an den verschiedenen Tyrosinresten (Pfeile). Phosphorylierung von FAK an Tyrosin 861 fördert die Interaktion mit p130^{Cas}. Da sich die Bindungsstellen von Paxillin und Grb-2 partiell überschneiden, können die Proteine nicht gleichzeitig mit FAK interagieren. Phosphorylierung von FAK an Tyrosin 925 erhöht die Affinität zu Grb-2. Grb-2 steht in Verbindung zum MAPK-Signalweg. MAPK phosphoryliert Paxillin, wodurch Paxillin verstärkt an FAK bindet und diese aktiviert.

wiederum FAK an den verschiedenen Tyrosinresten phosphoryliert. Auf diese Weise könnten selbst initial schwache Signale amplifiziert werden [87].

Die Tyrosinreste 576 und 577 befinden sich innerhalb der Kinase-Domäne von FAK und sind für die maximale katalytische Aktivität notwendig [150]. Dementsprechend zeigen Mutanten mit kombinierter Phenylalanin Substitution an diesen Phosphorylierungsstellen eine 2 - 3 fach reduzierte Kinaseaktivität verglichen mit Wildtyp-FAK [27]. Diese Mutation scheint auch einen störenden Effekt auf Migration und Zellausbreitung zu besitzen [169], ein Phänomen, welches für Tumorzellen und deren Adhäsions-unabhängiges Wachstum relevant sein könnte.

Dagegen beeinflusst die Phosphorylierungsstelle Tyrosin 861 die Interaktion von FAK mit Crk assoziiertem Substrat (p130^{Cas}). Zum einen kommt es durch Phosphorylierung an Tyrosin 861 zu einer verbesserten Bindung der beiden Proteine *in vitro*, zum anderen zeigen Zellen mit an Tyrosin 861 unphosphorylierbarer FAK eine verminderte Aktivierbarkeit von «c-Jun NH2-terminaler Kinase» (JNK) [132], einem möglichen Effektor von p130^{Cas}.

Trotz der direkten Interaktion der Kinase FAK mit p130^{Cas} ist diese nicht hauptsächlich für die Phosphorylierung des Adapterproteins verantwortlich. Vielmehr wird dies von Src-Kinasen bewerkstelligt, was Versuche an Src-defizienten Zellen vermuten lassen [226]. Die Phosphorylierung von p130^{Cas} ermöglicht die Assoziation mit Crk, wodurch es über die GTPase Rac1 Einfluss auf Migration und Invasion der Zellen nimmt [103]. Darüber hinaus ist auf diesem Weg noch die Stimulation von JNK wahrscheinlich, welches seinerseits entscheidend Überleben und Proliferation moduliert [57].

Ebenfalls in der FAT-Domäne ist Tyrosin 925 lokalisiert. Phosphorylierung dieses Aminosäure-Restes stellt die Verbindung zum MAPK-Signalweg über den Komplex von Grb-2/SOS und die GTPasen Ras und Raf her. Strukturanalysen von FAK haben ergeben, dass Grb-2 und Paxillin, welches bei der Platzierung von FAK eine wichtige Rolle spielt [207], nicht gleichzeitig mit FAK interagieren können, da sich die Bindungsstellen der beiden Proteine partiell überschneiden [134, 92] (siehe Abb. 2.5). Damit übereinstimmend haben Magnetresonanz-Untersuchungen gezeigt, dass die FAT-Domäne eine Konformationsänderung eingehen kann, welche entweder Phosphorylierung an Tyrosin 925 und damit die Bindung von Grb-2 oder die Interaktion mit Paxillin zulässt [175]. Dies könnte die Beobachtung erklären, weshalb Phosphorylierung von Tyrosin 925 zum Ausschluss von FAK aus den fokalen Adhäsionen führt [116].

Bindet Paxillin an den FAK-Src-Komplex kommt es zur Phosphorylierung an Tyrosin 31 und 118, wodurch Paxillin einerseits wie p130^{Cas} mit Crk, andererseits mittels letzterer Phosphorylierung mit MAPK interagieren kann. MAPK ist ebenfalls in der Lage Paxillin zu phosphorylieren, was wiederum in verstärkter Affinität zu FAK und deren Aktivierung resultiert [137, 231].

Molekulare Analysen verschiedener Tumore weisen auf eine zentrale Rolle von FAK in einer Vielzahl von humanen Neoplasien hin. So findet sich in Plattenepithelkarzinomen [6], Bronchial- [227, 157], Leber- [112], Mamma- [230], Schilddrüsen- [118], Ovarialtumoren [83] und Astrozytomen [85] eine vermehrte Expression und Phosphorylierung von FAK, was die Vermutung nahe legt, dass sich die Kinase als therapeutisches Zielprotein, prognostischer Marker oder Indikator für maligne Transformation einsetzen lässt. Kasahara et al., die als erstes die Funktion von FAK bei der zellulären Reaktion auf genotoxischem Stress untersuchten, beobachteten nach Bestrahlung humaner Leukämiezellen eine ver-

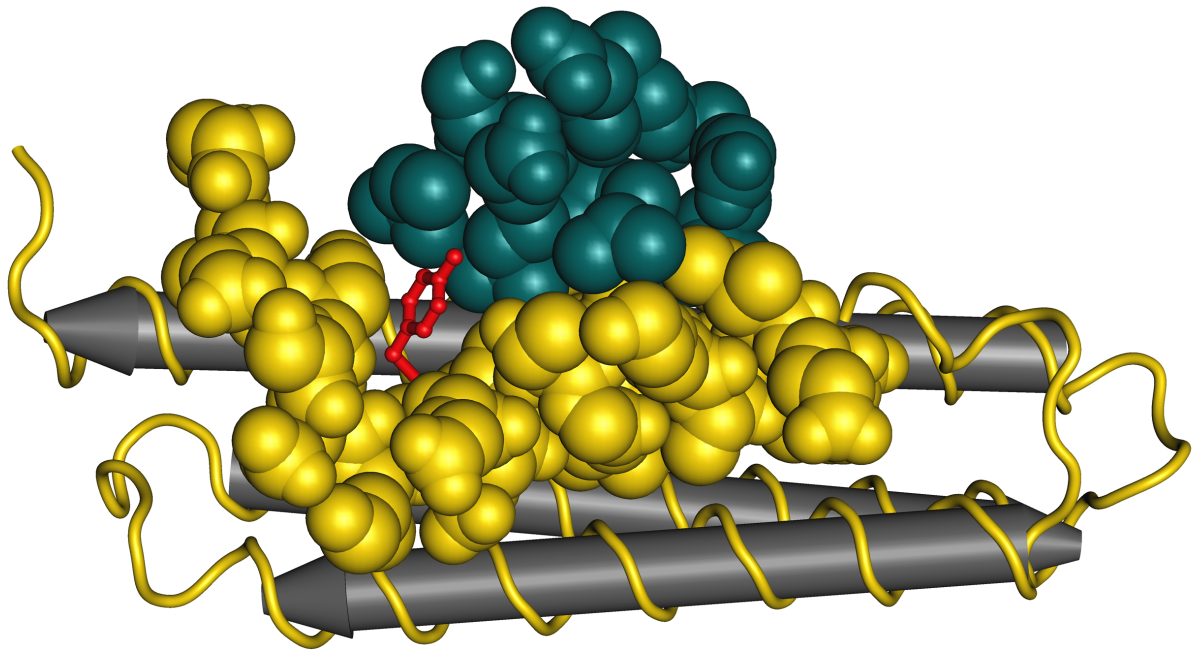


Abbildung 2.5: Bindung des LD2-Motivs von Paxillin (grün) an die FAT-Sequenz von FAK (gelb). Durch die Interaktion der beiden Domänen wird die Phosphorylierungsstelle Tyrosin 925 (rot) für Grb-2 nicht zugänglich. Eine Bindung von Grb-2 setzt deshalb die Lösung des FAK-Paxillin-Komplexes voraus [100, 175]. Struktur: PDB 1OW8; Software: Cn3d (NCBI National Center for Biotechnology Information)

minderte DNA Fragmentierung sowie eine geringere Aktivität von Caspase 3 und 8 bei FAK Überexpression [115]. Gleichzeitig fand sich eine Induktion des AKT Signalweges und der Apoptoseinhibitoren (inhibitor of apoptosis, IAP) «cellular IAP-2» (cIAP-2) und «X-linked IAP» (XIAP). Neben einer reduzierten Radiosensibilität besaßen HL-60 Zellen mit erhöhter FAK Expression eine vermehrte Resistenz gegenüber zytotoxischen Substanzen wie Wasserstoffperoxid oder Etoposid [210]. Studien an adhärent wachsenden A549 Bronchialkarzinomzellen zeigten eine Induktion der FAK-Phosphorylierung an den Tyrosinresten 397 und 925, nachdem die Zellen bestrahlt worden waren [16]. Als mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte die strahleninduzierte Entstehung von Sauerstoffradikalen dienen [180], unter deren Einfluss Zent et al. eine verstärkte Phosphorylierung von Proteinen der fokalen Adhäsionen beobachteten [245].

Obwohl bis heute die genauen Mechanismen nicht geklärt sind, scheint FAK entscheidend die zelluläre Strahlenantwort zu modulieren, wobei eine radioprotektive Wirkung nachgewiesen wurde. Da auch Tumorwachstum und Metastasierung von FAK beeinflusst werden, könnte sich die Kinase als vielversprechendes Zielprotein in der

Anti-Tumor-Therapie erweisen.

2.3 ErbB-Rezeptoren

Die Rezeptoren der ErbB-Familie gehören zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) und sind als transmembranöse Moleküle an der Verknüpfung externer Stimuli mit intrazellulären Signalwegen beteiligt.

Neben dem «epidermal growth factor receptor» (EGF-Rezeptor, ErbB1, HER1) gehören noch drei weitere Mitglieder zu dieser Gruppe: ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4). Ligandenbindung führt zur Dimerisierung von zwei ErbB-Monomeren, wobei sich sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden können. Während ErbB2 der bevorzugte Bindungspartner der anderen ErbB-Moleküle bei der Bildung von heterodimeren Rezeptoren ist und so vornehmlich die Aufgabe eines Korezeptors erfüllt [82, 221], fehlt dem ErbB3-Molekül die katalytische Aktivität und damit die Fähigkeit zur Autophosphorylierung [241].

Die ErbB-Monomere setzen sich aus einer für die Ligandenbindung wichtigen extrazellulären Domäne, einer transmembranösen Sequenz und einem zytoplasmatischen Anteil, der bei ErbB1, ErbB2 und ErbB4 die TK-Einheit beinhaltet, zusammen.

Signalübermittlung

Durch Stimulation mit EGF oder verwandten Peptiden wie Amphiregulin, Betacellulin oder «transforming growth factor α » (TGF α) kommt es zur Bildung von ErbB Homo- und Heterodimeren, was wiederum in einer gesteigerten katalytischen Aktivität und Autophosphorylierung verschiedener Tyrosinreste des zytoplasmatischen Teils resultiert [97, 233]. Auf diese Weise entstehen Bindungsstellen für Phosphotyrosinbindende (PTB)- und SH2-Domänen verschiedener Adapterproteine und Signalmoleküle wie Grb-2 [165, 10], Shc [164, 10], PLC γ [187, 35] und der p85-Untereinheit von PI3K [201].

Sowohl Grb-2, als auch Shc sind am MAPK-Signalweg beteiligt. Durch Stimulation der membranverankerten Guanosintrisphosphatase Ras, welche mit der Transformation einer Vielzahl von Tumoren assoziiert ist, wird über Raf, «mitogen-activated protein kinase kinase» (MEK) und MAPK Zellwachstum, Differenzierung und Überleben reguliert [33].

Dagegen führt die Aktivierung von PLC γ zur Hydrolyse von PIP₂, wodurch zum einen 1,2-Diacylglycerol (DAG) zum anderen Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) entsteht. DAG dient als Kofaktor bei der Stimulation von Protein Kinase C (PKC), welche über verschiedene Faktoren Einfluss auf die Transkription nehmen kann [241] und außerdem

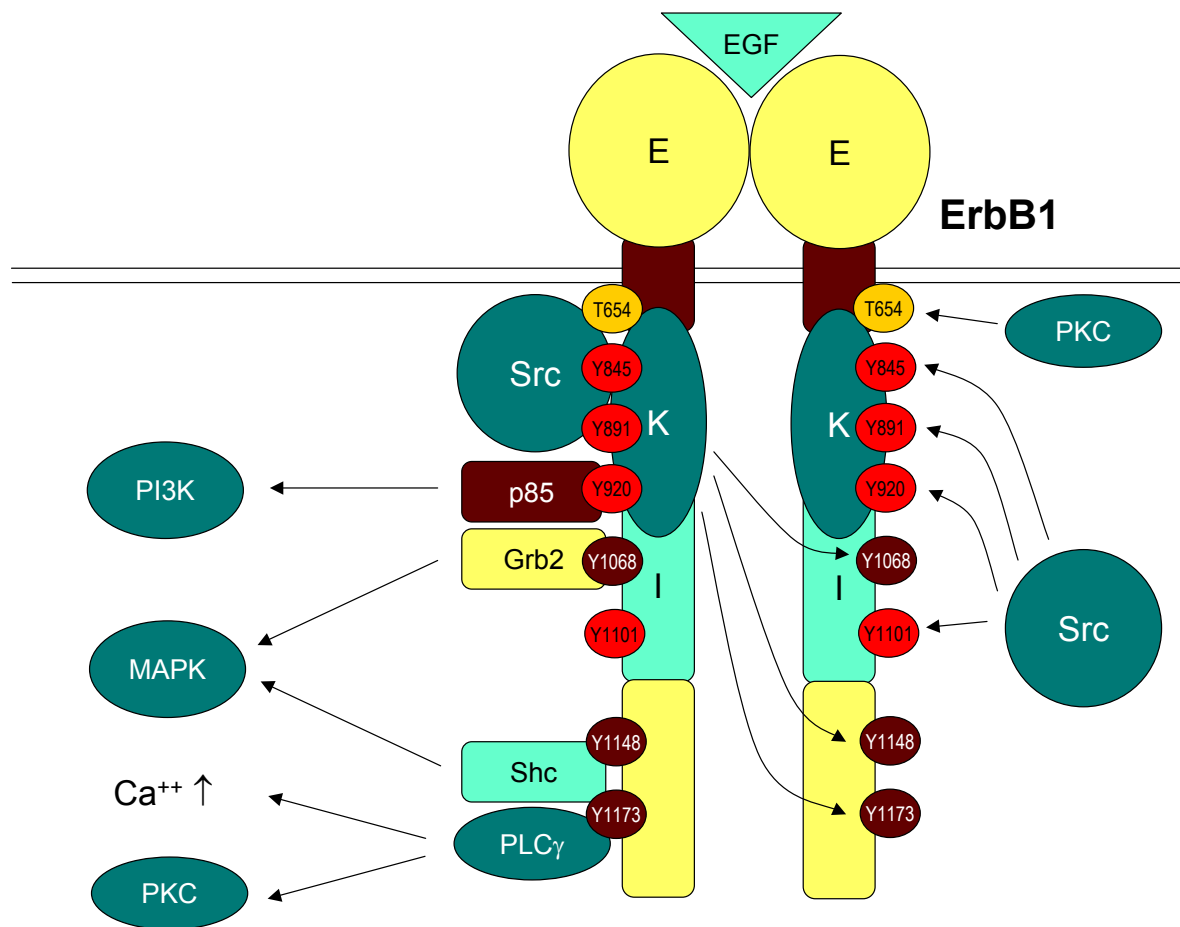


Abbildung 2.6: ErbB1-Homodimer. «E» bezeichnet die extrazelluläre, ligandenbindende Domäne (gelb), «K» steht für Kinase-Einheit (dunkelgrün) und die mit «I» gekennzeichnete Region (mintgrün) ist wichtig für die Internalisierung des Rezeptors. Durch Bindung von EGF kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung (Pfeile) an verschiedenen Tyrosinresten (dunkelrot). Dadurch wird die Interaktion mit SH2-Domänen verschiedener Proteine ermöglicht. Grb-2 und Shc stellen eine Verbindung zum MAPK-Signalweg her, während PLC γ den Calciumspiegel der Zelle beeinflusst. Die durch PKC vermittelte Phosphorylierung an Threonin 654 (orange) führt zu Hemmung der Autophosphorylierung des ErbB-Moleküls und reguliert so die Signalübermittlung. Src ist ebenfalls in der Lage den ErbB1-Rezeptor zu phosphorylieren (Pfeile). Diese Phosphorylierungen (hellrot) sind für die Assoziation des Rezeptors mit Src und p85, der regulatorischen Untereinheit von PI3K, von Bedeutung.

in der Lage ist, den EGF-Rezeptor an Threonin 654 zu phosphorylieren. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Reduktion der durch Ligandenbindung hervorgerufenen Autophosphorylierung des ErbB-Moleküls und dient somit als Regulationsmechanismus für die Signalübermittlung [106, 8]. Außerdem resultiert die Freisetzung von IP $_3$ in einem Konzentrationsanstieg von intrazellulären Calciumionen, wodurch eine Reihe

von calciumabhängigen Reaktionen wie Sekretion, Muskelkontraktion und neuronale Informationsweiterleitung moduliert werden [17].

Außerdem beeinflussen die Mitglieder der ErbB-Familie die Aktivität der heterodimeren p85/p110-PI3K. Zum einen wird durch Rekrutierung von p85 die katalytische Untereinheit p110 stabilisiert, zum anderen ist Ras, welches durch Ligandenbindung an den ErbB-Rezeptor aktiviert wird, zumindest *in vitro* in der Lage p110 durch direkte Interaktion zu stimulieren [182]. PI3K kann mittels Synthese von Phospholipiden in wichtige Signalwege eingreifen [244]. Da neben PDK-1, Rac1 und PKC auch AKT und ILK ein PIP₃-abhängiges Aktivitätsmuster zeigen [215], ist es nicht verwunderlich, dass die Kinase großen Einfluss auf eine Vielzahl vitaler Zellvorgänge darunter Überleben, Proliferation und Migration besitzt [181, 240].

ErbB1 besitzt außer den Autophosphorylierungsstellen auch einige Tyrosinreste, die von Src phosphoryliert werden [19, 192]. Hierdurch wird nicht nur die Affinität der beiden Proteine zueinander erhöht, indem sich Src eine eigene Bindungsstelle schafft, sondern auch die bereits erwähnte Assoziation zwischen Rezeptor und der p85-Untereinheit von PI3K ermöglicht. Während diese Interaktionen von der Ligandenbindung an das ErbB-Molekül abhängig zu sein scheinen, bleiben sie durch die Hemmung der Autophosphorylierung mittels selektiver TK-Inhibitoren unbeeinflusst [203].

Neben der Aktivierung der Rezeptoren erfolgt eine durch Ligandenbindung induzierte Endozytose [31, 168], die vom Phosphorylierungsstatus der zytoplasmatischen Domäne gesteuert wird [77, 36]. Die internalisierten Proteine gelangen über Clathrin-umhüllte Vesikel und Endosomen entweder zurück an die Zellmembran oder werden in perinukleären Lysosom-ähnlichen Strukturen degradiert [14]. Auf diesem Weg wird die Oberflächenexpression und Aktivität der ErbB-Moleküle reguliert, wobei Untersuchungen darauf hinweisen, dass die Rezeptoren zumindest auf Endosom-Ebene noch Signalwirkung besitzen [91].

Liganden

Für ErbB-Rezeptoren existieren eine Reihe von Liganden, die als transmembranöse Vorstufen synthetisiert und durch Proteolyse freigesetzt werden [143]. Mit Ausnahme von EGF, welches in einer Vielzahl von Körperflüssigkeiten vorhanden ist, wirken diese Peptide in der Regel über lokale auto- und parakrine Mechanismen.

Aufgrund ihrer Struktur weisen sie unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen Rezeptor-Subtypen auf. So stimulieren EGF, Amphiregulin und TGF α spezifisch ErbB1, während Betacellulin und Epiregulin sowohl an ErbB1, als auch an ErbB4 binden können [166]. Die Gruppe der Neureguline (NRG) aktiviert vornehmlich ErbB3- und ErbB4-

Rezeptoren [30, 32]. Trotz intensiver Untersuchungen konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt kein direkter Ligand für ErbB2 ermittelt werden [166].

Da es sich bei den Peptiden um bivalente Moleküle handelt, sind sie in der Lage die Zusammensetzung der sich bildenden dimeren ErbB-Moleküle und damit deren Signalwirkung mitzubestimmen [13]. NRG-1 zum Beispiel, welches verstärkt mit ErbB3 und ErbB4 assoziiert ist, rekrutiert bevorzugt ErbB2 als zweiten Bindungspartner und führt so zu einer heterodimeren Formation des Rezeptors [220].

Außerdem wird durch die Ligandenbindung auch Signalstärke und Dauer moduliert. Hierfür ist interessant, dass Peptide mit einer geringeren Affinität eine Rezeptor-Degradierung verhindern und damit stärker stimulierend wirken als Faktoren mit fester Bindung an den Rezeptor [219].

Ein weiteres Kriterium ist die unterschiedliche pH-Stabilität der ErbB-Liganden. Wenn sich das Peptid schon vor Erreichen der Lysosomen vom Rezeptor löst, führt das zur Rückkehr der ErbB-Moleküle an die Zellmembran, wodurch eine Signalpotenzierung erreicht werden kann. Während EGF, dessen Interaktion relativ pH-stabil ist, bis zur Degradierung in den Lysosomen an das ErbB-Molekül gebunden bleibt, dissoziiert NRG-1 bereits auf Endosom-Ebene und ermöglicht so eine Wiederverwendung des Rezeptors [229, 71].

Durch diese verschiedenen ligandenspezifischen Charakteristika ergibt sich ein zusätzlicher Mechanismus, die Aktivierung und Signalübertragung der ErbB-Rezeptoren zu regulieren, was auf die Bedeutung dieser Faktoren für Proliferation und Differenzierung hinweist [166].

Klinische Bedeutung

Als ubiquitär exprimierte Moleküle sind die Mitglieder der ErbB-Familie vor allem für die Entwicklung und Embryogenese wichtig. So führt eine Nullmutation in den entsprechenden Genen bei Mäusen bereits vor der Geburt aufgrund von Missbildungen lebenswichtiger Organe zum Tod (siehe Tab. 2.1).

Nullmutation	Organ-Fehlentwicklung
<i>erbB1</i>	Gehirn, Haut, Lunge, Gastrointestinal-Trakt
<i>erbB2</i>	Herz, zentrales Nervensystem
<i>erbB3</i>	Herz, zentrales Nervensystem
<i>erbB4</i>	Herz

Tabelle 2.1: Übersicht ErbB-Mutationen

Doch auch bei Tumorerkrankungen spielen diese Rezeptoren eine wichtige Rolle. Sowohl bei *in vitro* Versuchen mit Tumorzelllinien, als auch *in vivo* wurde ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen ErbB-Molekülen und der malignen Transformation von Zellen festgestellt [107].

Eine Überexpression des EGF-Rezeptor aufgrund von Genamplifikation findet sich in einer Vielzahl von humanen Malignomen [163, 205, 47, 202], wobei es parallel dazu häufig zu einer erhöhten Freisetzung von Wachstumsfaktoren durch den Tumor selbst oder durch das umliegende Gewebe kommt [190]. In Glioblastomen wird die Genamplifikation oft von strukturellen Veränderungen in der extrazellulären Domäne des Rezeptors begleitet [65], welche sowohl ursächlich für die konstitutive Kinaseaktivität des Rezeptors, als auch für eine verminderte Strahlensensibilität der betroffenen Zellen sind [124]. Auch einige Mamma-, Bronchial- und Ovarialkarzinomzellen scheinen diese als EGFRvIII bezeichnete Variante aufzuweisen [153, 114].

Eine Überexpression von ErbB1 und ErbB2 in NIH 3T3 Fibroblasten führt zu einer verstärkten Aktivierung durch EGF und damit zu vermehrtem Zellwachstum [119]. Ein beträchtlicher Anteil von Mamma- und Ovarialkarzinomen weist außerdem einen erhöhten Spiegel von ErbB2 auf, wobei dies mit einer schlechten Prognose korreliert. Viele dieser Tumoren zeigen eine gesteigerte autokrine Stimulation des ErbB1-Rezeptors durch Synthese einer der zahlreichen Liganden [190].

Wird ErbB2 in transgenen Mäusen überexprimiert, so kann ebenso eine vermehrte Bildung von ErbB1 beobachtet werden [58], während ein Verlust von ErbB2 die autokrine Aktivierung von ErbB1 unterbindet und so zu einer reduzierten Stimulation dieser Rezeptoren führt [113]. Diese gegenseitige Beeinflussung führt dazu, dass die Mutation eines der ErbB-Moleküle ebenfalls die Signalwege der anderen Rezeptor-Subtypen betreffen kann und so die Auswirkungen auf vitale Zellvorgänge potenziert werden [166].

Interessanterweise rufen ionisierende Strahlen in einem Dosisbereich von 1 – 5 Gy eine Phosphorylierung des EGF-Rezeptors hervor, die der Stimulation durch Wachstumsfaktoren ähnlich ist [78, 193, 22] und zu einer Aktivierung des MAPK Signalweges führt [56]. Eine gesteigerte Synthese von ErbB1 mittels stabiler Transfektion führt in murinen Ovarialkarzinomzellen zu einer Zunahme der Radioresistenz, wobei dieser Effekt durch den Einsatz von Cetuximab, einem monoklonalen ErbB1-Antikörper, der eine Reduktion der EGF-Rezeptor Expression bewirkt, antagonisiert werden kann [131].

Kavanagh et al. konnten nachweisen, dass die nach Bestrahlung beschleunigte Zellproliferation *in vitro* bei Hemmung der EGF-Rezeptor Phosphorylierung ausblieb [117], was auf die wichtige Rolle von ErbB1 für die zelluläre Strahlenantwort hindeutet. Im Einklang

damit zeigen verschiedene Tumorzelllinien durch Exposition mit dem EGF-Rezeptor TK-Inhibitor Gefitinib ein reduziertes Überleben nach genotoxischem Stress [105, 200]. Nyati et al. beobachteten in Zellen eines kolorektalen Karzinoms sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* eine durch Canertinib, einem pan ErbB-Inhibitor, ausgelöste Radiosensibilisierung [160]. Eine ähnliche Wirkung erzielte der selektive EGF-Rezeptor TK-Inhibitor Erlotinib bei Bronchial-, Prostata- und Plattenepithelkarzinomzellen [38]. Die genauen Mechanismen sind allerdings bis heute unklar.

Inhibitoren

Zur Inhibition von ErbB-Rezeptoren stehen zwei Substanzklassen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zur Verfügung: Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (RTK-Inhibitoren) und humanisierte Antikörper (siehe auch Tab. 2.2).

Die RTK-Inhibitoren interagieren mit der im Zytoplasma gelegenen ATP-Bindungsregion der ErbB-Rezeptoren und unterbinden so die Autophosphorylierung [158]. Abhängig von der Struktur kann diese Hemmung reversibel wie bei Gefitinib (Iressa) [98] oder durch kovalente Bindung irreversibel wie bei dem Wirkstoff EKB 569 sein [216].

BIBX1382BS (BIBX, siehe Abb. 2.7) als weiterer Vertreter dieser Substanzklasse wurde von Boehringer Ingelheim Austria entwickelt und 1997 patentiert. Versuche haben gezeigt, dass dieser Inhibitor nicht nur die durch $TGF\alpha$ ausgelöste Stimulation von ErbB1 unterbindet [199], sondern ab einer Konzentration von 10 μM auch in der Lage ist ErbB2-Aktivität zu hemmen [63]. In einer Phase-I-Studie induzierte BIBX einen dosislimitierenden Anstieg der Leberenzyme. Außerdem zeigte sich eine geringe Bioverfügbarkeit der Substanz, die durch eine für Menschen und Rhesusaffen spezifische Aldehyd-Oxidase verursacht wird [59]. Trotzdem ist der Inhibitor aufgrund seiner Wirkung in präklinischen Tumormodellen

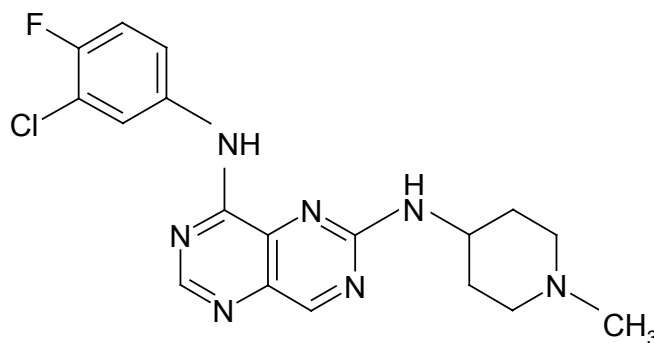


Abbildung 2.7: Strukturformel von BIBX1382BS

[12, 121, 217] für die Entwicklung von Therapieansätzen bei malignen Erkrankungen von Bedeutung und kann außerdem zur Klärung von Protein-Protein-Interaktionen beitragen.

Wirkstoff	ErbB-Spezifität
<i>Reversible RTK Inhibitoren</i>	
Gefitinib (Iressa)	ErbB1
Erlotinib (Tarceva)	ErbB1
Lapatinib (GW572016)	ErbB1, ErbB2
<i>Irreversible RTK Inhibitoren</i>	
Canertinib (CI-1033)	ErbB1, ErbB2
EKB 569	ErbB1
PKI166	ErbB1, ErbB2
HKI-272	ErbB1, ErbB2
<i>Humanisierte Antikörper</i>	
Cetuximab (C225)	ErbB1
Panitumumab (ABX-EGF)	ErbB1
EMD72000	ErbB1
ICR62	ErbB1
IMC-225	ErbB1

Tabelle 2.2: ErbB Inhibitoren

Während die RTK Inhibitoren meist mehrere Mitglieder der ErbB-Familie hemmen, sind monoklonale Antikörper spezifisch für einen Rezeptor-Subtyp. Durch kompetitive Bindung an die extrazelluläre Domäne kommt es unabhängig vom Phosphorylierungsstatus des ErbB-Moleküls zu Internalisierung des Rezeptor-Antikörper-Komplexes [68, 174], wobei bis zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar ist, ob der Komplex degradiert wird oder der Rezeptor an die Zellmembran zurückkehrt.

3 Material

3.1 Zelllinien

<i>ILK^{fl/fl}</i>	murine Nierenfibroblasten (Prof. Fässler)
<i>ILK^{-/-}</i>	murine ILK-defiziente Nierenfibroblasten (Prof. Fässler)

Die verwendeten murinen Zelllinien wurden uns in einer Kooperation mit Prof. Fässler¹ dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung wurde in embryonale Stammzellen ein Konstrukt (ILK^{fl}) eingebracht, das das Gen für ILK, die angrenzenden Regionen und eine Neo-TK Kasette (Neomycin Resistenz und die Herpes Thymidinkinase) enthielt. Vor und nach einem Exon und der Neo-TK Kasette waren LoxP-Sequenzen angehängt, um das Exon oder die Resistenz zu einem späteren Zeitpunkt durch die Cre-Rekombinase (Cyclization REcombination) entfernen zu können². Nachdem die Zellen mit erfolgreicher Integration des Konstrukts durch Behandlung mit Neomycin selektiert worden waren, wurde die Neomycinresistenz entfernt. Dazu wurden die Zellen mit einem Cre-Rekombinase Expressionsplasmid transfiziert. Da hierbei die Sequenz für Herpes Thymidinkinase ebenfalls zerstört wurde, konnte durch Zugabe von FIAU, einer Substanz mit antiviraler Wirkung die durch Thymidinkinase in einen toxischen Metaboliten umgewandelt wird, die Zellen ermittelt werden, bei denen das ILK^{fl}-Konstrukt entfernt worden war [189].

<i>FaDu</i>	humane Plattenepithelkarzinomzellen HTB 43 (Prof. Baumann)
-------------	--

Die verwendeten humanen Plattenepithelkarzinomzellen wurden uns von Prof. Baumann³ dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt. In die FaDu-Zellen wurde ein Plasmid (pUSEamp) eingebracht, das neben einer Neomycin- und Ampicillin-Resistenz sowie einer CMV-Promoterregion auch die DNA-Sequenz für ILK beinhaltet (siehe Abb. 3.1).

¹Abteilung für Molekulare Medizin, Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried

²Die Cre-Rekombinase schneidet die DNA zwischen zwei LoxP Sequenzen und ligiert die Enden wieder.

³Abteilung für Strahlentherapie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden

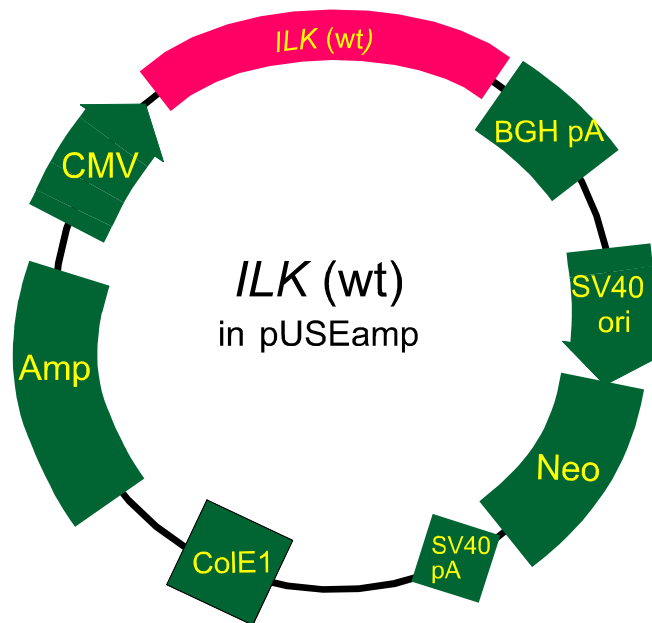


Abbildung 3.1: Aufbau des Plasmidvektors. Die Resistenzen für Neomycin (Neo) und Ampicillin (Amp) sind für die verschiedenen Selektionsschritte von Bedeutung. Nach der CMV-Promoterregion (CMV) ist das jeweilige cDNA-Konstrukt (hier Wildtyp-ILK) eingefügt. (Abb. aus Datenblatt, Upstate)

Um den Einfluss der Kinaseaktivität auf das Überleben nach genotoxischem Stress zu untersuchen, wurde neben der Wildtyp-ILK (wt) auch ein ILK-Konstrukt mit konstitutiv aktiver Kinase (S343D) integriert. Als Kontrolle dienten die mit dem Leervektor transfizierten Zellen.

Folgende Klone wurden für die Untersuchungen verwendet:

<i>FaDu EV2, EV3</i>	mit pUSEamp (Upstate, Hamburg)
<i>FaDu IW23, IW30</i>	mit ILK cDNA (wt) in pUSEamp (Upstate, Hamburg)
<i>FaDu IH42, IH43</i>	mit ILK cDNA (S343D) in pUSEamp (Upstate, Hamburg)

3.2 Medium

<i>DMEM</i>	Dulbecco Modified Eagle Medium (Gibco, Karlsruhe)
<i>FCS</i>	Fetal Calf Serum Gold (PAA, Pasching, Österreich)
<i>NEA</i>	nichtessentielle Aminosäuren (Gibco, Karlsruhe)

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

3.3 Geräte und Hilfsmittel

3.3.1 Zellkultur

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

3.3.2 Transfektion

<i>Elektroporationsgerät</i>	Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
<i>Elektroporationsküvetten</i>	MicroPulser Cuvettes 0,4 cm (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
<i>Thermomixer</i>	Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg)
<i>Präzisions pH-Meter</i>	pH 522 (WTW, Weilheim/Ob.)
<i>96-Lochplatte</i>	flat bottom (Becton Dickinson, Heidelberg)
<i>Petrischalen</i>	Durchmesser 8,5 cm (Becton Dickinson, Heidelberg)

3.3.3 Bestrahlung

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

3.3.4 Integrinoberflächenmessung und Adhäsionsassay

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

3.3.5 Koloniebildungsassay

<i>6er-Platten</i>	Multiwell 353046 (Becton Dickinson, Heidelberg)
<i>Auflichtmikroskop</i>	STEMI SV8 (Zeiss, Oberkochen)
<i>Software</i>	Excel (Microsoft, USA)
<i>Software</i>	Sigma Plot 5,0 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath)

3.3.6 Western-Blot

<i>Elisa-Spektrometer</i>	SpectraMax 190 (Molecular Devices, Ismaning)
<i>Zentrifuge</i>	Labofuge 400R (Heraeus Kendro Laboratory Products, Hanau)
<i>Waage</i>	PT 600 (Sartorius, Göttingen)
<i>Heizplatte</i>	MR 3001 (Heidolph, Schwabach)
<i>Vortexer</i>	REAX 2000 (Heidolph, Schwabach)
<i>Schwenktisch</i>	Polymax 2040 (Heidolph, Schwabach)
<i>Rüttler</i>	KL 2 (Edmund Bühler, Tübingen)
<i>Elektrophoresesystem</i>	SE 600 (Hoefer, San Francisco, USA)
<i>Transferapparat</i>	Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech, Frankfurt)
<i>Stromquelle</i>	EPS 3500 (Amersham Pharmacia Biotech, Frankfurt)
<i>Scanner</i>	ScanJet (C6270, Epson, Meerbusch)
<i>Software</i>	ImageQuant 5.0 (Molecular Dynamics, Krefeld)
<i>Zellschaber</i>	Costar cell scraper 3010 (Corning, Niederlande)
<i>Nadel</i>	25-Gauge Nadel (Braun, Meisungen)
<i>Eppendorf-Röhrchen</i>	1,5 ml, 2 ml (Eppendorf AG, Hamburg)
<i>Mikrotiterplatte</i>	96-Well (Becton Dickinson, Heidelberg)
<i>Chromatographie Papier</i>	3MM Chr (Whatman, Cambridge, UK)
<i>Nitrocellulosemembran</i>	Protran BA 83 (Schleicher & Schuell, Dassel)
<i>Film</i>	Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences Europe, Freiburg)
<i>Filmkassette</i>	Hypercassette (Amersham Biosciences Europe, Freiburg)

3.3.7 ILK Kinase Assay

<i>Beads</i>	Protein G Agarose (Sigma-Aldrich, Hamburg)
<i>Rotationsschüttler</i>	REAX 2 (Heidolph, Schwabach)

3.3.8 Immunfluoreszenz

<i>Objektträger mit Kammer</i>	LabTek Chamberslide glass (Nunc, Wiesbaden)
--------------------------------	---

<i>Zytozentrifuge</i>	Shandon Cytospin3 (Thermo, Erlangen)
<i>Laserscanningmikroskop</i>	TCSNT (Leica Microsystems, Wetzlar)
<i>Fluoreszenzmikroskop</i>	DM LB (Leica Microsystems, Wetzlar)
<i>feuchte Kammer</i>	mit nassem Zellstoff ausgelegt

3.3.9 Zellzyklus-Analyse

siehe Kap. 3.3.4

3.4 Reagenzien

3.4.1 Zellkultur und Transfektion

<i>Trypsin</i>	Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe)
<i>DMSO</i>	Dimethyl-Sulfoxid (HybriMax, CR1194, Sigma-Aldrich, Steinheim)
<i>Restriktions-Endonuklease</i>	Pvu I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
<i>Restriktionspuffer</i>	H 10x (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
<i>G418</i>	Geneticin (Calbiochem, Bad Soden)
<i>HCl</i>	Salzsäure 37% (Merck, Darmstadt)
<i>LM-Agarose</i>	Sea Plaque Agarose (BMA, Rockland, USA)
<i>DMEM-Pulver</i>	(Gibco, Karlsruhe)
<i>NaHCO₃</i>	Natrium-Hydrogencarbonat MW 84.01 g/mol (Merck, Darmstadt)

2-fach DMEM

<i>DMEM-Pulver</i>	12,04 g
<i>NaHCO₃</i>	3,34 g

ad 300 ml Aqua bidest.; pH mit HCl auf 7,1 einstellen, dann ad 390 Aqua bidest.; 2-fach DMEM für den Gebrauch mit 100 ml FCS versetzen.

Low-Melt-Agaroselösung

<i>LM-Agarose</i>	2 g
-------------------	-----

ad 100 ml Aqua bidest.; autoklavieren und bei 37 °C inkubiert halten bis diese Temperatur erreicht ist; 5 ml pro Petrischale.

3.4.2 Integrinoberflächenmessung und Adhäsionsassay

<i>FACS Flow</i>	(Becton Dickinson, Heidelberg)
<i>Agarose</i>	(Sigma Chemical CO, St. Louis, USA)

1 g ad 100 ml Aqua bidest. autoklavieren; je 10 ml pro 8,5 cm Petrischale.

3.4.3 Koloniebildungsassay

C_2H_5OH	Ethanol vergällt (Carl Roth, Karlsruhe)
$HCHO$	Formaldehyd 4 % (Merck, Darmstadt)
CH_3OH	Methanol (Merck, Darmstadt)
CH_3COOH	Eisessig (Merck, Darmstadt)
<i>Coomassie</i>	G250 Brilliantblau (Merck, Darmstadt)

Coomassie-Blau-Lösung

CH_3OH	200 ml
CH_3COOH	75 ml
<i>Coomassie</i>	0,5 g

ad 1l Aqua bidest. Lagerung lichtgeschützt bei Raumtemperatur.

3.4.4 Western Blot

<i>NaCl</i>	Natrium-Chlorid, MW 58,44 g/mol (Merck, Darmstadt)
<i>KCl</i>	Kalium-Chlorid, MW 74,56 g/mol (Merck, Darmstadt)
Na_2HPO_4	Di-Natrium-Hydrogenphosphat, MW 141,96 g/mol (Merck, Darmstadt)
KH_2PO_4	Kalium-Hydrogenphosphat, MW 136,09 g/mol (Merck, Darmstadt)
<i>Tween</i>	Tween 20, USB (Amersham Biosciences Europe, Freiburg)
<i>Tris-HCl</i>	Tris-HCl, pH 7,4, MW 157,6 g/mol (Merck, Darmstadt)
<i>NP-40</i>	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
<i>Na-Desoxycholat</i>	Natrium-Desoxycholat MW 414,56 g/mol (Merck, Darmstadt)
<i>EDTA</i>	Ethylendiamintetraacetat (Sigma Chemical CO, St. Louis, USA)
<i>Complete</i>	Proteaseinhibitor (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
<i>BCA-Reagenz</i>	BC Assay Reagent (Interchim, Montluçon, Frankreich)

3 Material

<i>Tris-Base</i>	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
<i>Acrylamidlösung</i>	Acrylamid/bis-Acrylamid 30% (Sigma-Aldrich, Steinheim)
<i>SDS</i>	n-Dodecylsulfat Natriumsalz (Merck, Darmstadt)
<i>APS</i>	PlusOne Ammonium persulphate (Amersham Biosciences, Freiburg)
<i>TEMED</i>	PlusOne TEMED (Amersham Biosciences, Freiburg)
C_3H_8O	Isopropanol (Merck, Darmstadt)
<i>Marker</i>	BenchMark Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)
$C_3H_8O_3$	Glycerol (Merck, Darmstadt)
C_2H_6OS	β -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
<i>Bromphenolblau</i>	(Serva, Heidelberg)
<i>Glycin</i>	MW 75.07 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim)
H_3BO_3	Borsäure (Merck, Darmstadt)
<i>Ponceau S-Lösung</i>	Ponceau S (Serva, Heidelberg)
<i>Milchpulver</i>	Magermilchpulver (Merck, Darmstadt)
<i>ECL</i>	ECL™ Western Blot Detection Reagent (Amersham Biosciences, Freiburg)
<i>Entwickler</i>	GBX Developer (Kodak, Stuttgart)
<i>Fixierer</i>	GBX Fixer (Kodak, Stuttgart)

Phosphat gepufferte Salzlösung (Stammlösung, 10fach-PBS)

<i>NaCl</i>	80 g
<i>KCl</i>	2 g
Na_2HPO_4	11 g
KH_2PO_4	2 g

ad 1 l Aqua bidest. 1×PBS : 100 ml 10×PBS ad 1 l Aqua bidest.

Waschpuffer

1×PBS	2000 ml
<i>Tween</i>	2 ml

Lagerung bei 4°C.

RIPA-Lysepuffer

<i>Tris-HCL (pH 7,4)</i>	50 mM
--------------------------	-------

<i>NP-40</i>	1 %
<i>Na-Desoxycholat</i>	0,25 %
<i>NaCl</i>	150 mM
<i>EDTA</i>	1 mM

ad 50 ml Aqua bidest. Lagerung bei 4°C. Vor Gebrauch 957 µl dieser Lösung folgende Zusätze zugeben: 40 µl einer Lösung von einer Tablette Complete ad 2 ml Aqua dest., 1 µl einer 200 mM Lösung von Na₃VO₄ und 1 µl einer 200 mM Lösung von NaF.

BCA (Bicinchoninsäure)-Protein Assay

Die Gebrauchslösung besteht aus 49 Teilen Reagenz A plus 1 Teil Reagenz B, wobei sich die Menge eines Teils wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Wells} \times 200 \mu\text{l}}{50} = \text{Menge von Reagenz B (1 Teil)}$$

Lagerung bei Raumtemperatur, lichtgeschützt

Trenngelpuffer

Tris-Base 18,17 g

ad 50 ml Aqua dest., pH mit HCl auf 8,8 einstellen, Aqua dest. ad 100 ml

Sammelgelpuffer

Tris-Base 6,06 g

ad 50 ml Aqua dest., pH mit HCl auf 6,8 einstellen, Aqua dest. ad 100 ml

Trenngel

Je nach gewünschter Acrylamid-Konzentration des Geles, ergeben sich die verschiedenen Mischungsverhältnisse der Reagenzien wie folgt:

	8%	12%	15%
<i>Trenngelpuffer</i>	2,4 ml	2,4 ml	2,4 ml
<i>Aqua bidest.</i>	4,9 ml	3,5 ml	2,5 ml
<i>Acrylamidlösung</i>	2,6 ml	4 ml	5 ml
<i>SDS-Lösung 10%</i>	100 µl	100 µl	100 µl

<i>APS-Lösung 10%</i>	100 µl	100 µl	100 µl
<i>TEMED</i>	10 µl	10 µl	10 µl

Sammelgel

<i>Sammelgelpuffer</i>	0,9 ml
<i>Aqua bidest.</i>	2,25 ml
<i>Acrylamidlösung</i>	562,5 µl
<i>SDS-Lösung 10%</i>	37,5 µl
<i>APS-Lösung 10%</i>	100 µl
<i>TEMED</i>	5 µl

Ladepuffer

<i>Glycerol</i>	2 ml
<i>10% SDS-Lösung</i>	2 ml
<i>Sammelgelpuffer</i>	2,5 ml
<i>β-Mercaptoethanol</i>	0,5 ml
<i>Bromphenolblau</i>	1 mg

Aqua bidest. ad 10 ml. Lagerung bei 4°C.

Laufpuffer

<i>Glycin</i>	14,41 g
<i>Tris-Base</i>	3,03 g
<i>SDS</i>	1 g

Aqua bidest. ad 1 l. Lagerung bei 4°C.

Anodenpuffer

<i>Borsäure</i>	3,1 g
<i>SDS-Lösung</i>	10% 4 ml
<i>Methanol</i>	200 ml

ad 1 l Aqua bidest. pH-Wert mit NaOH auf 9,0 einstellen. Lagerung bei 4°C.

Kathodenpuffer

<i>Borsäure</i>	3,1 g
<i>SDS-Lösung 10%</i>	4 ml
<i>Methanol</i>	50 ml

ad 1 l Aqua bidest. pH-Wert mit NaOH auf 9,0 einstellen. Lagerung bei 4°C.

Blocking Puffer

<i>Milchpulver</i>	5 g
--------------------	-----

ad 100 ml PBS, Lagerung bei 4 °C nicht länger als 24 Stunden.

ECL™ Western Blot Detection Reagent

ECL Reagenz 1 und Reagenz 2 zu gleichen Teilen mischen. Die benötigte Menge errechnet sich aus der Größe der Membran wie folgt:

$$0,3 \frac{\text{ml}}{\text{cm}^2} \times \text{Membranfläche}[\text{cm}^2] = \text{anzusetzende Menge Reagenz}$$

Entwickler

<i>GBX Developer</i>	100 ml
<i>Aqua bidest</i>	400 ml

Fixierer

<i>GBX Fixer</i>	100 ml
<i>Aqua bidest</i>	400 ml

3.4.5 ILK Kinase Assay

<i>10x Zell-Lysepuffer</i>	(Cell Signaling, Frankfurt)
<i>10x Kinasepuffer</i>	(Cell Signaling, Frankfurt)
<i>GSK3β-Fusionsprotein</i>	(Cell Signaling, Frankfurt)
<i>ATP</i>	(Cell Signaling, Frankfurt)

Der 10x Zell-Lysepuffer wurde nach Verdünnung mit Aqua bidest. mit 40 µl/ml Complete versetzt.

3.4.6 Immunfluoreszenz

<i>DAPI</i>	4',6-Diamidino-2-phenylindol-2 HCl (Serva, Heidelberg)
<i>Phalloidin, FITC konj.</i>	1 mg/ml Ethanol (Sigma-Aldrich, Hamburg)
<i>Phalloidin, TRITC konj.</i>	1 mg/ml Ethanol (Sigma-Aldrich, Hamburg)
<i>Einbettflüssigkeit</i>	Vectashield H-1000 (Vector, Burlingame USA)
<i>Einbettflüssigkeit-DAPI</i>	DAPI-Vectashield (Vector, Burlingame USA)
<i>PFA</i>	Paraformaldehyd 4 % (Sigma-Aldrich, Hamburg)
<i>Triton X-100</i>	(Sigma-Aldrich, Hamburg)
<i>Bovines Serumalbumin</i>	Fraktion V A4503, 1% BSA in 1×PBS (Sigma-Aldrich, Hamburg)

3.4.7 Zellzyklus-Analyse

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

3.5 Rezeptorliganden

<i>Fibronektin</i>	1 mg/ml (Becton Dickinson, Heidelberg)
<i>Vitronektin</i>	(Becton Dickinson, Heidelberg)
<i>Kollagen III</i>	(Calbiochem, Bad Soden)
<i>Laminin</i>	(Sigma-Aldrich, Hamburg)
<i>Poly-L-Lysin</i>	1 mg/ml (Calbiochem, Bad Soden)
<i>EGF</i>	200 µg/ml (Calbiochem, Bad Soden)

3.6 Inhibitoren

<i>Ly294002</i>	PI3K-Inhibitor 1250 µM in Ethanol (Calbiochem, Bad Soden)
<i>Wortmannin</i>	PI3K-Inhibitor 100 µM in DMSO (Sigma-Aldrich, Hamburg)
<i>BIBX1382BS</i>	RTK-Inhibitor 20 mM in DMSO (Boehringer Ingelheim, Wien, Österreich)

3.7 Antikörper

3.7.1 Primärantikörper

<i>ILK</i>	monoklonal, Maus IgG1, (Becton Dickinson, Heidelberg) WB 1:500 MiPu, IF 1:100 BSA
<i>AKT</i>	polyklonal, Hase IgG, (Cell Signaling, Frankfurt a.M.) WB 1:500 MiPu, IF 1:100 BSA
<i>phospho-AKT S⁴⁷³</i>	polyklonal, Hase IgG, (Cell Signaling, Frankfurt a.M.) WB 1:250 MiPu
<i>phospho-AKT T³⁰⁸</i>	polyklonal, Hase IgG, (Cell Signaling, Frankfurt a.M.) WB 1:250 PBS Tween
<i>GSK3β</i>	monoklonal (Cl.7), Maus IgG1, (Becton Dickinson, Heidelberg) WB 1:500 MiPu
<i>phospho-GSK3β S⁹</i>	polyklonal, Hase IgG, (Cell Signaling, Frankfurt a.M.) 1:250 MiPu
<i>Cyclin D1</i>	monoklonal (Cl.DCS-6), Maus IgG2a, (Becton Dickinson, Heidelberg) WB 1:250 MiPu
<i>MAPK</i>	polyklonal, Hase IgG, (Cell Signaling, Frankfurt a.M.) WB 1:500 MiPu
<i>phospho-MAPK</i>	polyklonal, Hase IgG, (Cell Signaling, Frankfurt a.M.) WB 1:250 MiPu
<i>EGFR</i>	polyklonal, Hase IgG, (eBioscience, San Diego) WB 1:200 MiPu, IF 1:75 BSA
<i>phospho-EGFR Y¹¹⁷³</i>	polyklonal, Hase IgG, (Biosource, Solingen) WB 1:250 MiPu
<i>FAK</i>	monoklonal, Maus IgG, (Becton Dickinson, Heidelberg) WB 1:2000 MiPu
<i>phospho-FAK Y³⁹⁷</i>	polyklonal, Hase IgG, (Calbiochem, Bad Soden) WB 1:500 MiPu

<i>phospho-FAK Y⁹²⁵</i>	polyklonal, Ziege IgG, (Santa Cruz, Heidelberg) WB 1:200 MiPu
<i>β-Actin</i>	monoklonal (Cl.AC-15), Maus IgG1, (Sigma-Aldrich, Hamburg) WB 1:2000 MiPu
<i>BrdU</i>	monoklonal, Maus IgG1, (Becton Dickinson, Heidelberg) DZ 1:10 BSA
<i>β₁-Integrin</i>	monoklonal, Maus IgG, (Becton Dickinson, Heidelberg) DZ 1:10
<i>α₅-Integrin</i>	monoklonal, Maus IgG, (Becton Dickinson, Heidelberg) DZ 1:10
<i>Negativkontrolle FITC</i>	monoklonal, Maus IgG1, (Serotec, Düsseldorf) DZ 1:10

3.7.2 Sekundärantikörper

<i>mouse IgG, HRP konj.</i>	polyklonal, Hase, (Santa Cruz, Heidelberg) WB 1:2000 MiPu
<i>rabbit IgG, HRP konj.</i>	polyklonal, Ziege, (Santa Cruz, Heidelberg) WB 1:2000 MiPu
<i>goat IgG, HRP konj.</i>	polyklonal, Esel, (Santa Cruz, Heidelberg) WB 1:2000 MiPu
<i>mouse IgG, Cy2 konj.</i>	polyklonal, Ziege, (Dianova, Hamburg) IF 1:100 BSA
<i>rabbit IgG, Cy3 konj.</i>	polyklonal, Ratte, (Dianova, Hamburg) IF 1:100 BSA
<i>mouse IgG, FITC konj.</i>	polyklonal, Hase, (DAKO, Glostrup, Dänemark) DZ 1:50 BSA

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Subkultivierung

Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂ Gehalt von 10% und einem pH von 7,4 kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70-90% wurden die Zellen einmal mit Trypsin gespült, anschließend abtrypsiniert und im Verhältnis 1 : 4 – 1 : 10 passagiert.

4.1.2 Einfrieren

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

4.1.3 Auftauen

Das Kryoröhrchen wurde zügig erwärmt und der Inhalt in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit 12 ml Medium gegeben. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

4.2 Transfektion

4.2.1 Ermittlung der optimalen G418-Konzentration

Subkonfluente Zellen wurden abtrypsiniert und in 10 Petrischalen mit je 200.000 Zellen ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von G418 (0 – 2000 µg/ml) inkubiert, wobei regelmäßig nach 48 Stunden ein Mediumwechsel erfolgte. Die Konzentration von 2000 µg/ml war die optimale G418-Konzentration für die verwendete Zelllinie.

4.2.2 Ermittlung der optimalen Zellzahl

Zur Bestimmung der optimalen Zellzahl wurden subkonfluente Zellen abtrypsiniert und in 10 Petrischalen mit verschiedenen Zellzahlen (50.000 - 2.000.000 Zellen) ausgesät, wobei nach 24 Stunden die Behandlung mit der vorher ermittelten G418-Konzentration von 2000 µg/ml begonnen wurde. Alle 2 Tage wurde das G418 enthaltende Medium erneuert. Die optimale Zellzahl für die verwendete Zelllinie betrug 200.000 Zellen pro Petrischale.

4.2.3 Restriktion des Plasmids

Das entsprechende Plasmid wurde wie folgt mit Restriktionspuffer H 10x und H₂O verdünnt:

<i>Plasmid-DNA</i>	5 µg
<i>Restriktionspuffer H 10x</i>	5 µl
<i>H₂O</i>	35 µl

Nach Zugabe von 5 µl Pvu I erfolgte die Restriktion für 30 Minuten bei 37 °C.

4.2.4 Elektroporation und Genklonierung

Nach Abtrypsinieren und waschen (Zentrifugation: 800 rpm, 5 Minuten) wurden die Zellen in DMEM ohne FCS aufgenommen und je 5.000.000 Zellen in eine Elektroporations-Küvette pipettiert. Dazu kam 5 µg restringiertes Plasmid. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 0,220 kV und einer Kapazität von 0,950 µF. Im Anschluss wurden die Zellen 10 Minuten lang auf Eis gekühlt und dann mit Kulturmedium auf 175 cm² Flaschen verteilt.

4.2.5 Selektion der transfizierten Zellen

Nach 24 Stunden wurde den Zellen G418 in einer Konzentration von 2000 µg/ml zugegeben und alle 2 Tage erneuert. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen, die ebenfalls mit dem Antibiotikum behandelt wurden. Diese Behandlung wurde 10 Wochen fortgesetzt bis die transfizierten Zellen selektioniert waren.

4.2.6 Klonisolierung

Die selektionierten Transfektanten wurden in Petrischalen zu je 5000 Zellen ausgesät. Diese wurden so lange kultiviert bis Kolonien mit 50 Zellen sichtbar waren, wobei die

geeigneten Kolonien mit einem Stift unter dem Mikroskop markiert wurden. Die 37 °C warme Low-Melt-Agaroselösung wurde 1:1 mit 2-fach DMEM vermischt und zügig in die Petrischalen gefüllt (10 ml pro Schale). Nachdem der Agar unter der Sterilbank ausgehärtet war, wurde mit einer 100 µl-Pipette 10 µl Trypsin unter die Agarose gespritzt und nach vorsichtigem Abkratzen der Zellen wieder aufgenommen. Der so gewonnene Zellklon wurde zunächst in der Vertiefung einer 96-Lochplatte unter Selektionsdruck mit G418 angezchtet und später in Kulturflaschen umgesetzt.

4.3 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte bei 20 °C Raumtemperatur (RT). Die Anodenspannung der Röntgenröhre betrug 240 kV, der Anodenstrom 13 mA und die Dosisleistung \approx 1 Gy/min. Zwischen Röhre und Probe bestand ein Abstand von 22 cm, wobei die Stahlung mittels einer 3 mm dicken Berylliumplatte gefiltert wurde. Die applizierte Dosis wurde mit einem Dosimeter, das zuvor anhand eines Prüfstrahlers kalibriert worden war, gemessen.

4.4 Integrinoberflächenmessung

4.4.1 Ansatz

Nach Trypsinierung wurden die Zellen einmal gewaschen und in DMEM mit bzw. ohne FCS aufgenommen. Um die Zellen für verschiedene Zeiten in Suspension zu halten wurde zunächst Agarose (0,01 g/ml) in Aqua bidest. erhitzt und in Petrischalen gegossen. Der nach Abkühlung entstandene Agar verhinderte die Adhäsion der Zellen.

4.4.2 Messung

Vor und nach Inkubation mit dem Primärantikörper für 30 Minuten wurden die Zellen aus den Petrischalen in Falcon-Röhrchen überführt und 2 mal mit eiskaltem 1×PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper wirkte ebenfalls 30 Minuten ein. Danach wurden die Zellen mit 1000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert und das Pellet in FACS Flow gelöst. Zur Messung diente ein FACS-Gerät.

4.4.3 Auswertung

Die unterschiedliche Oberflächenexpression der Integrine nach den jeweiligen Zeiten in Suspension wurde mittels der Analyse-Software CELLQuest ermittelt.

4.5 Adhäsionsassay

4.5.1 Ansatz

Subkonfluente Zellen wurden abtrypsiniert und in 175 cm²-Kulturflaschen, die mit Fibronectin (1 µg/cm²) beschichtet waren, mit folgenden Zellzahlen ausgesät: ILK^{fl/fl} 5 Mio Zellen pro Flasche, ILK^{-/-} 8 Mio Zellen pro Flasche. Nach 24 Stunden in Adhäsion wurden die Zellen mittels Trypsin gelöst, einmal mit DMEM ohne FCS gewaschen (Zentrifugation: 800 rpm, 3 Minuten) und für eine Stunde in mit autoklaviertem Agar (0,01 g/ml) ausgegossenen Petrischalen für eine Stunde in Suspension gehalten, wobei eine Flasche auf 2 Petrischalen aufgeteilt wurde. Je nach Bedingung wurden die Zellen mit Ly294002 (20 µM) für 15 Minuten oder mit Wortmannin (100 nM) für 1 Stunde behandelt sowie mit 4 Gy bestrahlt.

4.5.2 Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden in mit Fibronectin (1 µg/cm²) beschichtete Kammern der Objektträger ausgesät. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die Zellen wie in Kap. 4.9 beschrieben fixiert und gefärbt.

4.5.3 Western-Blot

Die Zellen aus einer mit Agar ausgegossenen Petrischale wurden jeweils in eine mit Fibronectin (1 µg/cm²) beschichtete Petrischale überführt, gegebenenfalls mit 10% Serum versetzt und für verschiedene Zeiten im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Zellen wie in Kap. 4.7.2 lysiert.

4.5.4 Koloniebildungsassay

Nach einer Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen mit und ohne Serum nach den in Tab. 4.1 angegebenen Zellzahlen in mit Fibronectin (1 µg/cm²) beschichteten 6er-Platten ausgesät und gegebenenfalls zu bestimmten Zeitpunkten mit 4 Gy bestrahlt.

Nach 6 Stunden folgte bei allen Platten ein Mediumwechsel mit Kulturmedium. Nach 7 Tagen wurden die Platten wie in Kap. 4.6.2 beschrieben abgestoppt und ausgewertet.

Behandlung	ILK ^{fl/fl}	ILK ^{-/-}
<i>+FCS +Fibronektin</i>		
keine	2000	2000
Bestrahlung 4 Gy	4000	4000
<i>-FCS +Fibronektin</i>		
keine	2000	2000
Bestrahlung 4 Gy	4000	4000

Tabelle 4.1: Beim Adhäsions Assay verwendete Zellzahlen (Zellen pro Vertiefung)

4.6 Koloniebildungsassay

Der Koloniebildungsassay, welcher das klonogene Überleben erfasst, kann als Untersuchungsmethode für die Sensibilität verschiedener Zellen gegenüber genotoxischen Einflüssen dienen. Hierzu wird eine definierte Zellzahl ausgesät und nach entsprechendem Protokoll behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 7–11 Tagen werden die Kolonien angefärbt und gezählt (vgl. [176]).

4.6.1 Ansatz

Die 6er-Platten wurden mit Fibronektin oder dem Kontrollsubstrat Poly-L-Lysin (1 µg/cm²) eine Stunde bei Raumtemperatur beschichtet. Für die Versuche wurden subkonfluent wachsende Zellen abtrypsiniert. Nachdem die Zellen einmal gewaschen und bei 800 rpm 5 Minuten zentrifugiert worden waren, wurde das Zellpellet vorsichtig mit DMEM ohne FCS resuspendiert. Daraufhin folgte eine Zellzahlbestimmung. Je nach Bedingung wurden verschiedene Zellzahlen mit und ohne FCS ausgesät und für 24 Stunden kultiviert (siehe Tab. 4.2).

4.6.1.1 Bestrahlung nach 24 Stunden

Nach einer Bebrütungszeit von 24 Stunden in Adhäsion wurden die verschiedenen Zelllinien mit 2 – 6 Gy bestrahlt. Anschließend wurde ein Mediumwechsel mit DMEM (+1% NEA +10% FCS) durchgeführt. Die Platten mit den ILK^{fl/fl} und ILK^{-/-} wurden bei 37 °C, 10% CO₂ 7 Tage, die FaDu-Klone 11 Tage belassen.

Behandlung	Dosis	ILK ^{fl/fl}	ILK ^{-/-}	FaDu EV	FaDu IW	FaDu IH
<i>+FCS +Poly-L-Lysin</i>						
keine		500	500	500	500	500
Bestrahlung [Gy]	2	500	500	1000	1000	1000
Bestrahlung [Gy]	4	1000	1000	3000	3000	3000
Bestrahlung [Gy]	6	3000	3000	6000	6000	6000
<i>-FCS +Poly-L-Lysin</i>						
keine		2000	2000	3000	3000	3000
Bestrahlung [Gy]	2	2000	2000	6000	6000	6000
Bestrahlung [Gy]	4	4000	4000			
Bestrahlung [Gy]	6	8000	8000			
<i>+FCS +Fibronektin</i>						
keine		500	500	500	500	500
Bestrahlung [Gy]	2	500	500	1000	1000	1000
Bestrahlung [Gy]	4	1000	1000	3000	3000	3000
Bestrahlung [Gy]	6	3000	3000	6000	6000	6000
<i>-FCS +Fibronektin</i>						
keine		1000	1000	1000	1000	1000
Bestrahlung [Gy]	2	1000	1000	2000	2000	2000
Bestrahlung [Gy]	4	2000	2000			
Bestrahlung [Gy]	6	6000	6000			

Tabelle 4.2: Beim Koloniebildungstest verwendete Zellzahlen (Zellen pro Vertiefung)

4.6.1.2 Bestrahlung und Behandlung mit BIBX

23 Stunden nach Aussaat der Zellen wurde dem Medium DMSO (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) oder BIBX (Endkonzentration 20 μM) beigelegt. Nach einer weiteren Stunde folgte je nach Bedingung eine Bestrahlung mit 2 Gy, woran sich eine Inkubation von 2 Stunden anschloss. Daraufhin wurden die Zellen einmal gewaschen und in DMEM (+1%NEA +10%FCS) kultiviert, wobei die Platten mit ILK^{fl/fl} und ILK^{-/-} nach 7 Tagen, die mit den verschiedenen FaDu-Klonen nach 11 Tagen ausgewertet wurden.

4.6.2 Fixierung

Nach Entfernung des Mediums wurden die Wells mit 2 ml 1 \times PBS gespült. 1 ml von 4%iger Formaldehydlösung wurde pro Vertiefung zugegeben und für 30 Minuten belassen. Anschließend wurden die Platten für 30 Minuten mit 1 ml 70% Ethanol behandelt und

danach mit Wasser gespült. Die Kolonien ließen sich dann mit Coomassie anfärben.

4.6.3 Auswertung

Die Kolonien wurden mit einem Auflichtmikroskop ausgezählt, wobei eine Kolonie als eine Anhäufung von mehr als 50 Zellen definiert war. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und die Werte jedes Experiments auf die verwendete Zellzahl und auf die Kontrolle abgeglichen.

4.7 Western Blot

Mittels Elektrophorese können die verschiedenen Proteine eines Zellysats aufgetrennt werden. Beim SDS-Page erfolgt dies fast ausschließlich nach dem Molekulargewicht, da die Proteine durch das SDS eine stark negative Ladung erhalten und dadurch ihre eigene Ladung vernachlässigbar wird. Nach der Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine durch Anlegen einer Spannung vom Gel auf eine Membran transferiert (Blotten). Der Nachweis erfolgt durch Aufbringen spezifischer Primärantikörper, die in einem zweiten Schritt durch einen Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper gebunden werden. Dieses Enzym («horseradish peroxidase», HRP) katalysiert die Freisetzung von H_2O_2 , welches mit dem ebenfalls zugegebenen Luminol reagiert. Die relative Intensität des hierbei entstehende Licht kann mittels Auflegen eines Films gemessen werden.

4.7.1 Ansatz

Zunächst wurden Petrischalen mit Fibronectin oder Poly-L-Lysin ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) bei Raumtemperatur für eine Stunde beschichtet. Daraufhin wurden subkonfluente Zellen abtrypsinisiert, einmal gewaschen (Zentrifugation mit 800 rpm, 5 Minuten) und dann je nach Versuchsablauf in Medium mit oder ohne FCS bei 37°C und 10% CO_2 für 23 Stunden belassen. Die entsprechenden Zellzahlen sind der Tabelle 4.3 zu entnehmen.

4.7.1.1 Austestung der BIBX-Konzentration

Hierfür wurden nach 23 Stunden in Adhäsion Zellen BIBX in den Konzentrationen 1, 5 und $20 \mu\text{M}$ bzw. mit dem Lösungsvermittler DMSO ($1 \mu\text{l}/\text{ml}$) inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten zur Kontrolle. Jeweils nach 15 Minuten bzw. einer Stunde BIBX-Exposition wurden die Zellen mit EGF ($10 \text{ ng}/\text{ml}$) stimuliert und nach weiteren 15 Minuten lysiert.

Bedingungen	ILK ^{fl/fl}	ILK ^{-/-}	FaDu EV	FaDu IW	FaDu IH
<i>Lysate nach 24 Stunden</i>					
+FCS +Poly-L-Lysin	1,8 Mio	2,7 Mio	2,0 Mio	2,5 Mio	2,0 Mio
-FCS +Poly-L-Lysin	2,7 Mio	3,5 Mio	3,0 Mio	3,5 Mio	3,0 Mio
+FCS +Fibronectin	1,6 Mio	2,4 Mio	2,0 Mio	2,5 Mio	2,0 Mio
-FCS +Fibronectin	2,4 Mio	3,2 Mio	3,0 Mio	3,5 Mio	3,0 Mio
<i>Lysate nach 11 Tagen</i>					
+FCS +Poly-L-Lysin			50.000	50.000	50.000
-FCS +Poly-L-Lysin			100.000	100.000	100.000
+FCS +Fibronectin			50.000	50.000	50.000
-FCS +Fibronectin			50.000	50.000	50.000

Tabelle 4.3: Beim Western Blot verwendete Zellzahlen (Zellen pro Petrischale)

4.7.1.2 Untersuchung des BIBX-Effekts nach 11 Tagen

23 Stunden nach Aussaat erfolgte eine Zugabe von BIBX (20 μ M) bzw. DMSO (1 μ l/ml). Nach 3 Stunden wurden die Zellen gewaschen, um den Inhibitor vollständig zu entfernen, und anschließend in DMEM (+1% NEA +10% FCS) für 11 Tage kultiviert.

4.7.2 Proteinextraktion

Vor der Lyse wurde die Petrischale auf 4 °C gekühlt, das Medium abgenommen und zweimal mit eiskaltem 1×PBS gespült. Unter Zugabe von 200 μ l RIPA-Lysepuffer (mit Zusätzen) wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach 15 Minuten wurde das Lysat fünfmal durch eine 25-Gauge Nadel gezogen und dann für weitere 15 Minuten gekühlt. Anschließend folgte eine 20-minütige Zentrifugation mit 13.000 rpm. Der Überstand wurde als fertiges Gesamtzelllysate in ein neues Probenröhrchen überführt und bei -130 °C gelagert.

4.7.3 Proteinbestimmung

Um die Expression einzelner Proteine in verschiedenen Lysaten miteinander vergleichen zu können, wurde auf einem Gel von jeder Probe die gleiche Menge an Gesamtprotein aufgetragen. Hierzu wurde vorher die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt¹.

¹Dieser Assay basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ , das in einem weiteren Schritt mit BCA (Bicinchoninsäure) einen blauvioletten Komplex bildet (Biuret-Reaktion, vgl. [191])

Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA (2 mg/ml) verwendet, die in vier Schritten jeweils um den Faktor 2 mit RIPA-Lysepuffer (ohne Zusätze) verdünnt wurde. Als Leerwert diente unverdünnter RIPA-Lysepuffer. Von allen Werten wurden je zweimal 10 µl auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend mit 200 µl BCA-Reagenz vermischt.

Die Absorptionsmessung erfolgte mittels eines ELISA-Spektrometers bei einer Wellenlänge von 562 nm.

4.7.4 SDS-Gelelektrophorese und Proteintransfer

Anhand der Proteinbestimmung wurde 30 – 150 µg Protein mit Ladepuffer vermischt und 5 Minuten im Wasserbad gekocht. Danach schloss sich eine kurze Zentrifugation mit 4000 rpm an.

4.7.4.1 SDS-Gelelektrophorese

Die Proben wurden der Reihe nach auf das entsprechende Gel aufgetragen, wobei ein Slot für den molekularen Marker blieb. Nachdem das befüllte Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt war, wurde Lauffpuffer aufgefüllt und die Elektrophorese gestartet (Einstellung: 25 mA pro Gel, $U_{max} = 350$ V).

4.7.4.2 Proteintransfer

Sobald die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Zum Transferieren der Proteine auf die Membran diente ein Blotting-Gerät, das mit Halbtrocken-Technik («semi-dry») arbeitete. Die Membran² wurde auf die zur Anode liegende Seite des Gels gelegt. Dann folgten oben und unten drei Schichten Chromatographie Papier, die im entsprechenden Puffer getränkt waren. Der Transfer fand bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA} \times \text{Membranfläche}[\text{cm}^2]$ über einen Zeitraum von 2 Stunden statt. Um das Blot-Ergebnis zu beurteilen und den Marker anzuzeichnen, wurde die Membran anschließend mit Ponceau S-Lösung gefärbt.

4.7.5 Detektion

Die Membran wurde für 5 Minuten in 1×PBS und anschließend für weitere 60 Minuten in 5% Milchpulver 1×PBS geblockt³. Der gemäß Kapitel 3.7 verdünnte Primärantikörper

²in Anodenpuffer getränkt

³Dadurch werden unspezifische Bindungsstellen besetzt

inkubierte auf dem Schwenktisch für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Danach wurde die Membran dreimal 5 Minuten mit PBST gewaschen. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur, wurde die Membran erneut sechsmal 5 Minuten mit PBST gewaschen. Zur Detektion wurde gleichmäßig ECL aufgetragen und die entstehende Lumineszenz auf Film festgehalten.

4.7.6 Auswertung

Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageQuant. Die Filme wurden hierzu mit einem Scanner eingelesen und die Schwärzung der Banden quantitativ bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden diese Werte auf ein «housekeeping»-Protein⁴ (hier β -Aktin) anhand der folgenden Formel normiert:

$$Expression_{Protein} = \frac{Volumen_{Protein}}{Volumen_{\beta-Aktin}}$$

Die Werte eines Immunblots sind relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben.

4.8 ILK Kinase Assay

4.8.1 Ansatz

Hierfür wurden subkonfluente Zellen abtrypsinisiert, in Poly-L-Lysin beschichtete Petrischalen ausgesät und 24 Stunden in DMEM (+1% NEA +10% FCS) kultiviert.

4.8.2 ILK Immunpräzipitation

Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem 1xPBS gewaschen und für 10 Minuten mit 1 ml 1x Zell-Lysepuffer inkubiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vorsichtig gelöst und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Anschließend folgte eine Zentrifugation mit 13.000 rpm für 10 Minuten. Daraufhin wurde die Proteinmenge des Überstands anhand eines BCA-Assays ermittelt. Für die Immunpräzipitation von ILK diente 3 μ g Primärantikörper, der mit 500 μ g Protein auf dem Rotationsschüttler über Nacht inkubierte. Nach Zugabe von 100 μ l G-Agarose-Beads wurde das Lysat für 3 weitere Stunden bei Raumtemperatur in Bewegung gehalten. Danach schloss sich eine Zentrifugation mit 13.000 rpm für 30 Sekunden an, wobei das

⁴Dieses besitzt einen relativ konstanten Anteil am Gesamtprotein einer Zelle

Pellet sowohl einmal mit 500 µl 1x Zell-Lysepuffer, als auch mit 500 µl 1x Kinasepuffer gewaschen wurde.

4.8.3 Kinase Assay

Dem Präzipitat wurden folgende Substanzen beigefügt:

<i>1x Kinasepuffer</i>	40 µl
<i>ATP</i>	200 µM
<i>GSK3-Fusionsprotein</i>	1 µg

Nach 30-minütiger Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von Ladepuffer beendet. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation mit 13.000 rpm für 2 Minuten. Der Überstand wurde 5 Minuten gekocht und auf ein 15% Gel aufgetragen.

4.8.4 Western Blot und Detektion

Der Western Blot wurde gemäß Kapitel 4.7 durchgeführt. Um die relative Kinaseaktivität von ILK zu ermitteln, wurde phospho-GSK3β Serin 9 detektiert.

4.9 Immunfluoreszenz

4.9.1 Ansatz

Subkonfluente Zellen wurden abtrypsiniert und je nach geplante Versuchsaufbau mit oder ohne FCS in die mit Poly-L-Lysin oder Fibronectin (1 µg/cm²) beschichteten Kammern der Objektträger ausgesät (30.000 Zellen pro Kammer).

4.9.2 Fixierung

Nach Abnahme des Medium wurden die Zellen mit 1 ml NaCl (0,9%) gespült. Anschließend folgte die Fixierung mittels 4%-iger Paraformaldehydlösung für 10 Minuten, bevor die Zellen mit 0,1% Triton X-100 Lösung für 5 Minuten permeabilisiert und daraufhin erneut dreimal für 3 Minuten mit NaCl gewaschen wurden.

4.9.3 Färbung

Nach einer Blocking-Zeit von 30 Minuten in BSA-Lösung (2 mg/ml in Aqua dest.) schloss sich eine einstündige Inkubation des Primärantikörpers (Verdünnung siehe 3.7) an,

wozu eine feuchte, vor Licht schützende Kammer Verwendung fand. Die Zellen wurden danach viermal für 5 Minuten mit NaCl gewaschen und mit dem Sekundärantikörper für eine weitere Stunde inkubiert. Je nach gewünschter Färbung wurden FITC (1:100) oder TRITC (1:2000) zugefügt. Für die Anfärbung des Zellkerns diente DAPI (1:100 in BSA), welches für 5 Minuten einwirkte. Nachdem die Zellen erneut sechsmal mit NaCl gespült worden waren, wurde die Kammer entfernt und die gefärbten Zellen mit Vectashield und Deckgläschen eingedeckt.

4.9.4 Bildaquisition

Zur Visualisierung der Immunfluoreszenzen diente ein Laserscanningmikroskop. Es wurden drei Bilder bei verschiedenen Wellenlängen aufgenommen und mittels TCS Software kombiniert.

4.10 Wachstumskurve

4.10.1 Ansatz

Hierfür wurden 25 cm²-Kulturflaschen mit Poly-L-Lysin oder Fibronectin für eine Stunde bei Raumtemperatur beschichtet. Nach Abtrypsinierung wurden die Zellen einmal gewaschen (Zentrifugation: 800 rpm, 5 Minuten) und in DMEM ohne Serum aufgenommen. Um für alle Werte der Wachstumskurve die gleiche Ausgangszellzahl auszusäen, wurden Zellsuspensionen (5000 Zellen/ml) mit und ohne FCS angesetzt und jeweils 5 ml davon auf die einzelnen Flaschen verteilt. Nach 23 Stunden folgte die Zugabe von DMSO (1 µl/ml) oder BIBX (Endkonzentration 20 µM), wobei sich der Versuchsbedingung entsprechend eine Stunde später eine Bestrahlung mit 2 Gy anschloss. Zwei Stunden danach wurden die Zellen einmal gewaschen und dann für 11 Tage in DMEM (+1% NEA +10% FCS) kultiviert.

4.10.2 Zählung

Zunächst wurde jeder Flasche exakt 2 ml Trypsin beigefügt, wobei darauf geachtet wurde dass nach Inkubation von 5 Minuten alle Zellen abgelöst waren. Dann folgte die Zugabe von DMEM (+1% NEA +10% FCS). Zur Kontrolle wurde das Volumen der Zellsuspension gemessen. Zur Bestimmung der Zellzahl diente die Neubauer Zählkammer.

4.10.3 Auswertung

Die ermittelten Zellzahlen wurden relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben. Die graphische Darstellung erfolgte mit Sigma-Plot.

4.11 Zellzyklus-Analyse

4.11.1 Ansatz

Subkonfluente Zellen wurden abtrypsiniert, einmal gewaschen (Zentrifugation: 800 rpm, 5 Minuten) und in DMEM ohne Serum aufgenommen. Nach einer Zellzahlbestimmung wurden je 25.000 Zellen in mit Poly-L-Lysin oder Fibronectin beschichtete 25 cm²-Kulturflaschen mit und ohne FCS ausgesät und für 23 Stunden kultiviert. Dann folgte eine Inkubation mit DMSO (1 µl/ml) oder BIBX (Endkonzentration 20 µM) für 3 Stunden, bevor die Zellen einmal gewaschen und in Kulturmedium für 11 Tage belassen wurden.

4.11.2 Fixierung

Dem Medium wurde BrdU (Endkonzentration 10 µM) beigefügt, welches für 10 Minuten einwirkte. Dann wurden die Zellen abtrypsiniert, mit eiskaltem 1×PBS gewaschen (Zentrifugation: 1000 rpm, 3 Minuten) und in Ethanol (80%) fixiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

4.11.3 Messung

Nach Zugabe von 2 ml Ethanol zu einem Aliquot von 1 Mio fixierter Zellen, folgte eine Zentrifugation mit 1000 rpm für 8 Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und dem Pellet 2 ml Ribonuklease A beigefügt. Dann wurden die Zellen erneut zentrifugiert. Daran schloss sich eine Inkubation mit Pepsin bei 37 °C für 10 Minuten an, bevor die Zellen mit 3 ml eiskaltem 1×PBS verdünnt und für weiter 5 Minuten auf Eis gekühlt wurden. Nach erneuter Zentrifugation wurde 2 ml 2N HCl zugegeben und bei Raumtemperatur für 10 Minuten belassen. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit 1×PBS und einmal mit BSA-Lösung (1% in 1×PBS) gewaschen und anschließend mit 200 µl Anti-BrdU Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte eine Zentrifugation und die Zugabe des Sekundärantikörpers, der für 30 Minuten lichtgeschützt einwirkte, bevor die Zellen erneut zentrifugiert wurden. Nachdem die Zellen einmal mit 500 µl Propidium Jodid gewaschen worden waren, wurde 250 µl

Propidium Jodid hinzupipettiert und 30 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Zur Messung diente ein FACS-Gerät.

4.11.4 Auswertung

Die Verteilung der Zellen in den verschiedene Zellzyklus-Phasen wurde mittels der Analyse-Software CELLQuest anhand von DNA-Streudiagrammen ermittelt.

4.12 Statistik

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

5 Ergebnisse

5.1 In Suspension zeigen murine Fibroblasten eine verstärkte Oberflächenexpression von β_1 - und α_5 -Integrinen

Integrinen wird neben der Vermittlung der Adhäsion auch eine wichtige Rolle bei der Metastasierung von Tumorzellen zugesprochen. In diesem Zusammenhang wurde im folgenden untersucht, inwieweit Verlust von Adhäsion in Abhängigkeit von ILK die Oberflächenexpression von β_1 - und α_5 -Integrinen verändert. Dazu wurden ILK-exprimierende ($ILK^{fl/fl}$) und ILK-defiziente ($ILK^{-/-}$) Fibroblasten für verschiedene Zeitspannen in Suspension gehalten und anschließend die an der Membran befindlichen Integrine bestimmt.

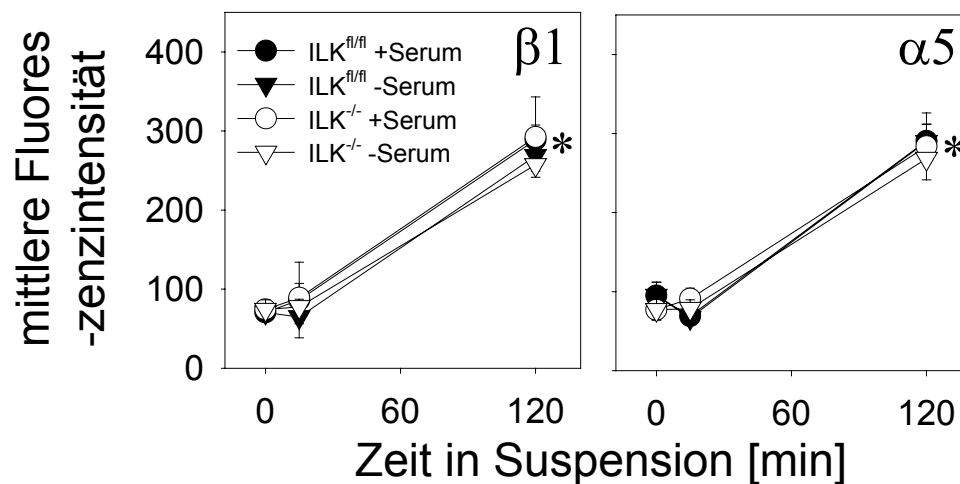


Abbildung 5.1: Durch Verhinderung der Adhäsion kam es bei $ILK^{fl/fl}$ und $ILK^{-/-}$ Zellen sowohl in Gegenwart (+S), als auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren (-S) nach 2 Stunden in Suspension zu einer deutlich erhöhten Oberflächenexpression von β_1 - und α_5 -Integrinen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Bei der statistischen Analyse wurden die Messwerte bei den verschiedenen Zeitwerten in Suspension mit den jeweiligen Kontrollen ohne Suspension (*) verglichen. * $p < 0.05$

Wie in Abb. 5.1 zu sehen, kam es bei Verlust der Adhäsion für zwei Stunden in den Fibroblasten zu einer signifikant erhöhten Oberflächenexpression von β_1 - und α_5 -Integrinen. Dieser Effekt war in beiden Zelllinien nachweisbar, zeigte sich also unabhängig von ILK, und wurde auch nicht durch das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren

beeinflusst.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde nun untersucht, inwieweit die Adhäsion auf Fibronektin die Organisation des Aktinzytoskeletts sowie die Phosphorylierung und Expression verschiedener Signalmoleküle von zunächst in Suspension gehaltenen Zellen moduliert.

5.2 ILK^{-/-} Zellen weisen einen Zellausbreitungsdefekt und eine gestörte Organisation des Aktinzytoskeletts auf

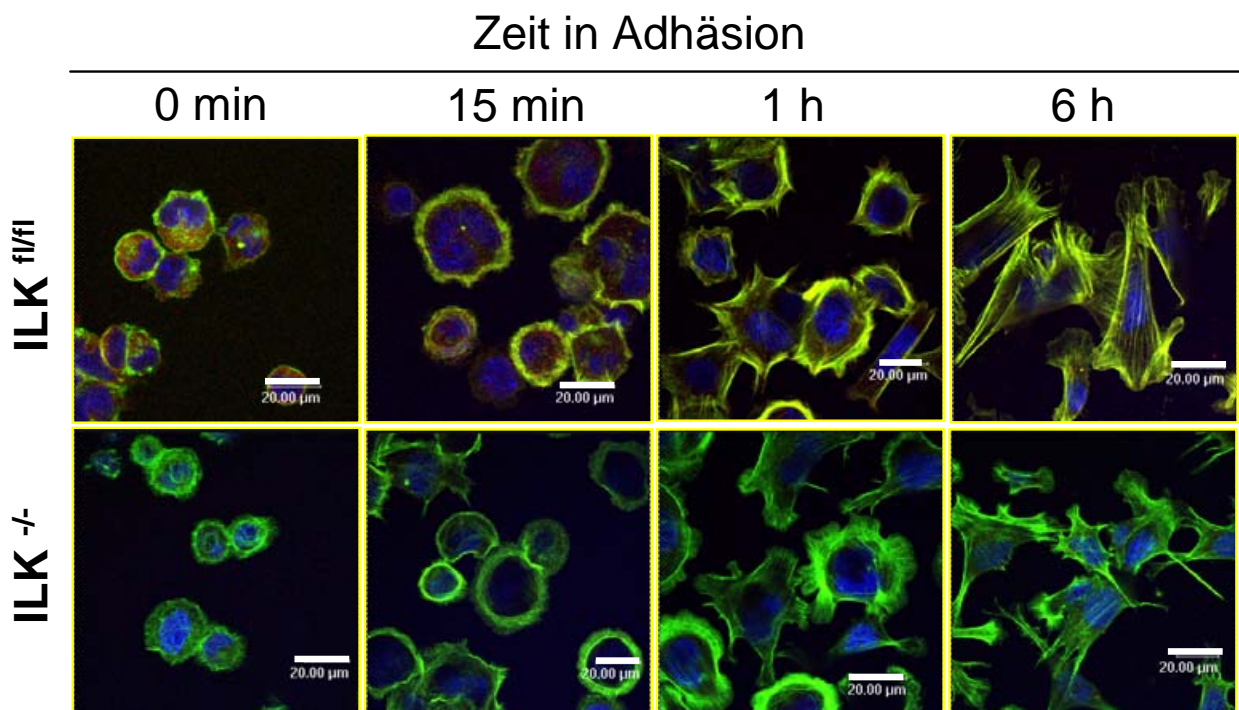


Abbildung 5.2: Mit zunehmender Adhäsionsdauer auf Fibronektin kam es zu Zellausbreitung und Organisation des Aktinzytoskeletts. Im Vergleich der beiden Zelllinien wiesen die ILK^{-/-} Zellen deutliche Defekte dieser Vorgänge auf. In den ILK^{fl/fl} Zellen erfolgte eine Kolokalisation von ILK (rot) und Aktin (grün), wodurch sich die gelbe Fluoreszenz ergab. In den ILK^{-/-} Zellen war ILK nicht vorhanden. Balken, 20,00 μm.

Während sich ILK in ILK^{fl/fl} Zellen unter Suspensionsbedingungen (0 min) insbesondere perinukleär im Zytoplasma befand, kam es mit zunehmender Zellausbreitung zu einer Kolokalisation von ILK und Aktin (siehe Abb. 5.2). In ILK^{-/-} Zellen zeigte sich auch noch nach sechs Stunden in Adhäsion eine deutliche Verzögerung bei der Organisation sowie eine gestörte Faserstruktur des Aktinzytoskeletts. Die Zellgröße war bei den

ILK-defizienten Zellen vermindert, was vor allem bei zunehmender Zellausbreitung ersichtlich wurde.

5.3 PI3K-Inhibition moduliert AKT-, GSK3 β - und FAK-Phosphorylierung

Um zu untersuchen, inwieweit sich der Verlust von ILK auf das Phosphorylierungsmuster verschiedener Proteine während des Adhäsionsvorgangs auswirkt, wurden ILK^{fl/fl} und ILK^{-/-} Fibroblasten nach einstündiger Suspension mit und ohne PI3K-Inhibition auf Fibronectin ausgesät und nach verschiedenen Zeitpunkten lysiert. Wie in Abb. 5.3 und 5.4 dargestellt ist, war in beiden Zelllinien AKT nach einstündiger Suspension (S) weitgehend dephosphoryliert. In Gegenwart von Wachstumsfaktoren kam es durch Adhäsion an Fibronectin zu einer starken Zunahme der Phosphorylierung an Serin 473, wobei dieser Effekt durch PI3K-Inhibition mit Ly294002 und Wortmannin unterdrückt werden konnte. Die Wirkung von Ly294002 ließ nach ungefähr 2 Stunden, von Wortmannin nach 4 Stunden nach.

Ohne Wachstumsfaktoren bewirkte die Adhäsion ebenfalls eine Phosphorylierung von AKT, welche jedoch schwächer ausfiel als in Anwesenheit von Serum. Die Gesamtexpression von AKT blieb unter den untersuchten Bedingungen konstant.

Während AKT sich unabhängig von der Expression von ILK zeigte, war unter Wachstumsfaktoreinfluss GSK3 β in ILK^{-/-} Zellen stärker phosphoryliert als in ILK^{fl/fl} Zellen. PI3K-Inhibition mittels Wortmannin führte in beiden Zelllinien zu einer verminderten Phosphorylierung von GSK3 β . Bei Ly294002 hingegen war dieser Effekt nicht zu beobachten. Bei Serumentzug wurde durch die Adhäsion an Fibronectin GSK3 β ebenfalls phosphoryliert, wobei diese Phosphorylierung schwächer ausfiel, als in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren, und sowohl durch Ly294002, als auch durch Wortmannin gehemmt werden konnte. In Suspension zeigten sich vor allem bei ILK^{fl/fl} Fibroblasten zusätzliche Banden, die mit einem Abbau des Proteins vereinbar sein könnten. Bei den ILK-defizienten Zellen war dieser Effekt nur in geringem Maße zu sehen.

PI3K-Inhibition führte in Gegenwart von Wachstumsfaktoren bei beiden Zelllinien zu einer Zunahme von phospho-FAK Tyrosin 397. Bei Adhäsion ohne Serum zeigte sich diese Modulation der Phosphorylierung nur bei ILK^{-/-} Zellen unter Behandlung mit Ly294002. Die Gesamtexpression von FAK zeigte sich von Adhäsion, PI3K-Inhibition und ILK unbeeinflusst.

5 Ergebnisse

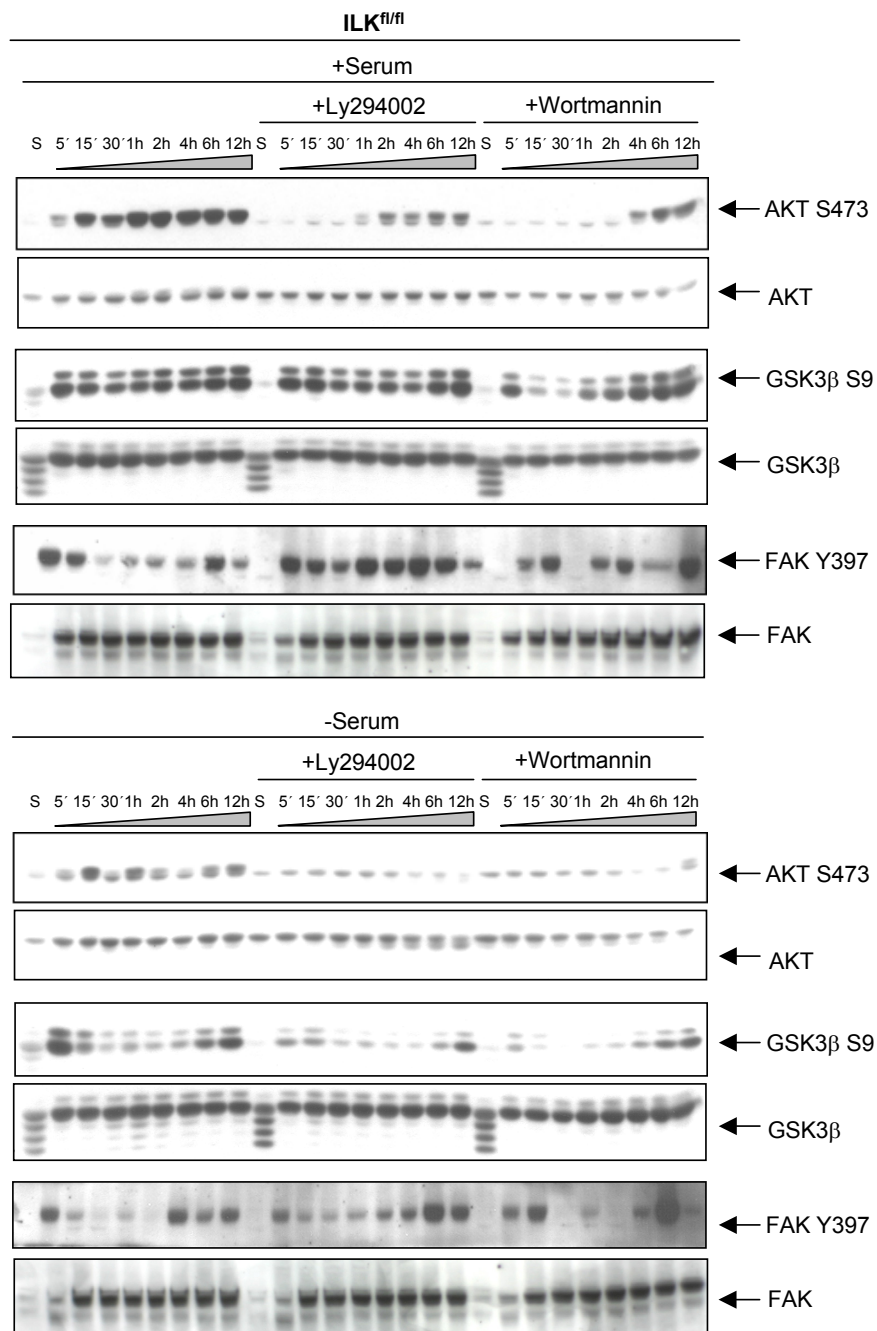


Abbildung 5.3: AKT-, GSK3 β - und FAK-Phosphorylierung wird durch Zelladhäsion und PI3K-Inhibition moduliert. Die drei untersuchten Proteine waren nach einstündiger Suspension (S) weitgehend dephosphoryliert. Die Phosphorylierung variierte unter Adhäsion auf Fibronektin in Abhängigkeit von der Adhäsionsdauer. PI3K-Inhibition durch Ly294002 oder Wortmannin führte zu Reduktion von AKT S473 und GSK3 β S9. FAK Y397 wurde in Gegenwart von Wachstumsfaktoren (+Serum) durch Ly294002 induziert. Die Gesamtexpression von FAK war in Suspension deutlich reduziert, während GSK3 β Nebenbanden zeigte, die für einen Abbau des Proteins sprechen könnten. Die Expression von AKT blieb weitgehend konstant.

5 Ergebnisse

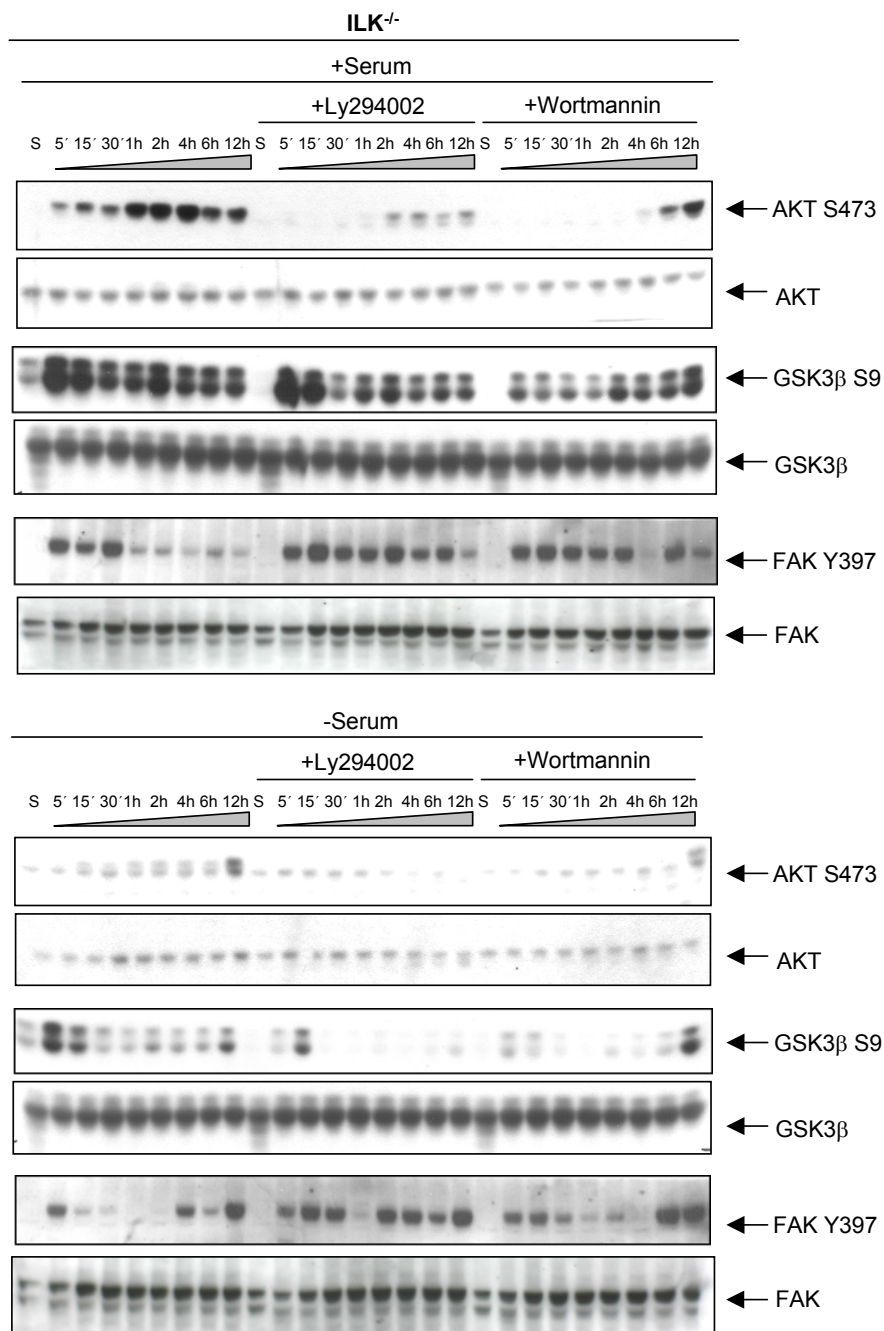


Abbildung 5.4: AKT S473, GSK3β S9 und FAK Y397 waren nach einstündiger Suspension (S) stark reduziert. Unter Adhäsion auf Fibronectin nahm die Phosphorylierung der drei untersuchten Proteine zu, wobei die Phosphorylierungsintensität durch die Adhäsionsdauer moduliert wurde. Exposition mit Ly294002 oder Wortmannin bewirkte eine Reduktion von AKT S473 und GSK3β S9. Im Vergleich mit ILK^{fl/fl} Zellen (siehe Abb. 5.3) zeigten die ILK^{-/-} Zellen eine verstärkte Phosphorylierung in Gegenwart von fetalem Kälberserum. FAK Y397 wurde unter Behandlung mit Ly294002 sowohl in Gegenwart (+Serum), als auch in Abwesenheit (-Serum) von Wachstumsfaktoren induziert. Die Gesamtexpression von AKT, GSK3β und FAK blieb weitgehend unverändert.

5.4 Adhäsion an Fibronektin moduliert in Abhängigkeit von ILK und PI3K das Überleben nach Bestrahlung

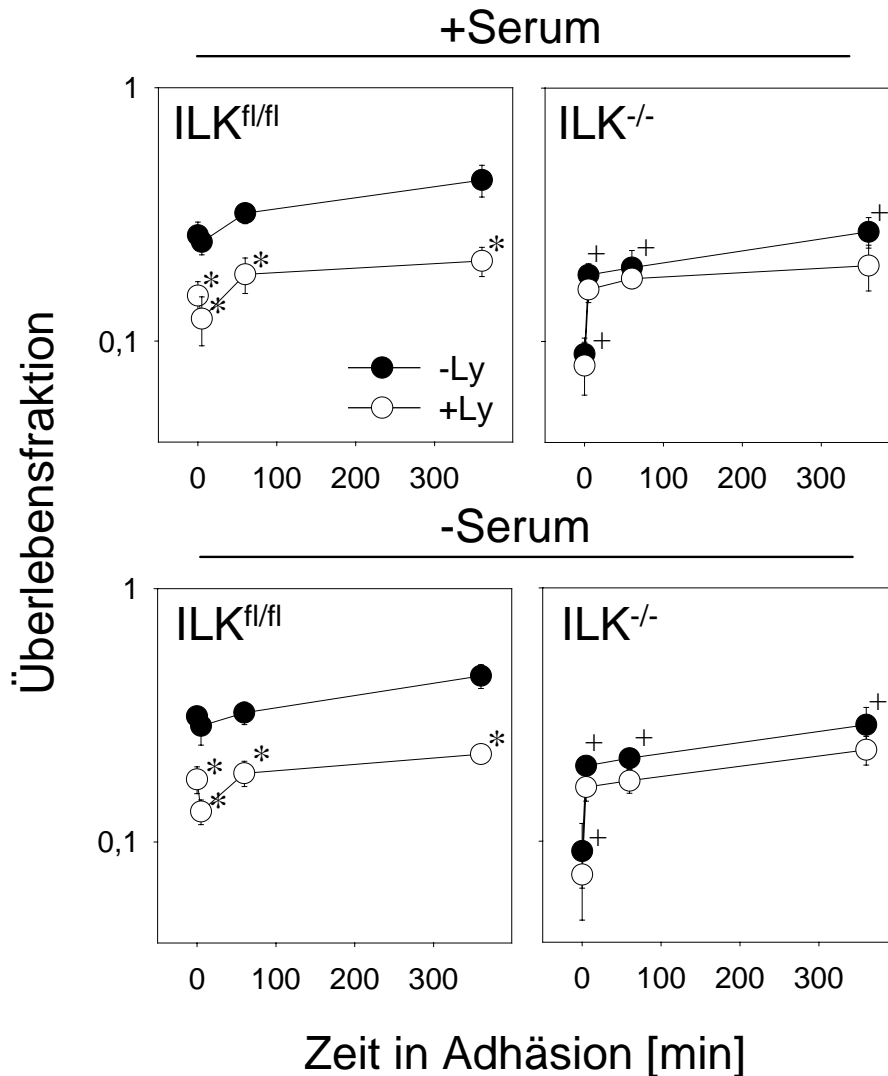


Abbildung 5.5: Adhäsion beeinflusst in Abhängigkeit von ILK und PI3K die zelluläre Strahlensensibilität. Sowohl in Suspension, als auch zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aussaat zeigten bestrahlte ILK^{fl/fl} Zellen ein besseres Überleben als entsprechend behandelte ILK^{-/-} Zellen. PI3K-Inhibition durch Ly294002 (+Ly) wirkte in den ILK-exprimierenden Fibroblasten verglichen mit den ohne Inhibitor behandelten Zellen radiosensibilisierend, während sich dieser Effekt in den ILK-defizienten Zellen nicht zeigte. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Bei der statistischen Analyse wurde das Überleben nach Bestrahlung mit 4 Gy mit und ohne PI3K-Inhibition (*) bzw. die beiden Zelllinien untereinander (+) zu den verschiedenen Zeitwerten in Adhäsion verglichen. */+ $p < 0,05$

Die beobachteten Unterschiede in der Phosphorylierung von AKT, GSK3 β und FAK

wurden im folgenden hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Radiosensibilität untersucht. $ILK^{fl/fl}$ und $ILK^{-/-}$ Zellen wurden dazu nach einstündiger Suspension mit und ohne PI3K-Inhibition auf Fibronektin aufgebracht und zu verschiedenen Zeitpunkten bestrahlt. Das klonogene Überleben wurde, wie in Abb. 5.5 zu sehen, durch den Zeitpunkt der Bestrahlung moduliert.

Der Verlust von ILK wirkte sich ebenso wie die PI3K-Inhibition mit Ly294002 radiosensibilisierend auf die Zellen aus. So zeigten $ILK^{fl/fl}$ Zellen ein besseres Überleben nach Bestrahlung als die $ILK^{-/-}$ Zellen und die mit Ly294002 behandelten Fibroblasten beider Zelllinien. Bei den $ILK^{-/-}$ Zellen zeigte sich durch die PI3K-Inhibition unter den gegebenen Bedingungen kein Effekt auf das klonogene Überleben.

5.5 Adhäsion an EZM reduziert den Einfluss von ILK auf die Strahlensensibilität

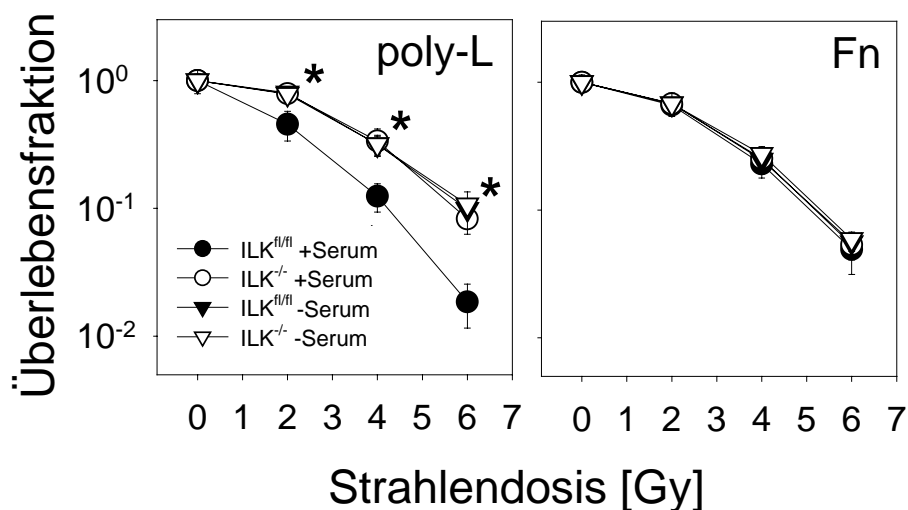


Abbildung 5.6: ILK reguliert substrat- und wachstumsfaktorabhängig das Überleben nach Bestrahlung: Im Vergleich der beiden Zelllinien auf Poly-L-Lysin (poly-L) in Anwesenheit von Serum fällt die starke Strahlensensibilisierung durch ILK auf. Während $ILK^{fl/fl}$ Zellen auf Poly-L-Lysin unter Serumentzug (-Serum) signifikant besser überleben als in Gegenwart von Wachstumsfaktoren (+Serum), wirkt die Adhäsion auf Fibronektin (Fn) serumunabhängig radioprotektiv. Bei den $ILK^{-/-}$ Zellen ergibt sich kein Einfluss auf das Überleben durch Substrat oder Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden 24 Stunden vor Bestrahlung \pm Serum auf Poly-L-Lysin oder Fibronektin ausgesät. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Es wurden sowohl die Überlebensfraktionen in An- und Abwesenheit von Serum (*), als auch die Zelllinien untereinander (+) statistisch ausgewertet. */+ $p < 0.05$

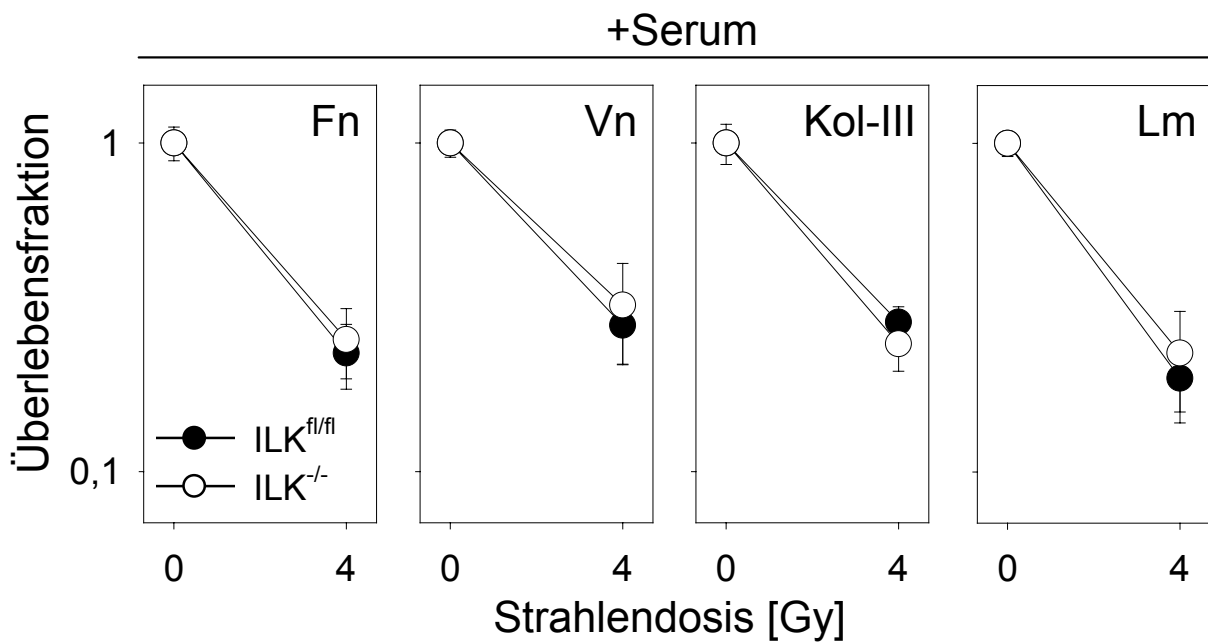


Abbildung 5.7: Neben Fibronectin (Fn) reduzieren auch Vitronectin (Vn), Kollagen-III (Kol-III) und Laminin (Lm) den Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die zelluläre Strahlensensibilität von ILK^{fl/fl} und ILK^{-/-} Fibroblasten. Auf allen untersuchten Substraten zeigten beide Zelllinien gleiches Überleben nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Um die Substrat- und Serumabhängigkeit auf das klonogene Überleben nach genotoxischem Stress zu untersuchen, wurden ILK^{fl/fl} und ILK^{-/-} Zellen auf Poly-L-Lysin und Fibronectin in An- und Abwesenheit von Wachstumsfaktoren bestrahlt (siehe Abb. 5.6).

Unter Wachstumsfaktoreinfluss besaßen ILK^{fl/fl} Zellen im Vergleich zu ILK^{-/-} Zellen auf Poly-L-Lysin eine signifikant ($p < 0.05$) gesteigerte Radiosensibilität bei einer Strahlendosis von ≥ 2 Gy, wobei sich das klonogene Überleben von ILK^{fl/fl} Zellen durch Serumentzug verbesserte und sich den Werten von ILK^{-/-} Zellen annäherte. Durch Adhäsion an Fibronectin wurde dieser Effekt aufgehoben und ILK^{fl/fl} und ILK^{-/-} Zellen zeigten unbeeinflusst von Wachstumsfaktoren gleiche Überlebensfraktionen.

Um zu analysieren, welchen Einfluss verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix auf die zelluläre Strahlensensibilität besitzen, wurden an Vitronectin, Kollagen-III oder Laminin adhärente ILK^{fl/fl} und ILK^{-/-} Zellen mit 4 Gy bestrahlt und die jeweilige Überlebensfraktion bestimmt. Die ermittelten Daten ergaben ähnlich wie auf Fibronectin (siehe Abb. 5.7) keinen signifikanten Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit beider Zelllinien auf den verschiedenen Substraten. Die auf Poly-L-Lysin beobachtete radiosensibilisierende Wirkung von ILK wurde demnach durch Adhäsion an die verschiedenen Matrixproteine aufgehoben.

Diese Daten verdeutlichen die Serum- und Substratabhängigkeit der zellulären Strahlenantwort der untersuchten normalen Nierenfibroblasten. Um den Einfluss von ILK zum einen auf die Radiosensibilität zum anderen auf den EGF-Rezeptor als potentiell therapeutisches Zielprotein in menschlichen Tumorzellen zu untersuchen, wurden FaDu-Zellen stabil mit Wildtyp-ILK oder konstitutiv aktiver ILK transfiziert und Überleben und Proliferation in An- und Abwesenheit von Serum, auf Poly-L-Lysin und Fibronectin sowie unter EGF-Rezeptor TK Inhibition analysiert.

5.6 ILK sensibilisiert FaDu-Zellen gegenüber ionisierender Strahlung

Die Fähigkeit von ILK zur Phosphorylierung von GSK3 β wurde benutzt, um die ILK Kinaseaktivität in den FaDu-ILK-Transfektanten zu bestimmen. Bei den Zellen mit Wildtyp-ILK (IW30) und konstitutiv aktiver ILK (IH43) konnte verglichen mit Vektorkontrollen (EV2) eine 2,8-fach bzw. 7,6-fach gesteigerte GSK3 β -Phosphorylierung gemessen werden (siehe Abb. 5.8).

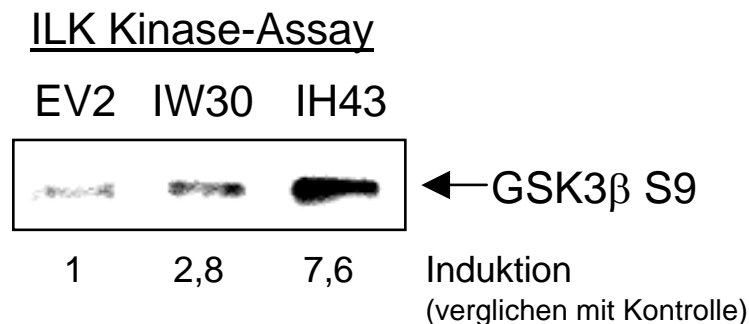


Abbildung 5.8: In stabil transfizierten Zellen wurde die ILK Kinaseaktivität anhand der GSK3 β -Phosphorylierung an Serin 9 bestimmt. Die Analyse zeigt im Vergleich zu den Vektorkontrollen (EV2) bei den ILK-Wildtyp-Zellen (IW30) eine 2,8-fache bei den Zellen mit konstitutiv aktiver ILK (IH43) eine 7,6-fache Induktion der ILK Kinaseaktivität.

Anhand von Koloniebildungsassays wurde daraufhin der Einfluss der ILK Aktivität auf das Überleben nach Bestrahlung ermittelt. Während auf Poly-L-Lysin die Klone IW30 und IW23 sowie IH43 und IH42 eine signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Radiosensibilität bei einer Dosis von 2 – 6 Gy zeigten, verbesserte Adhäsion an Fibronectin das Überleben der ILK-Wildtyp-Zellen (IW30, IW23). Bei den mit konstitutiv aktiver ILK transfizierten Zellen (IH43, IH42) war dieser Effekt hingegen nicht im gleichen Maße zu beobachten (siehe Abb. 5.9).

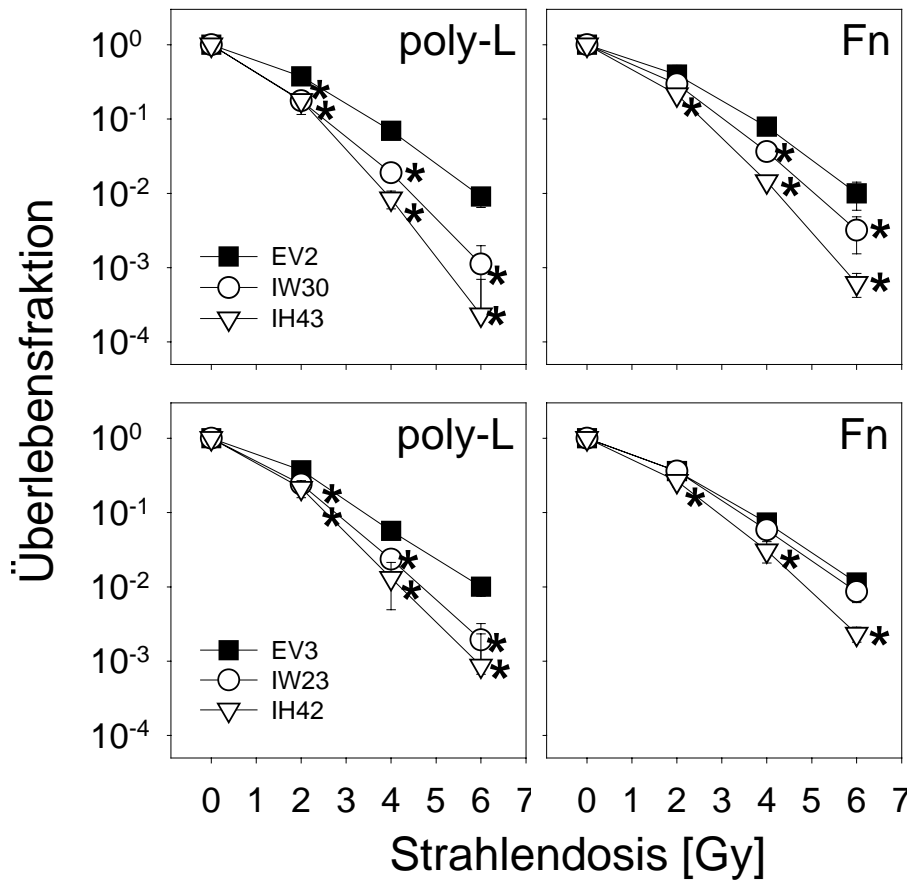


Abbildung 5.9: Dosis-effekt-Kurven von FaDu-Zellen: ILK verändert die Sensibilität von FaDu-Plattenepithelkarzinomzellen gegenüber strahleninduzierten genotoxischen Läsionen. Übereinstimmend mit verstärkter ILK Kinaseaktivität zeigten bestrahlte FaDu-Zellen, die mit Wildtyp-ILK (IW30, IW23) oder konstitutiv aktiver ILK (IH43, IH42) transfiziert worden waren, auf Poly-L-Lysin (poly-L) eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Strahlenempfindlichkeit als Vektorkontrollen (EV2, EV3). Adhäsion an Fibronectin (Fn) reduzierte diesen radiosensibilisierenden Effekt insbesondere in IW30 und IW23 Zellen. Die Zellen wurden wie in 4.6.1 beschrieben behandelt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dargestellt. Bei der statistischen Auswertung (ANOVA) wurden mit Wildtyp-ILK oder konstitutiv aktiver ILK transfizierte Zellen mit Vektorkontrollen verglichen. * $p < 0,05$

5.7 ILK-Expression beeinflusst EGF-Rezeptor, FAK, GSK3 β und AKT in murinen Fibroblasten

Der serumabhängige Unterschied der zellulären Radiosensibilität beider Zelllinien (siehe Abb. 5.6) wurde im folgenden hinsichtlich der Bedeutung von EGF untersucht. Dafür wurden ILK^{fl/fl} und ILK^{-/-} Fibroblasten nach 24 stündigem Serumentzug mit EGF stimuliert und der Effekt auf EGF-Rezeptor, FAK, GSK3 β und AKT mittels Western Blot analysiert.

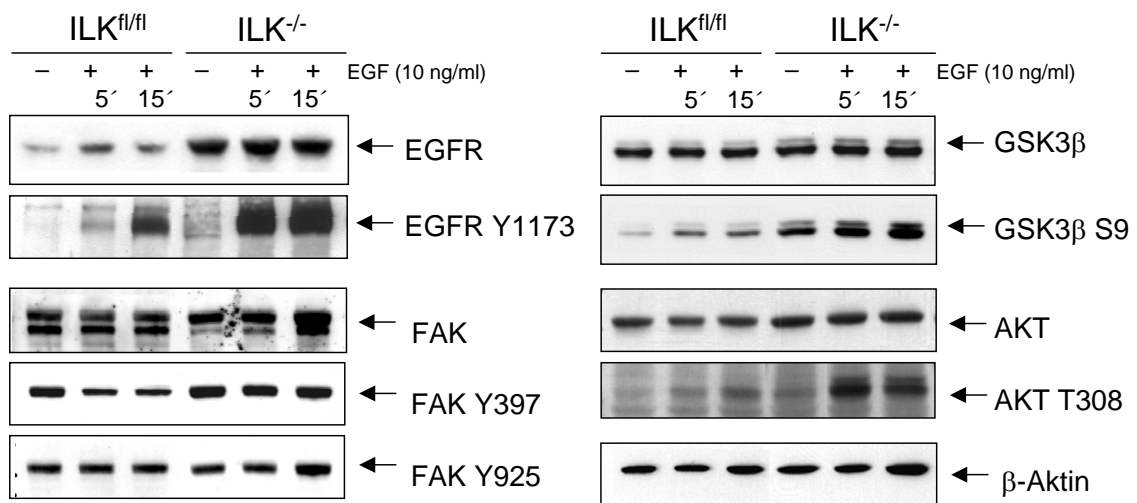


Abbildung 5.10: ILK moduliert die Expression sowie die durch EGF stimulierte Phosphorylierung verschiedener Signalproteine der fokalen Adhäsionen. Verglichen mit den ILK^{fl/fl} Fibroblasten wird in den ILK-defizienten Zellen EGF-Rezeptor (EGFR) vermehrt exprimiert und phosphoryliert. Eine durch EGF vermittelte Abnahme der an Tyrosin 397 phosphorylierten FAK (FAK Y397) zeigt sich nur in den ILK^{fl/fl} Zellen, wobei die Phosphorylierung von Tyrosin 925 (FAK Y925) und die Gesamtexpression von FAK in beiden Zelllinien unverändert blieb. Die Signalproteine GSK3β und AKT waren in ILK^{-/-} relativ zu ILK^{fl/fl} Zellen stärker phosphoryliert. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Wie in Abb. 5.10 zu sehen ist, führte der Verlust von ILK in den Mausfibroblasten zu einer Zunahme des EGF-Rezeptor Gesamtproteins sowie der EGF vermittelten Phosphorylierung am Tyrosinrest 1173. Auch AKT und GSK3β waren unter diesen Versuchsbedingungen in den ILK^{-/-} Zellen stärker phosphoryliert als in den ILK^{fl/fl} Zellen, wobei sich hier allerdings bezüglich der Expression kein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien ergab. Während in den ILK^{fl/fl} Zellen die Zugabe von EGF zu einer Reduktion von phospho-FAK Y397 führte, blieb dieser Effekt in Abwesenheit von ILK aus. Gesamtexpression und Phosphorylierung am Tyrosinrest 925 zeigten sich EGF- und ILK-unabhängig.

Neben Expression und Phosphorylierung verschiedener Signalproteine der fokalen Adhäsionen beeinflusst ILK auch die Lokalisation von AKT innerhalb der Zelle.

Während in den ILK^{fl/fl} Zellen AKT verstärkt im Kern lokalisiert war, zeigten die ILK^{-/-} Zellen eine gleichmäßige Verteilung des Proteins im Zytoplasma und im Kern (siehe Abb. 5.11). Auch hier, 24 Stunden nach Aussaat der Zellen, wiesen die ILK^{-/-} Zellen Strukturdefekte des Aktinzytoskeletts sowie ein deutlich geringeres Zellvolumen verglichen mit den ILK-exprimierenden Fibroblasten auf.

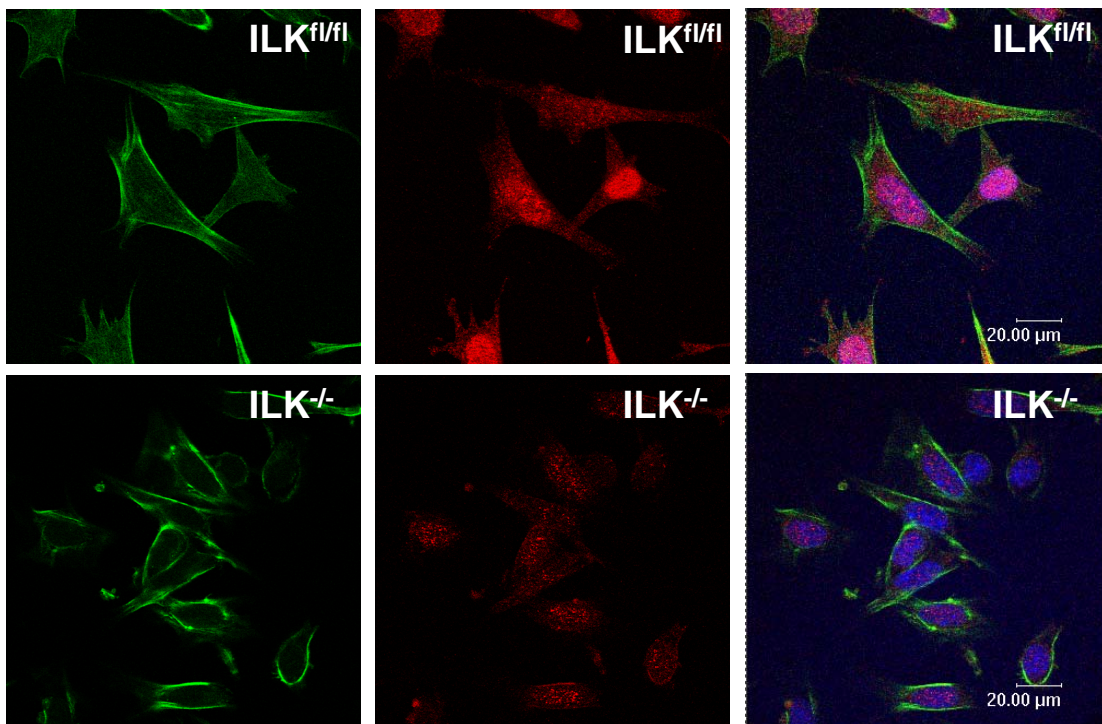


Abbildung 5.11: Neben der Expression und Phosphorylierung zeigt sich auch die Lokalisation von AKT abhängig von ILK. In Gegenwart von ILK ist AKT (rot) vorwiegend im Kern lokalisiert, während die ILK-defizienten Zellen sowohl eine zytoplasmatische, als auch nukleäre Verteilung aufweisen. Das Aktinskelett (grün) wurde mit Hilfe von FITC-Phalloidin, der Zellkern mit DAPI gefärbt. Balken, 20 μm .

5.8 BIBX inhibiert dosisabhängig die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors

Um den wachstumsfaktorabhängigen Effekt auf die Radiosensibilität der $\text{ILK}^{\text{fl/fl}}$ Zellen genauer zu charakterisieren, wurde der bereits beschriebene EGF-Rezeptor TK-Inhibitor BIBX1382BS (BIBX) verwendet. Zunächst wurde dessen hemmende Wirkung auf die wichtige Autophosphorylierungsstelle des EGF-Rezeptors Y1173 und auf die Aktivität der nachgeschalteten Signalproteine AKT und MAPK unter Stimulation mit EGF (10 ng/ml) analysiert (siehe Abb. 5.12).

Weder BIBX noch DMSO modulierte die Gesamtexpression von EGF-Rezeptor, AKT oder MAPK. Während bei einer 15 minütigen bzw. 1 stündigen Exposition mit DMSO die durch Zugabe von EGF ausgelöste Phosphorylierung von EGFR-Y1173, AKT-S473 und MAPK unbeeinflusst blieb, verhinderte die 15 minütige bzw. 1 stündige Inkubation mit BIBX ab einer Konzentration von 5 μM die Stimulation der drei Proteine. Die inhibitorische Effizienz hinsichtlich des AKT- oder MAPK-Signalwegs unterschied sich

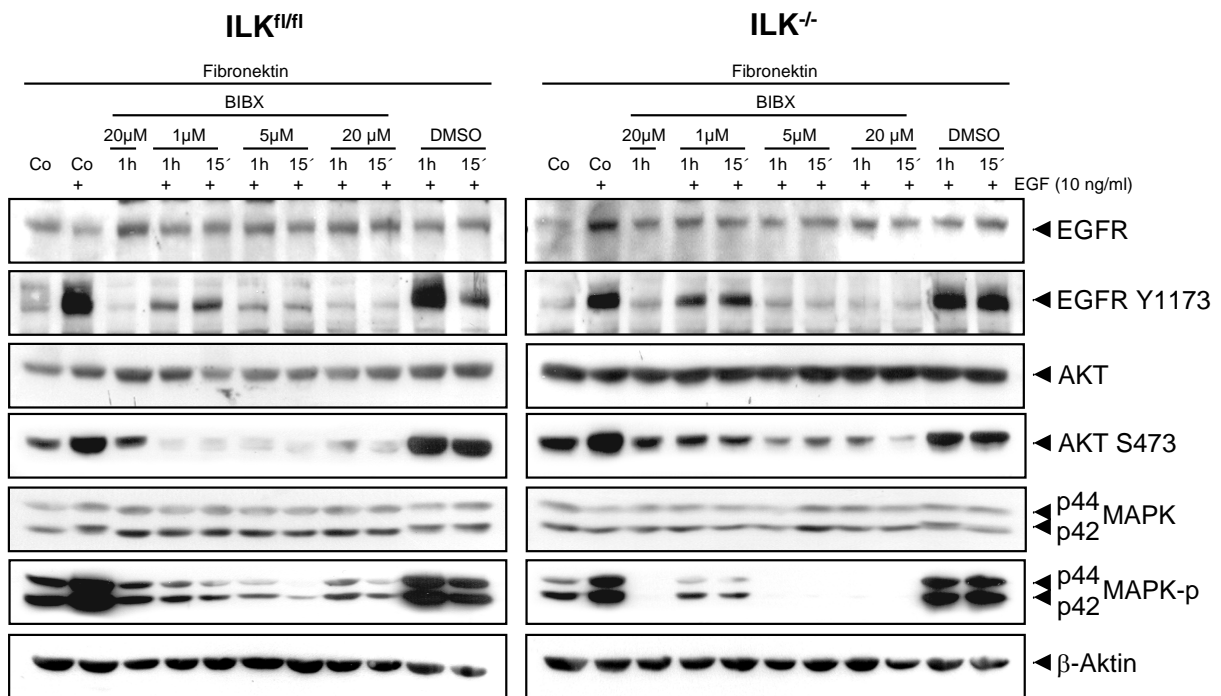


Abbildung 5.12: Inhibition der EGF-Rezeptor TK-Aktivität mittels BIBX hemmt dosisabhängig die EGFR Y1173 Phosphorylierung, beeinflusst jedoch unterschiedlich die Signalmoleküle AKT und p42/p44 MAPK in an Fibronektin adhärennten *ILK^{fl/fl}* und *ILK^{-/-}* Zellen. Im Gegensatz zum Lösungsvermittler DMSO verhindert 20 μM BIBX die EGF vermittelte Aktivierung von EGFR, AKT und p42/p44 MAPK. In *ILK^{-/-}* Zellen kam es zu einer starken Reduktion von phospho-MAPK, während in *ILK^{fl/fl}* Zellen AKT unter dieser Behandlung weniger an Serin 473 phosphoryliert war. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

in beiden Zelllinien, wobei BIBX in den *ILK^{fl/fl}* Zellen eine stärkere Hemmung der AKT-Phosphorylierung verursachte und in den *ILK^{-/-}* Zellen zu geringeren MAPK-Phosphorylierung unter EGF-Stimulation führte.

5.9 EGF-Rezeptor TK-Inhibition beeinflusst weder Zellüberleben noch Proliferation von murinen Fibroblasten

Um den Einfluss von EGF-Rezeptor TK-Inhibition auf Überleben und Proliferation bestrahlter *ILK^{fl/fl}* und *ILK^{-/-}* Fibroblasten zu untersuchen, wurden klonogenes Zellüberleben und Zellzahl nach Bestrahlung unter BIBX- bzw. DMSO-Exposition ermittelt. Die Ergebnisse wurden relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben.

Wie in Abb. 5.13 und 5.14 zu sehen ist, zeigen *ILK^{fl/fl}* Zellen auf Fibronektin im Vergleich zu an Poly-L-Lysin adhärennten Zellkulturen ein gesteigertes Überleben in Anwesenheit

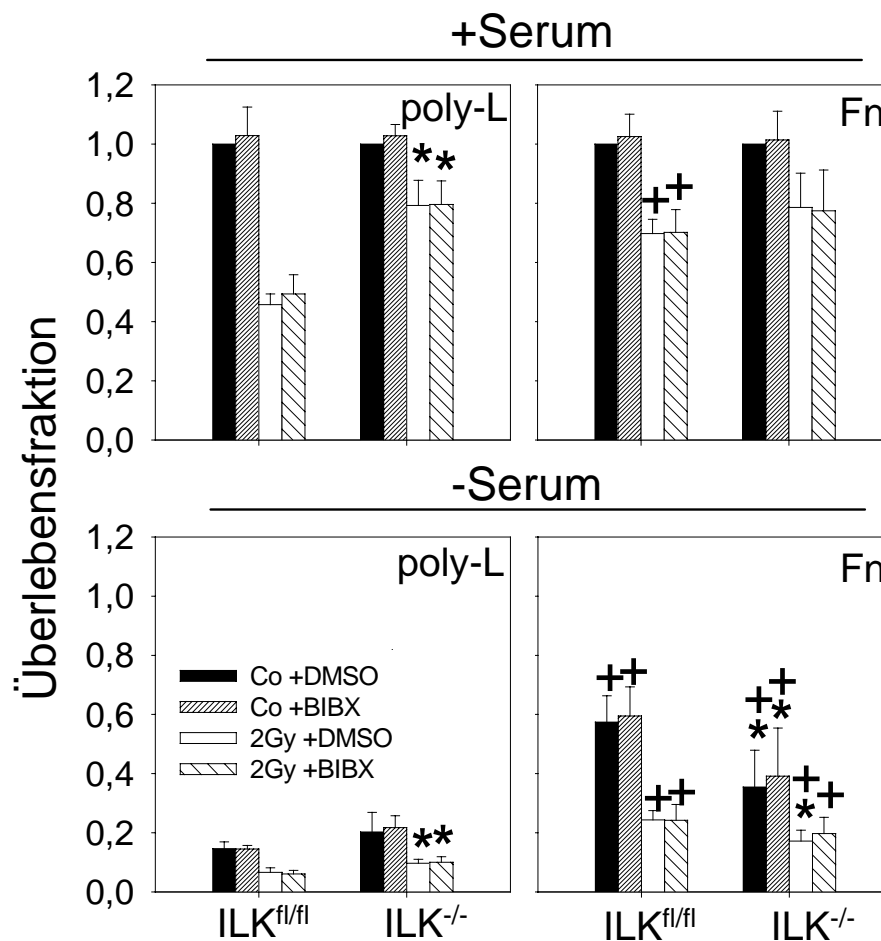


Abbildung 5.13: Inkubation mit BIBX (20 μ M) hatte unter allen untersuchten Bedingungen weder Einfluss auf das Überleben der bestrahlten Mausfibroblasten (2 Gy) noch auf die plating efficiency der unbestrahlten Kontrollen (Co). Bei Serumentzug (-Serum) führte Adhäsion an Fibronectin (Fn) zu verbesserten Überlebensraten im Vergleich zu den an Poly-L-Lysin (poly-L) adhärennten Zellkulturen. In Gegenwart von Wachstumsfaktoren (+Serum) zeigte sich in den $ILK^{fl/fl}$ Fibroblasten eine Reduktion der Strahlensensibilität durch Adhäsion an Fibronectin. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Bei der statistischen Analyse wurden $ILK^{fl/fl}$ Zellen mit $ILK^{-/-}$ Zellen auf dem gleichen Substrat (*) oder eine Zelllinie auf verschiedenen Substraten (+) verglichen. */+ $p < 0.05$

von Serum, während die relative Zellzahl nach Bestrahlung gleich blieb. Bei den $ILK^{-/-}$ Zellen konnte dieser substratabhängige Effekt, wie bereits in Kap. 5.4 erwähnt, nicht beobachtet werden. Wachstumsfaktoren beeinflussten in beiden Zelllinien die Proliferation im stärkeren Ausmaß als das klonogene Überleben. Die zelluläre Strahlensensibilität der $ILK^{fl/fl}$ und $ILK^{-/-}$ Fibroblasten differierte in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren unter den verschiedenen Bedingungen kaum.

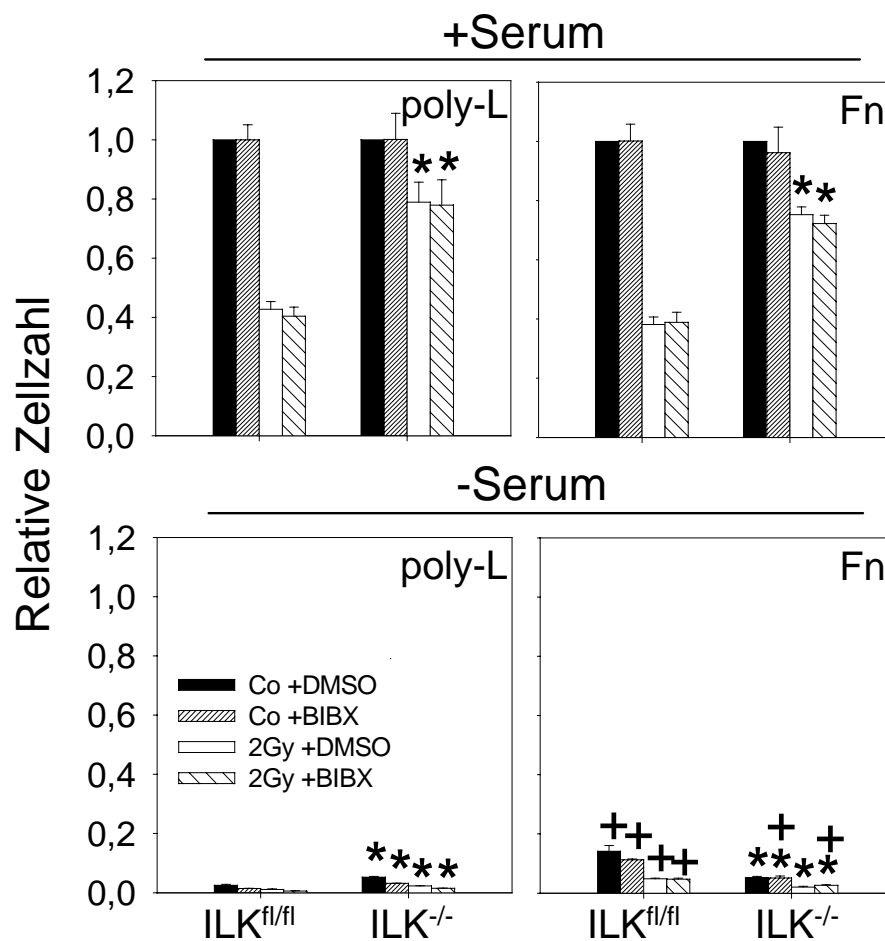


Abbildung 5.14: Die Messung der Zellproliferation bestätigte die Überlebensdaten insoweit, dass auch hier kein Effekt durch BIBX auf die ermittelte Zellzahl weder unter Bestrahlung (2 Gy) noch auf die unbestrahlten Kontrollen (Co) in den beiden ILK-Zelllinien gefunden wurde. In Gegenwart von Wachstumsfaktoren (+Serum) zeigten sich ILK^{fl/fl} Fibroblasten sowohl auf Poly-L-Lysin (poly-L), als auch auf Fibronectin (Fn) signifikant ($p < 0,05$) strahlensensibler als ILK^{-/-} Zellen. Serumentzug (-Serum) reduzierte die Proliferation in stärkerem Ausmaß als das klonogene Überleben. Fibronectin vermittelte bei den ILK^{fl/fl} Zellen einen signifikanten Vorteil für das Zellwachstum, während bei den ILK^{-/-} Zellen nur unter BIBX ein substratabhängiger Unterschied in den Zellzahlen zu sehen war. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Bei der statistischen Analyse wurden ILK^{fl/fl} Zellen mit ILK^{-/-} Zellen auf dem gleichen Substrat (*) oder eine Zelllinie auf verschiedenen Substraten (+) verglichen. */+ $p < 0,05$

Durch Inhibition der EGF-Rezeptor TK wurde substrat- und wachstumsfaktorunabhängig weder Zellzahl noch Koloniebildung der normalen Mausfibroblasten signifikant beeinflusst.

5.10 BIBX inhibiert AKT- und MAPK-Phosphorylierung in FaDu-Zellen

Das inhibitorische Potential von BIBX in Bezug auf die EGF-Rezeptor Phosphorylierung wurde in ILK-Transfektanten untersucht, die verglichen mit Vektorkontrollen signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede in ihrer Radiosensibilität zeigten (siehe Abb. 5.9). Zusätzlich wurde die inhibierende Wirkung von BIBX auf die Signalproteine AKT und MAPK betrachtet.

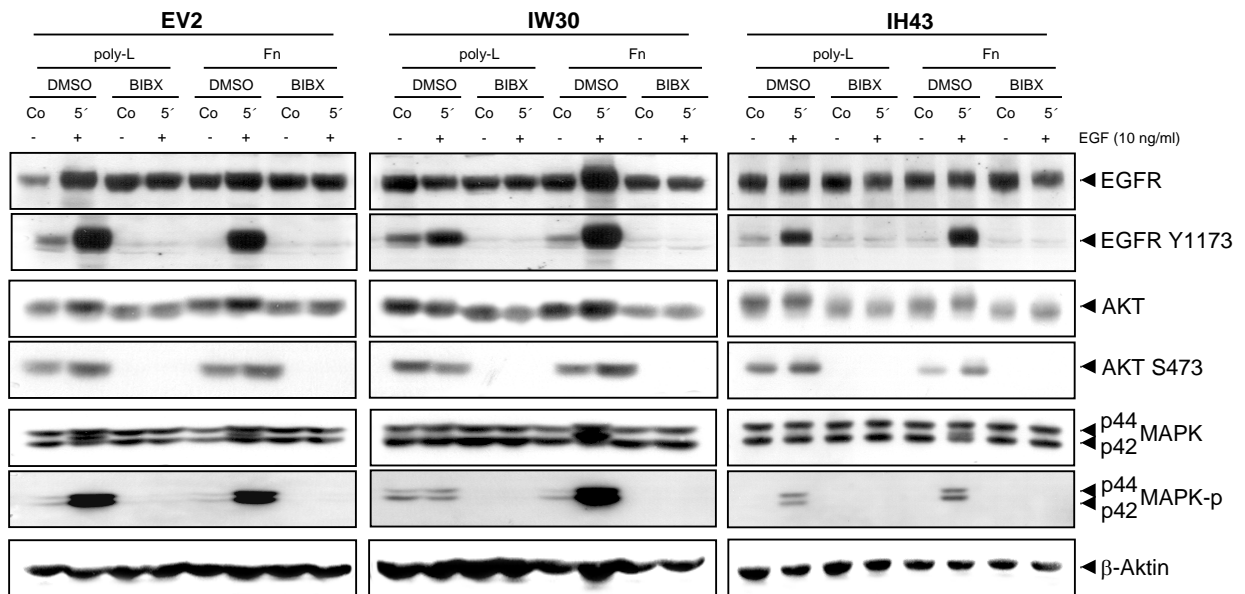


Abbildung 5.15: Nach 24 stündigem Serumentzug (Co) wurden die FaDu-ILK-Transfektanten mit EGF (10 ng/ml) für 5 Minuten inkubiert (5'). Bei allen drei Zelllinien wurde unter BIBX-Exposition (20 μ M) die durch EGF vermittelte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors sowie der Signalmoleküle AKT und MAPK effektiv inhibiert. Dieser Effekt trat sowohl auf dem Kontrollsubstrat Poly-L-Lysin (poly-L), als auch auf dem Matrixprotein Fibronectin (Fn) auf. Die Unterschiede im Expressions- und Phosphorylierungsmuster der drei Proteine zwischen den verschiedenen Transfektanten könnten durch die unterschiedliche ILK Kinaseaktivität der Zellen bedingt sein. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Sowohl auf Poly-L-Lysin, als auch auf Fibronectin zeigten mit DMSO inkubierte EV2 Kontrollzellen 5 Minuten nach Zugabe von EGF eine starke Induktion der EGFR Y1173 Phosphorylierung (siehe Abb. 5.15). Diese Induktion war in den mit BIBX behandelten Zellen substratunabhängig nicht nachweisbar. Die Gesamtexpression des EGF-Rezeptors blieb unter allen untersuchten Bedingungen konstant. Nach EGF Zugabe kam es zu einem Anstieg der AKT S473 und MAPK Phosphorylierung in den DMSO-exponierten EV2 Zellen, wobei die Gesamtexpression von AKT und MAPK nur leicht induziert wurde.

Eine einstündige Inkubation mit 20 μ M BIBX hemmte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die schon in den ILK^{fl/fl} und ILK^{-/-} Fibroblasten erhoben worden waren, die EGF vermittelte Aktivierung von AKT und MAPK in an Poly-L-Lysin oder Fibronectin gebundenen EV2 Kontrollen.

Mit ILK-Wildtyp transfizierte IW30 Zellen wiesen große Ähnlichkeit hinsichtlich der Gesamtexpression der untersuchten Proteine zu EV2 Zellen auf. Die EGF vermittelte EGFR-Y1173 Phosphorylierung hingegen präsentierte sich auf Poly-L-Lysin nicht so stark wie in den Vektorkontrollen. Desweiteren blieb MAPK in IW30 Transfektanten durch EGF-Stimulation komplett unbeeinflusst. BIBX hatte in diesen Zellen jedoch den gleichen hemmenden Effekt auf die Phosphorylierungen, der auch schon in den EV2 Zellen beobachtet worden war.

Die konstitutiv aktive ILK exprimierenden IH43 Transfektanten besaßen sowohl auf Poly-L-Lysin, als auch auf Fibronectin eine geringere basale Phosphorylierung von EGFR-Y1173 und MAPK verglichen mit EV2 Zellen. EGF Exposition führte zu einer starken Induktion dieser Phosphorylierungen, wobei aber auch hier nur ein verglichen mit den Kontrollzellen reduziertes Aktivationsniveau erreicht wurde. BIBX inhibierte die Phosphorylierung der drei untersuchten Proteine in an Poly-L-Lysin und Fibronectin adhärenen IH43 Zellen. Die Gesamtprotein-Expression entsprach weitgehend den bereits in den IW30 und EV2 Transfektanten erhobenen Ergebnissen.

5.11 BIBX führt in FaDu-Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Proliferation aber nicht des Überlebens

Als nächstes wurde die Auswirkung von BIBX vermittelter EGF-Rezeptor TK-Inhibition auf Überleben und Proliferation in unbestrahlten und bestrahlten FaDu-ILK-Transfektanten untersucht. In Anlehnung an die Versuche mit Mausfibroblasten wurden Koloniebildung und Zellzahl nach Bestrahlung oder BIBX-Behandlung jeweils allein oder in Kombination untersucht.

Wie in Abb. 5.16 zu sehen, zeigte das klonogene Überleben keine Substratabhängigkeit in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren, wobei IW30 und IH43 Transfektanten eine vermehrte Radiosensibilität bei 2 Gy verglichen mit den Vektorkontrollen zeigten (vgl. Kap. 5.6). Bei Serumentzug erbrachte Fibronectin relativ zu Poly-L-Lysin einen signifikanten ($p < 0,05$) Überlebensvorteil unter allen untersuchten Bedingungen. Während unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren EGF-Rezeptor TK-Inhibition keinen Effekt auf die Koloniebildungsrate besaß, zeigten serumdeprivierte Zellen bei einer Behandlung mit BIBX ein signifikant ($p < 0,05$) reduziertes Überleben. Desweiteren ist beim Vergleich der drei

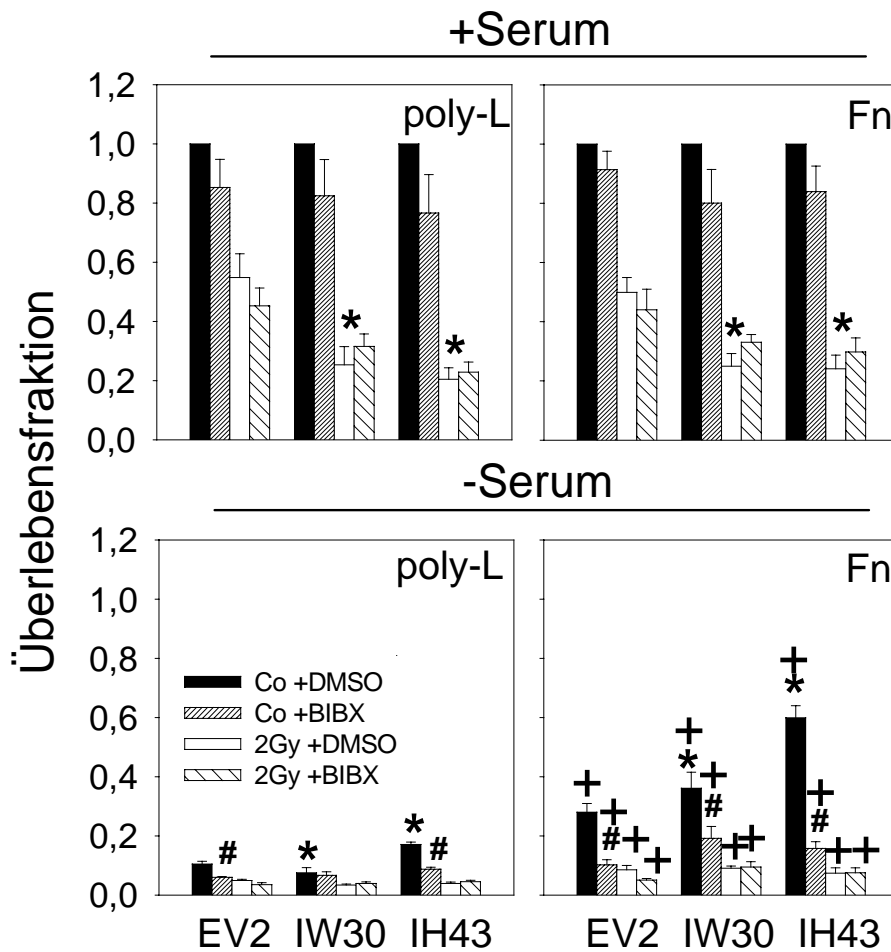


Abbildung 5.16: Die verschiedenen FaDu-ILK-Transfektanten (EV2, IW30, IH43) wurden wie in Kap. 4.6.1.2 beschrieben nach einstündiger Inkubation mit BIBX bzw. DMSO bestrahlt (2 Gy) und mit den unbestrahlten Kontrollen (Co) verglichen. Die BIBX-Behandlung erzielte sowohl auf Poly-L-Lysin (poly-L), als auch auf Fibronectin (Fn) wachstumsfaktorabhängig ähnliche Effekte. Unter Serumbedingungen (+Serum) kam es zu keiner deutlichen Reduktion der Koloniebildung. Desweiteren veränderte BIBX nicht die durch Transfektion mit den verschiedenen ILK-Konstrukten hervorgerufene unterschiedliche Radiosensitivität. Im Vergleich zu den untersuchten Mausfibroblasten zeigten sich die drei FaDu-ILK-Transfektanten in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren (-Serum) sensitiver gegenüber EGF-Rezeptor TK-Inhibition, wobei sich die zelluläre Strahlenempfindlichkeit durch BIBX nicht erhöhte. Desweiteren kam es unter Serumentzug zu einem Anstieg der basalen Überlebensrate proportional zur ILK Kinaseaktivität. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Bei der statistischen Analyse wurden EV2 mit IW30 und IH43 Zellen auf dem gleichen Substrat (*), eine Zelllinie auf verschiedenen Substraten (+) oder BIBX- mit DMSO-Behandlung (#) verglichen. */+/# $p < 0.05$

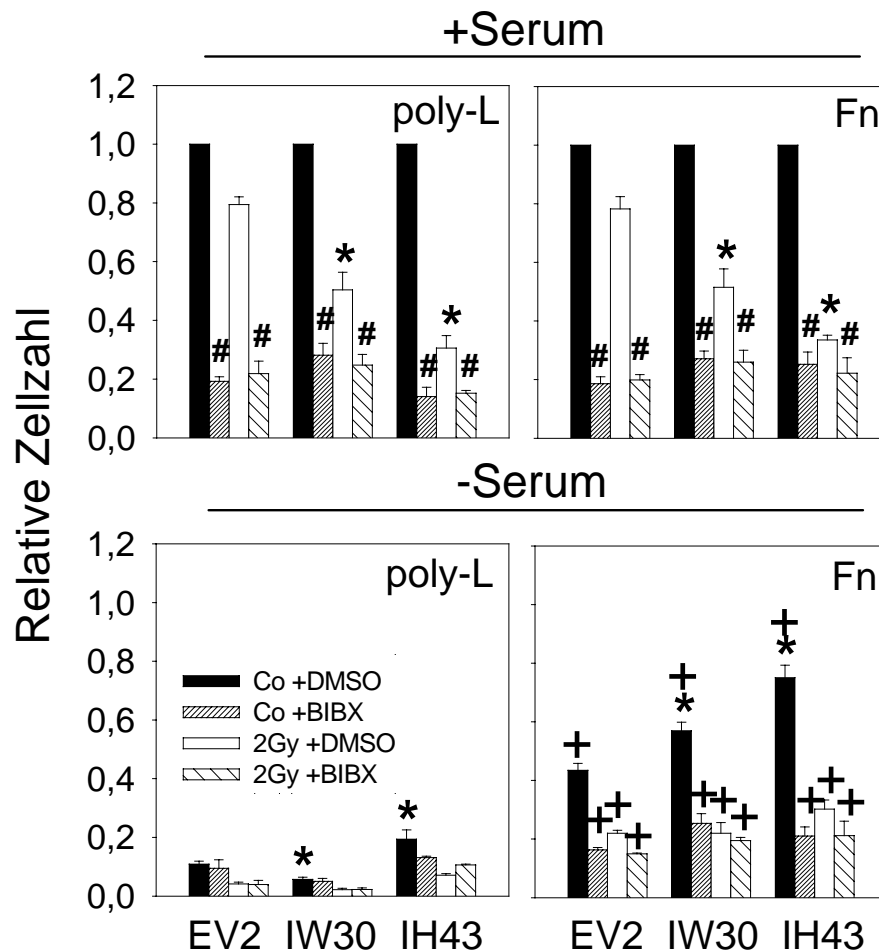


Abbildung 5.17: In FaDu-ILK-Transfektanten (EV2, IW30, IH43) ergaben sich bei Messung der Zellproliferation abweichende Ergebnisse. Die Zellen wurden entsprechend den Koloniebildungsversuchen bestrahlt (2 Gy) und mit den unbestrahlten Kontrollen (Co) verglichen. Die Behandlung mit BIBX reduzierte in Gegenwart von Wachstumsfaktoren (+Serum) drastisch die Zellzahl im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen, während in den Koloniebildungsversuchen hier kein Effekt auf das Überleben gemessen werden konnte (siehe Abb. 5.16). Erhöhte ILK Kinaseaktivität in IW30 und IH43 Transfektanten bewirkte einen proportionalen Anstieg der Strahlensensibilität. In Abwesenheit von Wachstumsfaktoren (-Serum) vermittelte Fibronektin (Fn) in allen drei Zelllinien einen Proliferationsvorteil gegenüber an Poly-L-Lysin (poly-L) adhären Zellenkulturen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Bei der statistischen Analyse wurden EV2 mit IW30 und IH43 Zellen auf dem gleichen Substrat (*), eine Zelllinie auf verschiedenen Substraten (+) oder BIBX- mit DMSO-Behandlung (#) verglichen. */+/# $p < 0.05$

Transfektanten bei Adhäsion an Fibronectin in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren eine proportional zur ILK Kinaseaktivität gesteigerte Koloniebildung zu erkennen, was auch in Übereinstimmung mit den in den untersuchten Mausfibroblasten erhobenen Daten steht. Relativ zur Überlebensrate stellte die Zellzahl bei den untersuchten Bedingungen den sensitiveren Messparameter für die Wirkung von EGF-Rezeptor TK-Inhibition dar (siehe Abb. 5.17). Hier kam es in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren zu einer starken Reduktion der Zellproliferation durch BIBX, wobei dieser Effekt unbeeinflusst vom verwendeten Substrat blieb. Ähnlich wie auch schon in den Koloniebildungsversuchen zeigten IW30 und IH43 Zellen eine vermehrte Strahlensensibilität verglichen mit EV2-Kontrollen. Im Gegensatz zur Überlebensfraktion wurden bei kombinierter Bestrahlung/BIBX-Behandlung ähnliche Zellzahlen ermittelt, wie bei alleiniger BIBX-Exposition. Desweiteren entstand in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren durch Adhäsion an Fibronectin ein Prolifertionsvorteil gegenüber Zellkulturen, die auf Poly-L-Lysin wuchsen. Auf Fibronectin ergaben sich bei den drei Zelllinien serumunabhängig ähnliche Zellzahlen unter Behandlung mit BIBX, während bei an Poly-L-Lysin adhärennten Zellen eine deutliche Reduktion der Proliferation durch Serumentzug zu verzeichnen war.

5.12 Fibronectin verbessert ILK-abhängig Überleben und Proliferation

Um den Effekt von Fibronectin auf Überleben und Proliferation zu ermitteln, wurde aus den erhobenen Daten die Fibronectin/Poly-L-Lysin-Ratio in Abwesenheit von Serum berechnet (siehe Abb. 5.18).

Bei den untersuchten Mausfibroblasten sind deutliche Unterschiede im substratvermittelten Überlebens- und Proliferationsvorteil durch die fehlende Expression von ILK zu erkennen. So wiesen ILK^{fl/fl} Zellen auf Fibronectin eine vierfach höhere Koloniebildungsrate verglichen mit an Poly-L-Lysin adhärennten Zellkulturen auf, während in den ILK^{-/-} Zellen dieser Effekt auf die Hälfte reduziert war. Noch stärker kam der Unterschied zwischen den zwei Zelllinien hinsichtlich der Fibronectinwirkung bei Betrachtung der Zellzahlen zur Geltung. Hier zeigte sich außerdem, dass unter der Behandlung mit BIBX die Fibroblasten vermehrt von der Adhäsion an Fibronectin profitierten als ohne Inhibition der EGF-Rezeptor TK.

Auch bei den FaDu-ILK-Transfektanten war die Abhängigkeit der durch Fibronectin gesteigerten Koloniebildungsrate von der ILK Kinaseaktivität ersichtlich. Die Wildtyp-Kinase Transfektanten überlebten auf Fibronectin relativ zu Poly-L-Lysin besser als Vektorkontrollen. Zellen mit konstitutiv aktiver Kinase zeigten einen geringeren Überle-

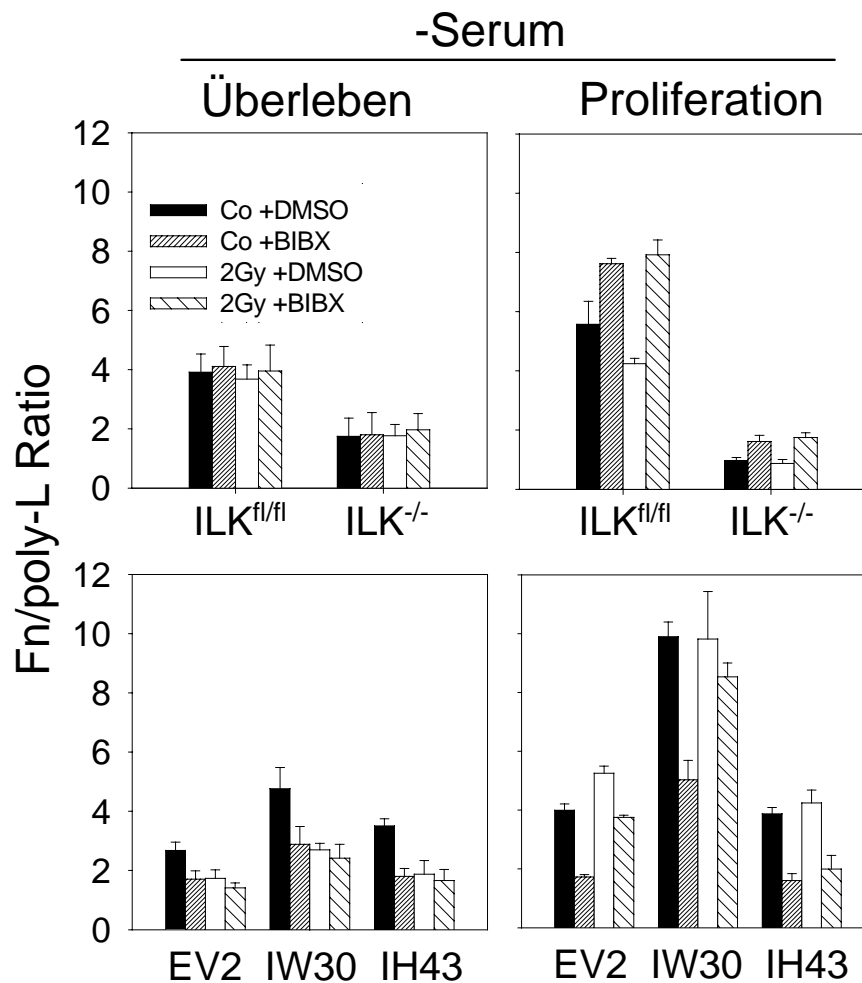


Abbildung 5.18: Der Überlebens- und Proliferationsvorteil durch Fibronectin wird in den untersuchten Mausfibroblasten (ILK^{fl/fl}, ILK^{-/-}) und transfizierten FaDu-Plattenepithelkarzinomzellen (EV2, IW30, IH43) von ILK moduliert. So zeigen ILK^{fl/fl} Fibroblasten eine zwei- bis viermal höhere Fibronectin/Poly-L-Lysin-Ratio (Fn/poly-L-Ratio) als ILK^{-/-} Zellen. Auch bei FaDu-ILK-Transfektanten wird die Koloniebildung und das Wachstum in unterschiedlichem Maße substratabhängig beeinflusst. IW30 Zellen profitierten am stärksten durch die Adhäsion an Fibronectin, während EV2 und IH43 Zellen eine ähnliche Fibronectin/Poly-L-Lysin-Ratio aufweisen. Im Vergleich zu DMSO-Kontrollen ist der proliferationsfördernde Effekt von Fibronectin unter BIBX-Behandlung in den Mausfibroblasten stärker und in den transfizierten Tumorzellen schwächer ausgeprägt. Das klonogene Überleben und die Proliferation wurden gemäß Kap. 4.6.1.2 bzw. Kap. 4.10 an bestrahlten (2 Gy) oder nicht bestrahlten (Co) Zellen ermittelt. Um die Fibronectin/Poly-L-Lysin-Ratio zu berechnen, wurde die Zell- bzw. Koloniezahl auf Fibronectin relativ zum entsprechenden Wert auf Poly-L-Lysin Wert angegeben.

bensvorteil als IW30 Transfektanten, was bedeuten könnte, dass IH43 Zellen weniger auf die substratvermittelte Stimulation angewiesen sind. Bei den Versuchen zur Zellproliferation bot sich ein ähnliches Bild, wobei die IW30 Transfektanten hier sogar eine bis zu zehnfach gesteigerte Proliferation durch Adhäsion auf Fibronectin aufwiesen. Im Gegensatz zu ILK-Mausfibroblasten reduzierte die Behandlung mit BIBX allerdings diesen Effekt bei den drei untersuchten Tumorzelllinien deutlich.

5.13 BIBX moduliert den Effekt von Fibronectin auf Überleben und Proliferation in FaDu-Zellen

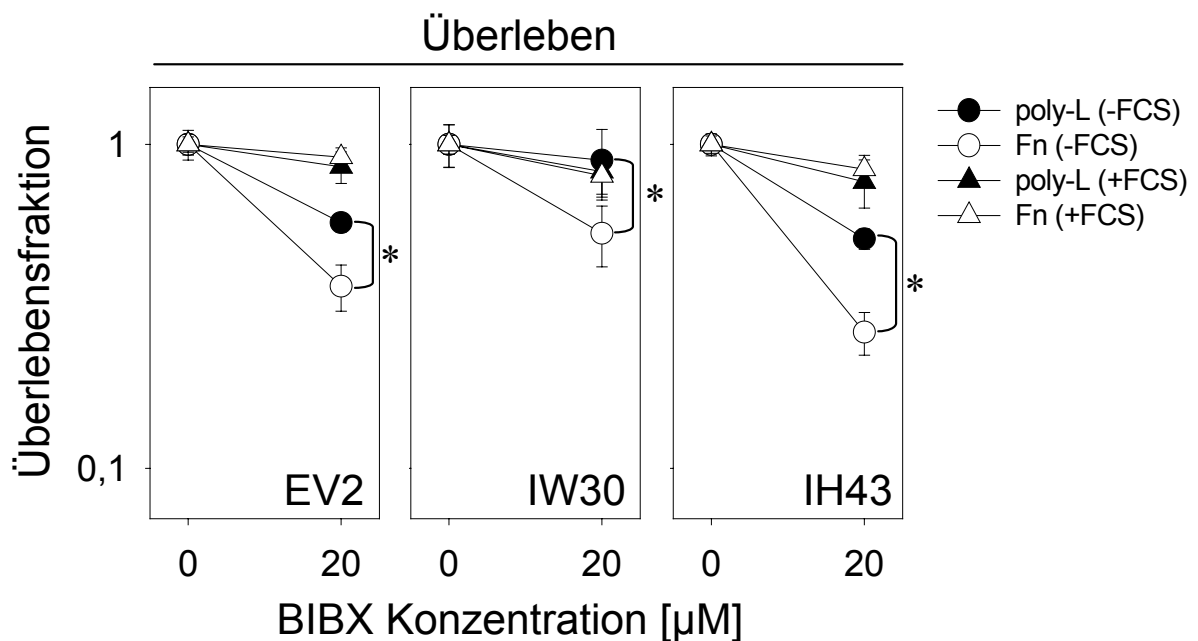


Abbildung 5.19: EGF-Rezeptor TK-Inhibition reduziert den Überlebensvorteil von Fibronectin in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren. In den drei untersuchten Zelllinien (EV2, IW30, IH43) ergab sich unter Serumentzug (-FCS) ein vermindertes Überleben auf Fibronectin (Fn) bei Behandlung mit BIBX relativ zur Kontrolle auf Poly-L-Lysin (poly-L). In Anwesenheit von Wachstumsfaktoren (+FCS) war dieser Effekt nicht zu beobachten. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Bei der statistischen Analyse wurden EV2 mit IW30 und IH43 Zellen auf Poly-L-Lysin mit den entsprechenden Zellkulturen auf Fibronectin verglichen (*). * $p < 0.05$

Im folgenden wurde der Einfluss von BIBX auf Überleben und Proliferation in Abhängigkeit von Substrat und Wachstumsfaktoren betrachtet. Wie in Abb. 5.19 und 5.20 zu erkennen, reduzierte die EGF-Rezeptor TK-Inhibition den durch Fibronectin vermittelten Überlebens- und Proliferationsvorteil in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren. Zwar ließ

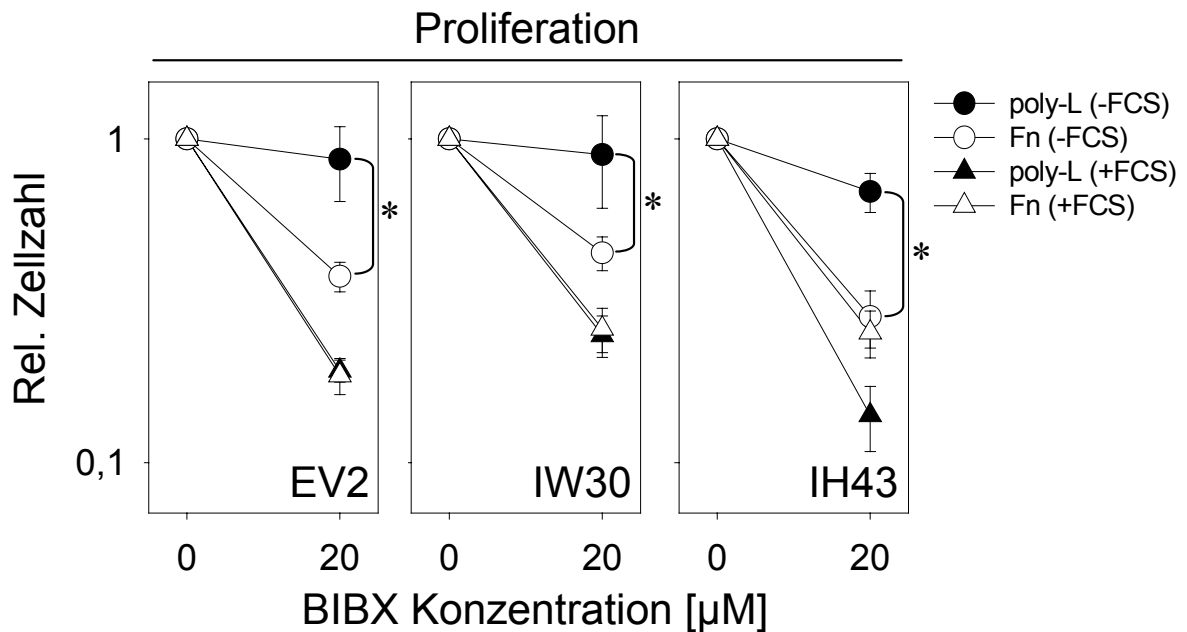


Abbildung 5.20: Neben der Modulation des substratabhängigen klonogenen Überlebens vermindert BIBX auch den proliferationsfördernden Effekt von Fibronectin (Fn) und Wachstumsfaktoren in FaDu-ILK-Transfektanten (EV2, IW30, IH43). So zeigten die Transfektanten in Abwesenheit von Serum (-FCS) eine durch BIBX deutlich reduzierte Proliferation auf Fibronectin, während auf dem Kontrollsubstrat Poly-L-Lysin (poly-L) sich durch EGF-Rezeptor TK-Inhibition kein Proliferationsnachteil ergab. Unter Serum Einfluss (+FCS) war der hemmende Effekt von BIBX noch deutlicher ausgeprägt, wobei sich hier allerdings kein substratabhängiger Unterschied ergab. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Bei der statistischen Analyse wurden EV2 mit IW30 und IH43 Zellen auf Poly-L-Lysin mit den entsprechenden Zellkulturen auf Fibronectin verglichen (*). * $p < 0.05$

sich absolut gesehen unter allen untersuchten Bedingungen eine vermehrte Koloniebildung sowie eine erhöhte Zellzahl bei an Fibronectin adhärennten Zellen nachweisen (siehe Abb. 5.18), allerdings führte in Abwesenheit von Serum die EGF-Rezeptor TK-Inhibition auf Fibronectin nicht aber auf Poly-L-Lysin zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Reduktion des Überlebens (siehe Abb. 5.19) und der Proliferation (siehe Abb. 5.20). In Gegenwart von Serum zeigte sich unter BIBX-Exposition substratunabhängig eine starke Inhibition des Zellwachstums (siehe Abb. 5.20), während das Überleben kaum moduliert wurde (siehe Abb. 5.19). Dies legt die Vermutung nahe, dass Wachstumsfaktoren mittels EGF-Rezeptor Phosphorylierung in stärkerem Maße die Proliferation als das Überleben beeinflussen.

5.14 EGF-Rezeptor TK-Inhibition führt zur Akkumulation von G1-Phase Zellen

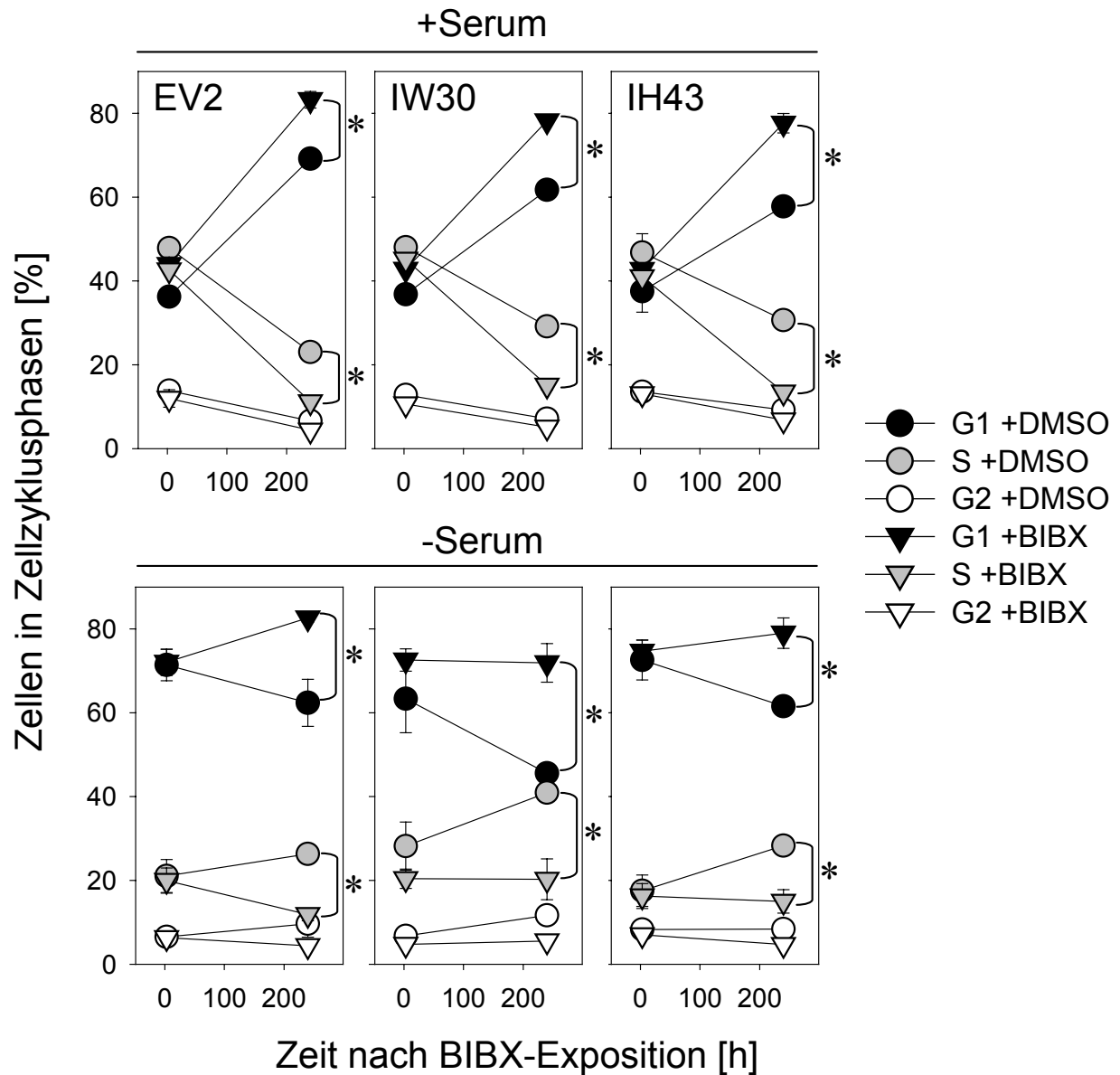


Abbildung 5.21: EGF-Rezeptor TK-Inhibition führt zur Akkumulation von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus und damit einhergehend zu einer Reduktion der S-Phase-Zellen. Unabhängig von Wachstumsfaktoren zeigten an Fibronectin adhärenente EV2, IW30 und IH43 Transfektanten eine Verschiebung von Zellen aus der S-Phase in die G1-Phase 10 Tage nach BIBX Entfernung. Die Zellen wurden kombiniert mit BrdU und Propidium Jodid gefärbt, um anschließend mittels FACS-Analyse die Zellzyklus-Phasen zu bestimmen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Bei der statistischen Analyse wurden die mit BIBX behandelten Zellen mit den jeweiligen DMSO-Kontrollen (*) verglichen. * $p < 0.05$

Aufgrund der durch EGF-Rezeptor TK-Inhibition erzielten Effekte auf das Zellwachstum, wurde im folgenden die Verteilung der FaDu-ILK-Transfektanten in den verschiedenen Zellzyklusphasen 3 Stunden und 11 Tage nach BIBX- bzw. DMSO-Exposition untersucht. Letzterer Zeitpunkt entsprach dem Endpunkt der Koloniebildungs- und Zellwachstumsversuche.

Während 3 Stunden nach BIBX-Exposition im Vergleich zu DMSO Kontrollen kein Unterschied in der Verteilung der Zellen im Zellzyklus zu beobachten war, zeigte sich 11 Tage später bei allen drei Zelllinien eine signifikante Akkumulation von G1-Phase Zellen, was von einer Reduktion der in der S-Phase befindlichen Zellen begleitet war. Der Prozentsatz der G2-Phase Zellen blieb unverändert. Diese durch BIBX vermittelten Effekte zeigten sich wachstumsfaktorunabhängig.

Mit DMSO behandelte EV2 und IH43 Zellen auf Fibronectin zeigten keinen serumabhängigen Unterschied in der Zellzyklus-Verteilung, während sich IW30 Zellen 11 Tage nach Serumentzug weniger in der G1-Phase und vermehrt in der S-Phase befanden (siehe Abb. 5.21).

Um die Erkenntnisse über den Langzeit-Effekt von BIBX noch zu untermauern, wurden im folgenden Expression und Phosphorylierung von AKT, GSK3 β , Cyclin D1 und MAPK nach gleicher Behandlung betrachtet.

5.15 BIBX-Exposition besitzt einen Langzeit-Effekt auf die Proteinphosphorylierung

In an Fibronectin adhärenente Zellkulturen wurden 11 Tage nach BIBX-Exposition mittels Western-Blot verschiedene Proteinkinasen, die mit dem EGF-Rezeptor Signalweg in Verbindung stehen, untersucht.

Wie sich in Abb. 5.22 zeigt, blieben die Gesamtexpression von AKT und GSK3 β durch EGF-Rezeptor TK-Inhibition und Serumentzug unbeeinflusst. Die Expression von Cyclin D1 dagegen fiel bei Behandlung mit BIBX in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren verglichen mit DMSO-Zellkulturen nachweislich ab, wobei diese Reduktion bei den IW30 und IH43 Zellen auch unter Serumbedingungen stattfand. Außerdem führte die EGF-Rezeptor TK-Inhibition zu einer deutlich verminderten Phosphorylierung von AKT an Serin 473 und von GSK3 β an Serin 9, wobei überraschenderweise die IH43 Zellen bei BIBX-Exposition unter Serumentzug keine Veränderung der GSK3 β -S9 Phosphorylierung aufwiesen. Während EGF-Rezeptor TK-Inhibition keinen Einfluss auf die MAPK-Expression besaß, zeigten sich ILK-abhängige Unterschiede in den verschiedenen Zelllinien. So führte der Serumentzug zur Reduktion des Gesamtproteins in IW30 und

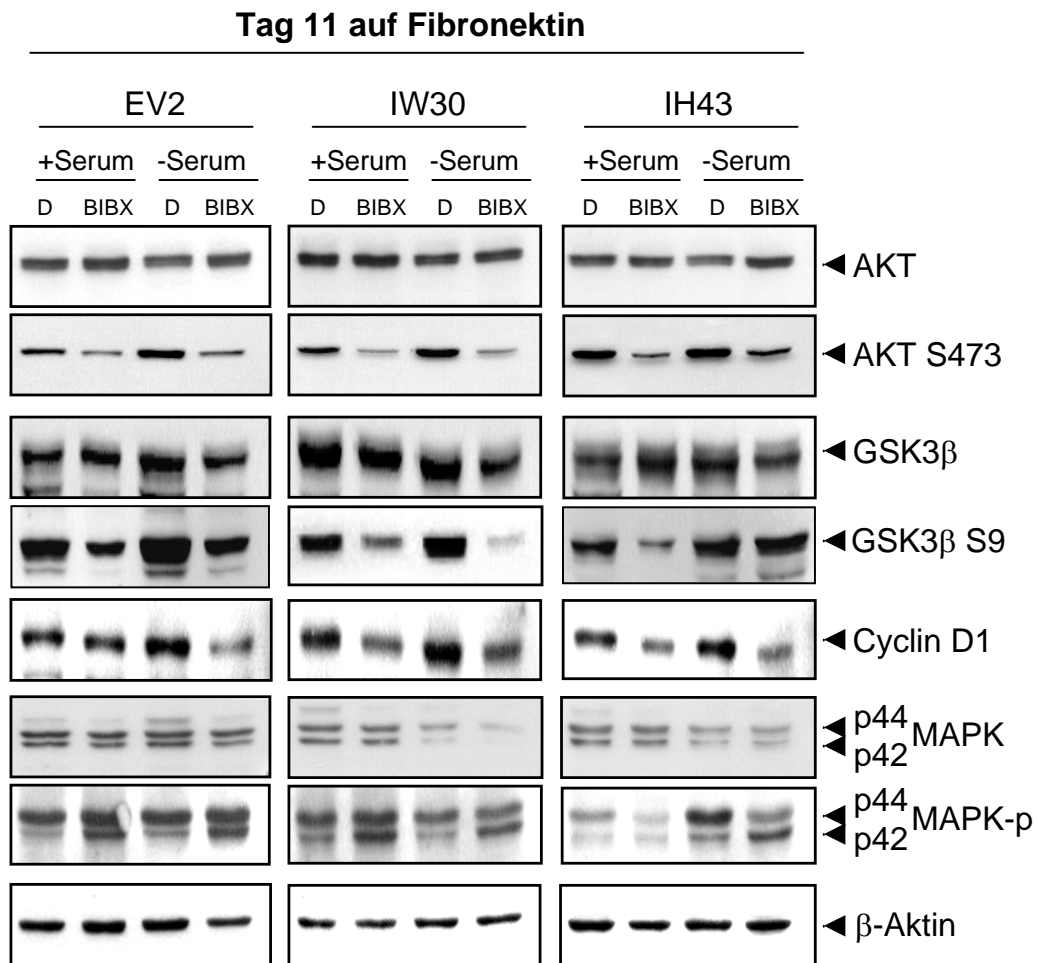


Abbildung 5.22: In den FaDu-ILK-Transfektanten (EV2, IW30, IH43) zeigen die Phosphorylierung von AKT S473 und GSK3β S9 sowie die Expression von Cyclin D1 eine deutliche Reduktion durch die Behandlung mit BIBX verglichen mit den DMSO-Kontrollen (D). Die Gesamtexpression von AKT und GSK3β blieb von der EGF-Rezeptor TK-Inhibition unbeeinflusst. MAPK war in IW30 und IH43 Zellen 11 Tage nach Serumentzug (-Serum) deutlich vermindert, wobei es unter BIBX zu einer gesteigerten Phosphorylierung in den EV2 und IW30 Zellen kam. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

IH43 Zellen, jedoch nicht in den Vektorkontrollen. Mit BIBX behandelte EV2 und IW30 Zellen zeigten eine stärkere Phosphorylierung von MAPK als DMSO-exponierte Zellen, während in IH43 Zellen die Phosphorylierung durch EGF-Rezeptor TK-Inhibition nur wenig beeinflusst wurde.

5.16 BIBX reduziert die Zellgröße und steigert die E-Cadherin Expression in FaDu-ILK-Transfektanten

Während EGF-Rezeptor TK-Inhibition in normalen Mausfibroblasten keine morphologische Veränderung bewirkte, ergaben mikroskopische Analysen von transfizierten FaDu-Plattenepithelkarzinomzellen 11 Tage nach BIBX-Behandlung im Vergleich zu DMSO-Kontrollen deutliche Unterschiede in der Zellmorphologie. So war bei den Zellen eine Verminderung der Zellgröße auf ca. 50% zu erkennen (siehe Abb. 5.24).

Da die Kolonien nach BIBX-Exposition außerdem dichter erschienen, als unter Kontrollbedingungen, lag die Vermutung nahe, dass EGF-Rezeptor TK-Inhibition zu einem verstärkten Zell-Zell-Kontakt mit erhöhten Proteinspiegeln von E-Cadherin führt. Aus diesem Grund wurde im folgenden mittels Western-Blot-Analyse die Expression von E-Cadherin bezüglich ILK-abhängiger Unterschiede und BIBX vermittelter Modulation untersucht.

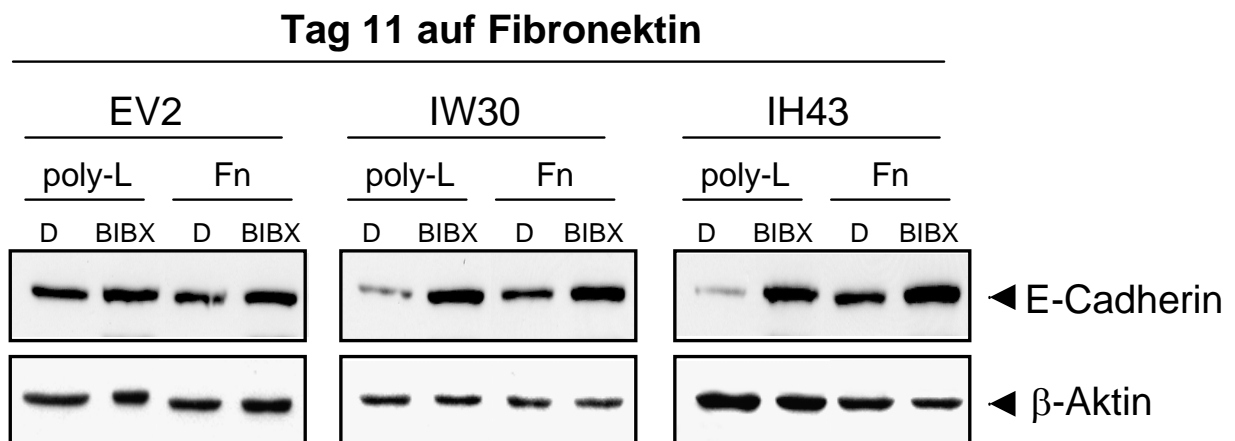


Abbildung 5.23: Erhöhte Aktivität von ILK in IW30 und IH43 Zellen führten zu einer starken Reduktion der E-Cadherin Expression bei DMSO-Exposition (D) auf Poly-L-Lysin (poly-L) im Vergleich zu EV2 Zellen. Durch Adhäsion an Fibronektin (Fn) oder BIBX vermittelter EGF-Rezeptor TK-Inhibition konnte dieser Effekt antagonisiert werden. Zellysate wurden 11 Tage nach BIBX- oder DMSO-Behandlung hergestellt. E-Cadherin und β -Aktin wurden wie unter 4.7 beschrieben detektiert.

Wie in Abb. 5.23 gezeigt, war im Vergleich zu EV2 Vektorkontrollen E-Cadherin in an Poly-L-Lysin adhärenen IW30 und IH43 Zellen deutlich reduziert, wobei es durch Adhäsion an Fibronektin zu einer Steigerung der Expression kam und alle drei Zelllinien gleiche E-Cadherin-Proteinspiegel zeigten. Nach BIBX-Behandlung war in allen Transfektanten eine starke Induktion von E-Cadherin zu beobachten, welche in den IH43 Zellen etwas ausgeprägter war als in den IW30 und EV2 Transfektanten.

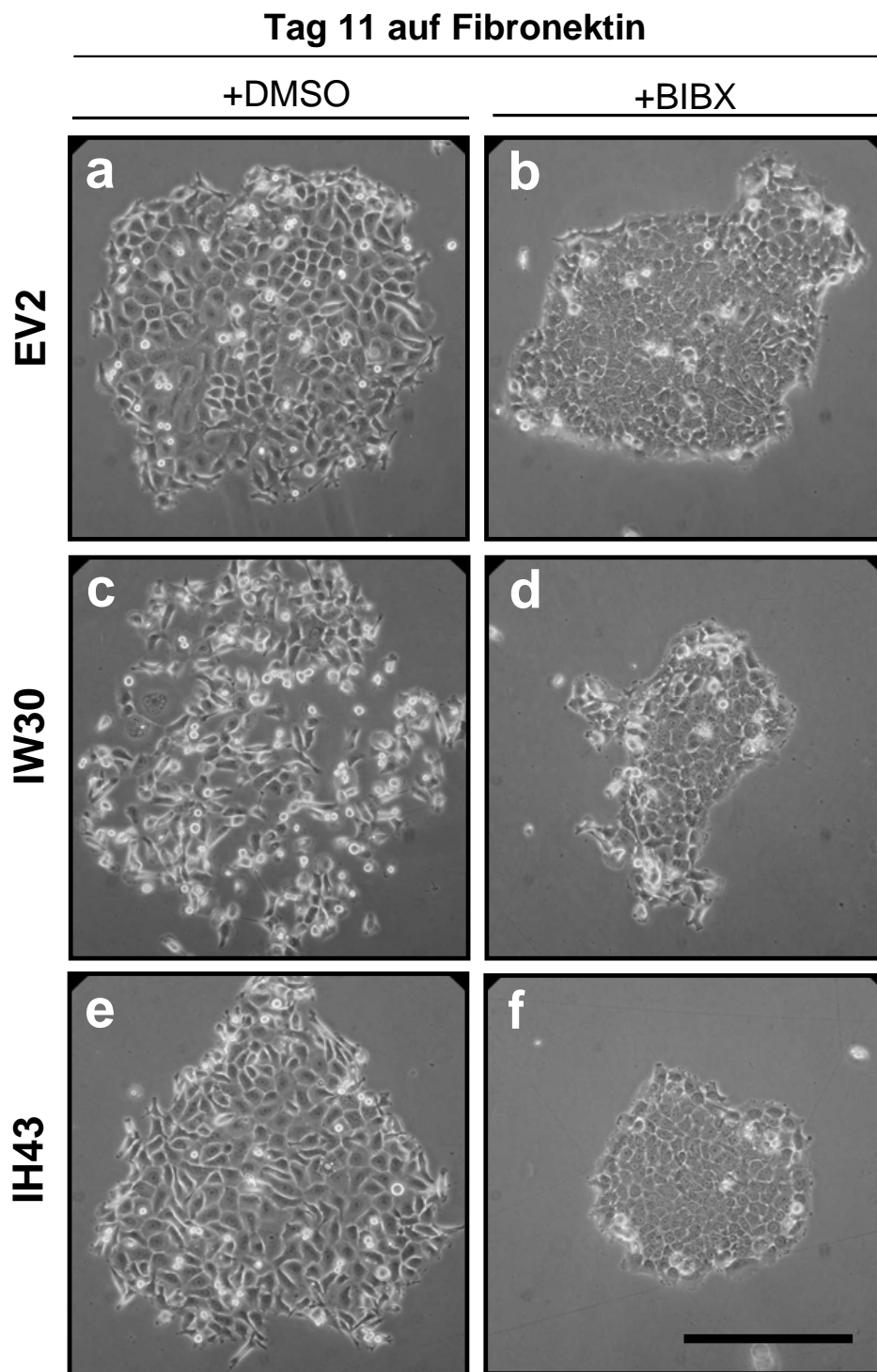


Abbildung 5.24: BIBX bewirkte Veränderungen in der Zellmorphologie von FaDu-Plattenepithelkarzinomzellen nicht aber von murinen Fibroblasten. Mittels Phasen-Kontrast-Mikroskop wurden die Zellkolonien 11 Tage nach EGF-Rezeptor TK-Inhibition untersucht. Die mit BIBX behandelten Zellen (b, d, f) wiesen eine deutliche Größenreduktion im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen (a, c, e) auf. Balken, 100 μm .

6 Diskussion

Zellüberleben und Proliferation werden durch Integrin- und Wachstumsfaktorrezeptoren kontrolliert, wobei diese Interaktionen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen gegen ionisierende Strahlung [40, 44, 96] und Zytostatika [49, 120, 196] spielen. Trotz des detaillierten Wissens über Struktur und Aktivierung des EGF-Rezeptors bleiben die molekularen Mechanismen bei der Antagonisierung der EGF-Rezeptor TK-Inhibitoren, die zur Gruppe von neuartigen, zielgerichteten Medikamenten gehören, in menschlichen Tumoren bis heute unklar. Insbesondere Proteinkinasen, die wie ILK sowohl an der Integrin vermittelten Adhäsion beteiligt sind, als auch eine Verbindung zum EGF-Rezeptor besitzen, scheinen zum Teil für die verminderte Effektivität solcher Inhibitoren verantwortlich zu sein.

In dieser Studie wurde gezeigt, dass (1) der Verlust von Adhäsion in murinen Fibroblasten unabhängig von ILK zu einer vermehrten Oberflächenexpression von β_1 - und α_5 -Integrinen sowie zu einer verminderter Phosphorylierung von AKT, FAK und GSK3 β führt; (2) die Adhäsion an Fibronectin PI3K-abhängig eine Zunahme der Phosphorylierung von AKT, FAK und GSK3 β bewirkt, wobei die zelluläre Strahlensensibilität in Abhängigkeit von ILK reduziert wird; (3) ILK^{fl/fl} Zellen ebenso wie mit ILK-Wildtyp oder konstitutiv aktiver ILK Kinase transfizierte FaDu-Tumorzellen wachstumsfaktorabhängig eine signifikant erhöhte Strahlenempfindlichkeit verglichen mit ILK^{-/-} Zellen bzw. Vektor-kontrollen aufweisen; (4) die untersuchten Fibroblasten gegenüber der antiproliferativen Wirkung des EGF-Rezeptor TK-Inhibitors BIBX1382BS unempfindlich sind, während FaDu-ILK-Transfektanten eine starke Wachstumsverzögerung ohne Änderung der Strahlensensibilität zeigen; (5) in Abhängigkeit von ILK diese Wachstumsverzögerung mit einer Akkumulation von G1-Phase Zellen sowie einer Reduktion der Cyclin D1-Expression und der Phosphorylierung von AKT und GSK3 β 10 Tage nach Exposition mit dem Inhibitor korreliert; (6) sowohl Adhäsion an Fibronectin, als auch EGF-Rezeptor TK-Inhibition eine vermehrte E-Cadherin Expression induzieren.

Die Daten zeigen bei anhaltendem Verlust der Adhäsion eine Zunahme von membranständigen β_1 - und α_5 -Integrinen, die als heterodimerer Rezeptor die Bindung an das Matrixprotein Fibronectin vermitteln. Diese Induktion von Oberflächenrezeptoren durch fehlende Stimulation dient als feedback-Mechanismus, um die Zellen in die Lage

zu versetzen, möglichst schnell an das Zellüberleben fördernde Substrat zu adhären. Dieser Prozess könnte bei der systemischen Streuung von Tumoren, welche entscheidend die klinische Prognose und die Möglichkeit zur kurativen Therapie des Patienten mitbestimmt, eine wichtige Rolle spielen. Um zu metastasieren, müssen Zellen nicht nur in Blut- oder Lymphgefäße einwandern, sondern diese auch wieder verlassen. Dafür sind, wie es auch für die Diapedese von Leukozyten beschrieben wurde [149, 225], Integrine von Bedeutung. Zudem wurde in Studien gezeigt, dass β_1 -Integrine die Invasivität von Tumorzellen mittels Interaktion mit verschiedenen Matrix-Metallo-Proteinasen *in vitro* modulieren [43, 66]. Genauere Kenntnisse könnten aus diesem Grund den Einsatz von Anti-Integrin-Medikamenten zur Prophylaxe von Metastasierung bei chirurgischer Sanierung des Tumors sowie im Rahmen einer Chemo- bzw. Strahlentherapie als sinnvoll erscheinen lassen.

Neben der vermehrten Integrin-Oberflächenexpression zeigte sich bei den Fibroblasten in Suspension außerdem eine Dephosphorylierung verschiedener Signalproteine, darunter FAK Y397, was schon von Beinke et al. in humanen A549 Bronchialkarzinomzellen beobachtet worden war [16]. Interessanterweise wird in verschiedenen Tumorzelllinien dieser Effekt auch durch Stimulation mit EGF verursacht, wobei hier die Dephosphorylierung von FAK umgekehrt eine Ablösung der Zellen vom Substrat bedingt [138]. Dieser Mechanismus könnte einen entscheidenden Schritt in der Wachstumsfaktor vermittelten Migration und Invasion von Tumorzellen darstellen. Bei den ILK^{fl/fl} Zellen war die Reduktion von phospho-FAK Y397 durch EGF ebenfalls zu sehen, nicht jedoch in den ILK defizienten Fibroblasten, was darauf hindeutet, dass die Interaktion zwischen EGF-Rezeptor und FAK von ILK moduliert wird.

Unserer Ansicht nach reflektiert dieses Verhalten eine Rolle von ILK im adhäsionsabhängigen Wachstum. Entgegen der momentanen Ansicht, dass eine ILK Überexpression, wie sie auch in diversen Tumorentitäten gezeigt wurde, adhäsionsunabhängiges Wachstum bedingt, zeigen unsere Daten einen Verlust der ILK Expression in malignen Tumoren im Vergleich zu Normalgewebe und eine erhöhte zelluläre Resistenz, gegenüber genotoxischem Stress in Abwesenheit von ILK. Letzteres könnte auf einen inhibierenden Effekt von ILK auf die Funktion von β_1 - und β_3 -Integrin zurückzuführen sein. Eine mögliche Folge wäre ein «priming» der Zellen durch ILK Überexpression oder konstitutiv aktive Kinase gegenüber chemo- oder strahleninduzierter später Apoptose. Weitere Studien werden diese Annahme testen müssen.

Desweiteren zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die radioprotektive Wirkung von ILK während der Zellausbreitung auf Fibronectin abhängig von PI3K zu sein scheint. Während ILK^{fl/fl} Zellen bei Bestrahlung innerhalb der ersten sechs Stunden nach

Adhäsionsbeginn eine vermehrte Strahlenresistenz aufwiesen als die ILK defizienten Zellen, glich sich das klonogene Überleben der beiden Zelllinien durch Inhibition von PI3K mit Ly294002 an. Dieser Effekt konnte jedoch nicht mit einer verminderten Phosphorylierung von AKT oder GSK3 β in den ILK^{-/-} Zellen erklärt werden.

Möglicherweise spielt der mittels Immunfluoreszenz beobachtete Zellausbreitungsdefekt und die gestörte Organisation des Aktinzytoskeletts, welche auch in anderen Studien beschrieben wurden [177, 80], für die unterschiedliche Strahlensensibilität eine Rolle. So deutet das parallel zur Zellausbreitung zunehmende Überleben nach Bestrahlung beider Zelllinien auf eine Abhängigkeit zwischen Aktinaufbau und Überleben nach Bestrahlung hin.

Nach 24 Stunden in Adhäsion auf dem Substrat Fibronectin, zeigten sich beide Zelllinien gleich strahlenempfindlich, während auf dem Kontrollsubstrat Poly-L-Lysin die ILK Expression wachstumsfaktorabhängig zu einer Sensibilisierung der ILK^{fl/fl} Zellen gegenüber strahleninduzierten genotoxischen Schäden führte. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch die Untersuchungen an den mit ILK-Konstrukten transfizierten FaDu-Plattenepithelkarzinomzellen und an A549-ILK-Transfektanten [39]. Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Beobachtungen, welche von Duxbury et al. bei der Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit Gemcitabin beschrieben wurden [61], könnte darauf basieren, dass durch Exposition mit genotoxischen Substanzen Apoptose ausgelöst wird, während Bestrahlung vornehmlich interphasischen oder mitotischen Zelltod aufgrund irreparabler Schäden der DNA induziert [184]. Es lässt sich ebenfalls vermuten, dass die unterschiedliche Stimulation von Integrinrezeptoren auf den beiden Substraten und eine hierdurch bedingte modifizierte Kommunikation intrazellulärer Signalwege, eine entscheidende Rolle spielt.

Sowohl in ILK^{fl/fl} Fibroblasten, als auch in FaDu-Zellen, die mit Wildtyp-ILK oder konstitutiv aktiver ILK transfiziert worden waren zeigte sich eine verminderte Phosphorylierung von GSK3 β relativ zu ILK^{-/-} Zellen bzw. Vektorkontrollen, was im Einklang mit den Ergebnissen an A549-ILK-Transfektanten steht [39]. Dieser Effekt könnte für die ILK vermittelten Unterschiede in der zellulären Strahlensensibilität wichtig sein.

Da Wachstumsfaktoren in ILK^{fl/fl} nicht aber in ILK^{-/-} Zellen das Überleben nach Bestrahlung modulierten und ILK defiziente Fibroblasten außerdem eine vermehrte Expression und Phosphorylierung des EGF-Rezeptors aufwiesen, wurde die Interaktion von EGF-Rezeptor und ILK genauer untersucht.

Dem EGF-Rezeptor kommt in der Tumorforschung eine große Bedeutung zu. Es sind zahlreiche Mutationen beschrieben, die zu Überexpression, verminderten Abbau durch Internalisierung und konstitutiver Kinase-Aktivität führen. Diese Veränderungen bewirken

einen Überlebens- und Proliferationsvorteil und fördern die Tumor assoziierte Angiogenese und Aktivierung von Matrix-Metallo-Proteasen (MMPs) [186]. Die große Ähnlichkeit der EGF-Rezeptor abhängigen abnormalen Regulationsmechanismen in verschiedenen epithelialen Tumoren [179, 183] führte zu der Entwicklung von TK-Inhibitoren, welche gegen die Adenosintriphosphat-Bindungsstelle innerhalb der katalytischen Domäne des EGF-Rezeptors gerichtet sind [158, 67]. Trotz der ermutigenden Ergebnisse, die durch Monotherapie sowie in Kombination mit Bestrahlung oder Zytostatikaapplikation *in vitro* und *in vivo* erzielt werden konnten [75, 122, 11], kommt es bei klinischer Anwendung zu Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegenüber den verwendeten Substanzen. Möglicherweise sind hierfür Integrine und nachgeschaltete Signalproteine wie ILK von Bedeutung. Zudem besteht über Pinch-1 und Nck-2 eine Verbindung zwischen ILK und dem EGF-Rezeptor.

Aus diesem Grund wurden die verschiedenen Zelllinien mit dem EGF-Rezeptor TK-Inhibitor BIBX1382BS behandelt und die Auswirkungen dieser Exposition auf das klonogene Überleben nach Bestrahlung, die Proliferation, den Zellzyklus und die Proteinkinasephosphorylierung in Abhängigkeit von ILK bestimmt.

Bei den FaDu-Plattenepithelkarzinomzellen zeigte sich bei Inkubation des Inhibitors unter Serumentzug eine Reduktion der Koloniezahl. In Gegenwart von fetalem Kälberserum erzielte die Behandlung mit BIBX1382BS hingegen keinen signifikanten Effekt auf das Zellüberleben. Hierzu ist zu bemerken, dass das verwendete Kälberserum neben EGF eine Vielzahl von verschiedenen Hormonen und Wachstumsfaktoren wie «platelet-derived growth factor» (PDGF) [37], «transforming growth factor- β » (TGF- β) [145, 214] und «insulin-like growth factor I» (IGF-I) [20] enthält, wobei BIBX1382BS als spezifischer Inhibitor aber nur die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors hemmt. Durch die Stimulation anderer Wachstumsfaktorrezeptoren könnte so die negative Wirkung der EGF-Rezeptor TK-Inhibition auf das Überleben kompensiert werden.

Da unter der Behandlung mit BIBX1382BS eine drastische Reduktion der Koloniegröße bei den FaDu-ILK-Transfektanten auffiel, wurde zusätzlich eine Zellzahlbestimmung durchgeführt, um den Einfluss des EGF-Rezeptors auf die Proliferation zu bestimmen. Hierbei zeigte sich unter Inkubation mit BIBX1382BS ein starker antiproliferativer Effekt, der auch in Gegenwart von Kälberserum zu beobachten war. Daraus lässt sich schließen, dass bei den untersuchten FaDu-Plattenepithelkarzinomzellen der EGF-Rezeptor für die Proliferation eine übergeordnete Rolle spielt und dessen Inhibition nicht, wie anhand der Koloniebildungsassays für das Überleben zu vermuten wäre, durch die Aktivierung und Signalweiterleitung der anderen Wachstumsfaktorrezeptoren kompensiert werden kann.

Bei den murinen Fibroblasten ergab sich durch den Einsatz von BIBX1382BS trotz nach-

weislicher Hemmung der Phosphorylierung von EGF-Rezeptor und nachgeschalteten Signalproteinen wie MAPK und AKT kein Unterschied in klonogenem Überleben oder Zellproliferation im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollen. Auch wenn es sich hierbei um murine Normalzellen handelt, deuten die Daten darauf hin, dass Normalgewebe im Vergleich zu Tumorzellen eine geringere Empfindlichkeit gegenüber EGF-Rezeptor TK-Inhibition aufweist, was eigentlich das therapeutische Fenster für diese Substanzen erweitern sollte. Diese Vermutung wird durch Untersuchungen von Fehrmann et al. unterstützt, die zeigen, dass durch den Einsatz von BIBX1382BS die zelluläre Strahlenantwort von oralen Mausmukosazellen unbeeinflusst blieb [69]. Für verschiedene Tumorzelllinien konnte hingegen in Abhängigkeit von Ras eine Radiosensibilisierung nachgewiesen werden [217].

Genauere Untersuchungen könnten Aufschluss darüber geben, ob eine abweichende Struktur des ErbB-Moleküls, die möglicherweise in den FaDu-Zellen eine längerfristige Hemmung des Rezeptors bewirkt, oder ob Unterschiede in der Interaktion von Signal- und Adapterproteinen ursächlich für die unterschiedliche Wirkung von BIBX1382BS auf die einzelnen Zelllinien sind. Hierbei ist von Bedeutung, dass Tumorzellen oft eine Überexpression des EGF-Rezeptors zeigen, worin die größere Empfindlichkeit gegenüber EGF-Rezeptor TK-Inhibition begründet sein könnte. Die Aufklärung dieser Fragen könnte die Entwicklung von Anti-Tumor-Medikamenten ermöglichen, die spezifisch maligne Zellen schädigen und für Chemotherapeutika oder Radiatio sensibilisieren und das Normalgewebe weitgehend unbeeinflusst lassen.

Neben der unterschiedlichen Sensibilität gegenüber EGF-Rezeptor TK-Inhibition zeigte sich in den Experimenten außerdem ein deutlich verbessertes Überleben von Zellen, die auf dem Matrixprotein Fibronectin kultiviert wurden. Dieser Effekt war in allen untersuchten Zelllinien sowohl in den unbehandelten Kontrollen, als auch nach Bestrahlung und EGF-Rezeptor TK-Inhibition nachweisbar und wurde bereits in vorangegangenen Studien beschrieben. So beobachteten Cordes et. al eine von Fibronectin vermittelte Radioresistenz in verschiedenen Tumorzelllinien und humanen Fibroblasten [44], während Teicher et. al zeigten, dass durch Entfernung des Tumors aus der EZM eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber alkylierenden Substanzen erreicht werden konnte [212]. Durch die adhäsionsvermittelte Modulation des Zellüberlebens könnte erklärt werden, weshalb Zytostatika und ionisierende Strahlen bei klinischer Anwendung eine geringere Wirksamkeit aufweisen, als sich aufgrund von *in vitro* Studien vermuten ließe. Somit ist das genaue Verständnis der Mechanismen sowie der an diesem Effekt beteiligten Proteine essentiell, um auch von Seiten der Zell-Matrix-Interaktionen eine Optimierung der Antitumor-Therapie von Patienten zu realisieren.

Da Integrine für die EZM-bedingte Resistenz von Zellen gegenüber genotoxischen Einflüssen eine entscheidende Rolle spielen [49, 93, 125] lässt sich vermuten, dass ILK als Bindungspartner von β_1 -Integrin ebenfalls an diesem Vorgang beteiligt ist. Diese Annahme wurde durch den Vergleich der verschiedenen Zelllinien untermauert. So fiel der durch Fibronectin hervorgerufene Überlebensvorteil bei den ILK^{-/-} Zellen deutlich geringer aus als bei den ILK-exprimierenden ILK^{fl/fl} Zellen. Auch die Vektorkontrollen zeigten auf dem Substrat Fibronectin im Vergleich zu Kulturen auf Poly-L-Lysin eine geringere Koloniebildung als die mit Wildtyp-ILK transfizierten FaDu-Zellen. Bei FaDu-ILK-Transfektanten, die konstitutiv aktive ILK Kinase exprimieren, war der Überlebensvorteil gegenüber den Vektorkontrollen jedoch nicht erhöht. Dies könnte darauf begründet, dass durch die aktivierende Mutation S343D in der *ILK*-DNA-Sequenz ILK gegenüber Integrin vermittelter Stimulation weniger sensibel ist und somit Fibronectin einen verminderten Einfluss auf das klonogene Überleben besitzt.

Da diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass ILK bei der Modulation des Zellüberlebens durch Proteine der EZM eine wichtige Rolle spielt, könnte der Einsatz von pharmakologischen ILK-Inhibitoren die Sensibilität von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika und Radiatio steigern und so zu einer verbesserten lokalen Tumorkontrolle und zu einer Reduktion der Metastasierungsrate führen.

Obwohl sich also unter allen Untersuchungsbedingungen eine vermehrte Koloniebildung sowie eine erhöhte Proliferation bei an Fibronectin adhären Zellen nachweisen ließ, reduzierte die Behandlung mit BIBX1382BS unter Serumentzug den durch Fibronectin verursachten Überlebens- und Proliferationsvorteil. Dieser Effekt zeigte sich nur in den FaDu-Zellen, nicht aber in den Mausfibroblasten, was vermuten lässt, dass in den Tumorzellen die Wirkung von Fibronectin auf Überleben und Zellproliferation abhängig von der EGF-Rezeptor Phosphorylierung ist. Im Einklang damit bewirkt Adhäsion an verschiedene Proteine der EZM in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren eine Aktivierung des EGF-Rezeptors und nachgeschalteter Signalmoleküle, wie in einer Vielzahl von Studien gezeigt wurde [18, 151, 197, 26]. Für die Interaktion von Integrin- und Wachstumsfaktorrezeptoren spielt ILK eine wichtige Rolle, wobei die in den FaDu-ILK-Transfektanten erhobenen Daten hier allerdings nur leichte Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien aufwiesen. Das könnte darin begründet sein, dass für die interaktive Rolle von ILK eher die ILK-Expression und weniger die Enzymaktivität von Bedeutung sein könnte [141], die Transfektanten aber vornehmlich in ihrer Kinaseaktivität differieren. Zudem haben wir uns in dieser Studie lediglich auf einige wenige Signalproteine der Integrin- und EGF-Rezeptor-Kaskade konzentriert. Der zusätzliche Einsatz eines Anti-Integrin-Agens kann möglicherweise die unter BIBX1382BS-Exposition beobachtete

Reduktion des Fibronectin vermittelten Überlebens- und Proliferationsvorteil synergistisch verstärken und so eine Kombinationstherapie dieser beiden Substanzklassen als sinnvoll erscheinen lassen.

Wie bereits in verschiedenen Studien gezeigt wurde, kommt es unter EGF-Rezeptor TK-Inhibition zu einer Akkumulation der Zellen in der G1-Phase [105, 5, 136, 23, 206]. Nyati et. al beobachteten parallel zu dieser Umverteilung von Zellen im Zellzyklus eine Induktion von p53 [160], einem wichtigen Regulatorprotein, welches nach genotoxischem Stress vermehrt stabilisiert und phosphoryliert wird und über p21 einen G1-Block auslöst [126, 104, 144]. In p53-mutierten Kolonkarzinomzellen trat unter EGF-Rezeptor TK-Inhibition mittels CI-1033 keine Modulation des Zellzyklus auf [160], was die Vermutung nahe legt, der Effekt könnte von p53 vermittelt sein. Damit könnte erklärt werden, weshalb kolorektale Karzinome, die eine Mutation im p53-Gen aufweisen, eine erhöhte Resistenz gegenüber dem selektiven ErbB1-Inhibitor Gefitinib zeigen [162]. Ariyama et al. beobachteten bei Adenokarzinomzellen der Gallenblase unter EGF-Rezeptor TK-Inhibition allerdings einen G1-Block, ohne dass eine Veränderung der p53 Expression oder Phosphorylierung eintrat [5]. Da die untersuchten FaDu-Plattenepithelkarzinomzellen das Protein nicht exprimieren [64], ist die von BIBX1382BS vermittelte Wirkung auf den Zellzyklus ebenfalls p53 unabhängig.

Eine andere Möglichkeit auf den Zellzyklus Einfluss zu nehmen, wird durch eine Interaktion des EGF-Rezeptors mit Cyclin D1 vermittelt. Cyclin D1 wird nach Aktivierung des ErbB-Moleküls vermehrt synthetisiert. Dieser Effekt scheint zum einen von «signal transducer and activator of transcription 3» (STAT3) vermittelt zu sein [170, 129], zum anderen beobachteten Lin et al., dass der EGF-Rezeptor *in vivo* an die Promotorregion von Cyclin D1 bindet und so direkt als Transkriptionsfaktor dienen könnte [133]. Da vorangegangene Studien [172] ebenso wie die Daten dieser Arbeit zeigen, dass EGF-Rezeptor TK-Inhibition zu einer Reduktion der Cyclin D1 Expression führt, könnte die Kinasefunktion des ErbB-Moleküls für die Interaktion der beiden Proteine relevant sein. Bei den untersuchten FaDu-Plattenepithelkarzinomzellen war dieser Effekt noch 10 Tage nach Entfernung des Inhibitors messbar. Gleichzeitig wiesen die Zellen eine verminderte Phosphorylierung von AKT und GSK3 β auf, wodurch auf die langfristige Wirkung von BIBX1382BS hingedeutet wird.

Neben den bereits beschriebenen Veränderungen fiel bei den mit dem EGF-Rezeptor TK-Inhibitor behandelten FaDu-ILK-Transfektanten eine deutliche Größenreduktion sowie ein verstärkter Zell-Zell-Kontakt auf. Aus diesem Grund wurde die Expression von E-Cadherin als wichtigem Regulator für interzelluläre Adhäsion bestimmt. Erhöhte ILK-Kinase Aktivität in den mit Wild-Typ-ILK und konstitutiv aktiver ILK Kinase

transfizierten Zellen bewirkte wie auch schon vorangegangene Untersuchungen gezeigt haben [235] eine Abnahme der E-Cadherin Synthese. Dieser Effekt wurde sowohl durch Adhäsion an das Matrixprotein Fibronectin, als auch durch BIBX1382BS vermittelte EGF-Rezeptor TK-Inhibition aufgehoben. Eine verminderte Phosphorylierung von GSK3 β und der dadurch ausgelöste Abbau des β -Catenin-Lef/Tcf-Komplexes führt *in vitro* zu einer vermehrten Expression von E-Cadherin [159, 167], wodurch sich die Zunahme der E-Cadherin Synthese unter EGF-Rezeptor TK-Inhibition erklären lässt. Auf Fibronectin zeigten die Zellen jedoch eine erhöhte GSK3 β -Phosphorylierung, weshalb für die beobachtete Induktion von E-Cadherin ein anderer Mechanismus ursächlich zu sein scheint. Chartier et al. konnten nachweisen, dass Adhäsion an Laminin in kolorektalen Karzinomzellen zu einer gesteigerten Expression von E-Cadherin führt. Dieser Effekt wird von PI3K und Rac1b, einer Splicing-Variante der GTPase Rac1, vermittelt [34]. Umgekehrt verstärkt E-Cadherin die Zelladhäsion muriner Fibroblasten an verschiedene Proteine der EZM, darunter Fibronectin und Kollagen-IV, wobei auch hier eine Mitbeteiligung von Rac1 vermutet wird [228]. Möglicherweise ist die GTPase auch für die in den FaDu-ILK-Transfektanten beobachtete Modulation der E-Cadherin Synthese durch Integrin vermittelte Adhäsion sowie durch EGF-Rezeptor TK-Inhibition von Bedeutung.

Integrin vermittelte Zelladhäsion bewirkt, wie aus den Ergebnissen ersichtlich wurde, ein verbessertes Überleben und Wachstum der Zellen, wodurch die antiproliferativen Effekte und der Überlebensnachteil durch EGF-Rezeptor TK-Inhibition in menschlichen Tumoren wenigstens teilweise antagonisiert werden. ILK scheint, wie in verschiedenen Zelllinien zu beobachten war, unterschiedliche Rollen für das Überleben nach Bestrahlung und nach Behandlung mit genotoxischen Substanzen zu besitzen. Durch Aufklärung der molekularen Mechanismen von Integrin und Wachstumsfaktor vermittelter Signalübertragung könnten signifikante Fortschritte in der Bekämpfung von Resistenzen gegen Bestrahlung und Zytostatika sowie in der Entwicklung neuer Anti-Tumor-Medikamente erzielt werden.

7 Zusammenfassung

Die genauen Mechanismen, welche für eine Reduktion der Effektivität von Strahlentherapie und pharmakologischer EGF-Rezeptor TK-Inhibition verantwortlich sind, sind bis heute unklar. Um den Einfluss von Adhäsion an Fibronectin und ILK auf diese Resistenzentwicklung zu untersuchen, wurden murine $ILK^{fl/fl}$ und $ILK^{-/-}$ Fibroblasten sowie humane mit Wildtyp-ILK (IW) und konstitutiv aktiver ILK Kinase (IH) transfizierte FaDu-Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals Bereichs verwendet.

Im Gegensatz zu $ILK^{-/-}$ Zellen und Vektorkontrollen zeigten $ILK^{fl/fl}$ Fibroblasten, IW und IH Zellen eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit. Während klonogenes Überleben und Zellproliferation der murinen Fibroblasten durch die EGF-Rezeptor TK-Inhibition mittels BIBX1382BS unbeeinflusst blieb, war bei FaDu-ILK-Transfektanten eine starke Proliferationsverzögerung ohne Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit zu beobachten. In Abhängigkeit von ILK korrelierte diese Proliferationsverzögerung mit einer Reduktion von Cyclin D1, phosphoryliertem AKT S473 und GSK3 β S9 über einen Zeitraum von 10 Tagen nach nur 3-stündiger Exposition mit BIBX1382BS. Adhäsion an Fibronectin bewirkte in allen untersuchten Zelllinien einen Überlebens- und Proliferationsvorteil, der signifikant von ILK und EGF-Rezeptor abhing.

Aufgrund dieser Ergebnisse könnte eine Inhibition von Adhäsions- und Wachstumsfaktorrezeptoren parallel zu konventionellen Radiotherapie- und Radiochemotherapie-regimen die Tumorkontrolle optimieren und so zu verbesserten Heilungschancen von Patienten mit malignen Erkrankungen beitragen.

Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht ErbB-Mutationen	30
2.2	ErbB Inhibitoren	33
4.1	Adhäsionsassay: Verwendete Zellzahlen	51
4.2	Koloniebildungsassay: Verwendete Zellzahlen	52
4.3	Lysate: Verwendete Zellzahlen	54

Abbildungsverzeichnis

2.1	Übersicht Integrinrezeptoren	14
2.2	Übersicht Integrinstruktur	16
2.3	Übersicht ILK Struktur	18
2.4	Übersicht FAK Struktur	24
2.5	Bindung von FAK und Paxillin	26
2.6	ErbB1-Homodimer	28
2.7	Strukturformel von BIBX1382BS	32
3.1	pUSEamp	35
5.1	Integrinmessung in Suspension	61
5.2	Adhäsionsassay: Immunfluoreszenz	62
5.3	Adhäsionsassay: Western-Blot (ILK ^{fl/fl})	64
5.4	Adhäsionsassay: Western-Blot (ILK ^{-/-})	65
5.5	Adhäsionsassay: Strahlensensibilität	66
5.6	Dosis-Effekt-Kurve Bestrahlung: ILK Fibroblasten	67
5.7	Strahlensensibilität auf verschiedenen EZM-Substraten	68
5.8	ILK Kinase Assay: FaDu-ILK-Transfektanten	69
5.9	Dosis-Effekt-Kurve Bestrahlung: FaDu-ILK-Transfektanten	70
5.10	Western-Blot nach EGF-Stimulation	71
5.11	Immunfluoreszenz: Vergleich der AKT-Lokalisation	72
5.12	Optimierung der BIBX-Konzentration (ILK ^{fl/fl} , ILK ^{-/-})	73
5.13	Überleben nach BIBX-Behandlung (ILK ^{fl/fl} , ILK ^{-/-})	74
5.14	Proliferation nach BIBX-Behandlung (ILK ^{fl/fl} , ILK ^{-/-})	75
5.15	Optimierung der BIBX-Konzentration (FaDu-Zellen)	76
5.16	Überleben nach BIBX-Behandlung (FaDu-Zellen)	78
5.17	Proliferation nach BIBX-Behandlung (FaDu-Zellen)	79
5.18	Fibronectin/Poly-L-Lysin-Ratio	81
5.19	Überleben nach BIBX-Behandlung	82
5.20	Proliferation nach BIBX-Behandlung	83
5.21	Zellzyklusmessung nach BIBX-Behandlung	84

Abbildungsverzeichnis

5.22 Western-Blot nach BIBX-Behandlung	86
5.23 Western-Blot: E-Cadherin	87
5.24 FaDu-Kolonien nach BIBX-Behandlung	88

Literaturverzeichnis

- [1] Adams, J. C. and Watt, F. M. Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface. *Cell*, 63(2):425–435, Oct 1990.
- [2] Ahmed, N., Oliva, K., Rice, G. E., and Quinn, M. A. Cell-free 59 kDa immunoreactive integrin-linked kinase: a novel marker for ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10(7):2415–2420, Apr 2004.
- [3] Ahmed, N., Riley, C., Oliva, K., Stutt, E., Rice, G. E., and Quinn, M. A. Integrin-linked kinase expression increases with ovarian tumour grade and is sustained by peritoneal tumour fluid. *J Pathol*, 201(2):229–237, Oct 2003.
- [4] Aoudjit, F. and Vuori, K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*, 20(36):4995–5004, Aug 2001.
- [5] Ariyama, H., Qin, B., Baba, E., Tanaka, R., Mitsugi, K., Harada, M., and Nakano, S. Gefitinib, a selective EGFR tyrosine kinase inhibitor, induces apoptosis through activation of Bax in human gallbladder adenocarcinoma cells. *J. Cell. Biochem.*, 97:724–734, Mar 2006.
- [6] Aronsohn, M. S., Brown, H. M., Hauptman, G., and Kornberg, L. J. Expression of focal adhesion kinase and phosphorylated focal adhesion kinase in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope*, 113(11):1944–1948, Nov 2003.
- [7] Attwell, S., Mills, J., Troussard, A., Wu, C., and Dedhar, S. Integration of cell attachment, cytoskeletal localization, and signaling by integrin-linked kinase (ILK), CH-ILKBP, and the tumor suppressor PTEN. *Mol Biol Cell*, 14(12):4813–4825, Dec 2003.
- [8] Bao, J., Alroy, I., Waterman, H., Schejter, E., Brodie, C., Gruenberg, J., and Yarden, Y. Threonine phosphorylation diverts internalized epidermal growth factor receptors from a degradative pathway to the recycling endosome. *J. Biol. Chem.*, 275:26178–26186, Aug 2000.

- [9] Batlle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*, 2(2):84–89, Feb 2000.
- [10] Batzer, A. G., Rotin, D., Urena, J. M., Skolnik, E. Y., and Schlessinger, J. Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol*, 14(8):5192–5201, Aug 1994.
- [11] Baumann, M. and Krause, M. Targeting the epidermal growth factor receptor in radiotherapy: radiobiological mechanisms, preclinical and clinical results. *Radiother Oncol*, 72(3):257–266, Sep 2004.
- [12] Baumann, M., Krause, M., Zips, D., Eicheler, W., Dorfler, A., Ahrens, J., Petersen, C., Bruchner, K., and Hilberg, F. Selective inhibition of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by BIBX1382BS and the improvement of growth delay, but not local control, after fractionated irradiation in human FaDu squamous cell carcinoma in the nude mouse. *Int J Radiat Biol*, 79(7):547–559, Jul 2003.
- [13] Beerli, R. R. and Hynes, N. E. Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities. *J Biol Chem*, 271(11):6071–6076, Mar 1996.
- [14] Beguinot, L., Lyall, R. M., Willingham, M. C., and Pastan, I. Down-regulation of the epidermal growth factor receptor in KB cells is due to receptor internalization and subsequent degradation in lysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(8):2384–2388, Apr 1984.
- [15] Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382(6592):638–642, Aug 1996.
- [16] Beinke, C., Van Beuningen, D., and Cordes, N. Ionizing radiation modules of the expression and tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated proteins focal adhesion kinase (FAK) and its substrates p130cas and paxillin in A549 human lung carcinoma cells in vitro. *Int J Radiat Biol*, 79(9):721–731, Sep 2003.
- [17] Berridge, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361(6410):315–325, Jan 1993.
- [18] Bill, H., Knudsen, B., Moores, S., Muthuswamy, S., Rao, V., Brugge, J., and Miranti, C. Epidermal growth factor receptor-dependent regulation of integrin-mediated

- signaling and cell cycle entry in epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.*, 24:8586–8599, Oct 2004.
- [19] Biscardi, J. S., Maa, M. C., Tice, D. A., Cox, M. E., Leu, T. H., and Parsons, S. J. c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem*, 274(12):8335–8343, Mar 1999.
- [20] Bjerknes, R. and Aarskog, D. Priming of human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes by insulin-like growth factor I: increased phagocytic capacity, complement receptor expression, degranulation, and oxidative burst. *J Clin Endocrinol Metab*, 80(6):1948–1955, Jun 1995.
- [21] Blume-Jensen, P. and Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411:355–365, May 2001.
- [22] Bowers, G., Reardon, D., Hewitt, T., Dent, P., Mikkelsen, R., Valerie, K., Lammering, G., Amir, C., and Schmidt-Ullrich, R. The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene*, 20:1388–1397, Mar 2001.
- [23] Braun, A., Stark, K., Dirsch, O., Hilger, R., Seeber, S., and Vanhoefer, U. The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib sensitizes colon cancer cells to irinotecan. *Anticancer Drugs*, 16:1099–1108, Nov 2005.
- [24] Bravou, V., Klironomos, G., Papadaki, E., Stefanou, D., and Varakis, J. Integrin-linked kinase (ILK) expression in human colon cancer. *Br. J. Cancer*, 89:2340–2341, Dec 2003.
- [25] Bravou, V., Klironomos, G., Papadaki, E., Taraviras, S., and Varakis, J. ILK overexpression in human colon cancer progression correlates with activation of beta-catenin, down-regulation of E-cadherin and activation of the Akt-FKHR pathway. *J Pathol*, 208(1):91–99, Jan 2006.
- [26] Cabodi, S., Moro, L., Bergatto, E., Boeri Erba, E., Di Stefano, P., Turco, E., Tarone, G., and Defilippi, P. Integrin regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor and of EGF-dependent responses. *Biochem. Soc. Trans.*, 32:438–442, Jun 2004.
- [27] Calalb, M. B., Polte, T. R., and Hanks, S. K. 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(2):954–963, Feb 1995.

- [28] Calderwood, D. A. and Ginsberg, M. H. Talin forges the links between integrins and actin. *Nat Cell Biol*, 5(8):694–697, Aug 2003.
- [29] Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J. C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282(5392):1318–1321, Nov 1998.
- [30] Carraway, K. L. r., Weber, J. L., Unger, M. J., Ledesma, J., Yu, N., Gassmann, M., and Lai, C. Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature*, 387(6632):512–516, May 1997.
- [31] Chang, C. P., Kao, J. P., Lazar, C. S., Walsh, B. J., Wells, A., Wiley, H. S., Gill, G. N., and Rosenfeld, M. G. Ligand-induced internalization and increased cell calcium are mediated via distinct structural elements in the carboxyl terminus of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 266(34):23467–23470, Dec 1991.
- [32] Chang, H., Riese, D. J. n., Gilbert, W., Stern, D. F., and McMahan, U. J. Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature*, 387(6632):509–512, May 1997.
- [33] Chang, L. and Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824):37–40, Mar 2001.
- [34] Chartier, N., Lainé, M., Gout, S., Pawlak, G., Marie, C., Matos, P., Block, M., and Jacquier-Sarlin, M. Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells. *J. Cell. Sci.*, 119:31–46, Jan 2006.
- [35] Chattopadhyay, A., Vecchi, M., Ji, Q. s., Mernaugh, R., and Carpenter, G. The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C-gamma1 with the activated EGF receptor. *J Biol Chem*, 274(37):26091–26097, Sep 1999.
- [36] Chen, W. S., Lazar, C. S., Poenie, M., Tsien, R. Y., Gill, G. N., and Rosenfeld, M. G. Requirement for intrinsic protein tyrosine kinase in the immediate and late actions of the EGF receptor. *Nature*, 328(6133):820–823, Aug 1987.
- [37] Childs, C. B., Proper, J. A., Tucker, R. F., and Moses, H. L. Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(17):5312–5316, Sep 1982.

- [38] Chinnaiyan, P., Huang, S., Vallabhaneni, G., Armstrong, E., Varambally, S., Tomlins, S., Chinnaiyan, A., and Harari, P. Mechanisms of enhanced radiation response following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (Tarceva). *Cancer Res.*, 65:3328–3335, Apr 2005.
- [39] Cordes, N. Overexpression of hyperactive integrin-linked kinase leads to increased cellular radiosensitivity. *Cancer Res*, 64(16):5683–5692, Aug 2004.
- [40] Cordes, N. Integrin-mediated cell-matrix interactions for pro-survival and anti-apoptotic signaling after genotoxic injury. *Cancer Lett*, Jan 2006.
- [41] Cordes, N., Beinke, C., Plasswilm, L., and van Beuningen, D. Irradiation and various cytotoxic drugs enhance tyrosine phosphorylation and beta(1)-integrin clustering in human A549 lung cancer cells in a substratum-dependent manner in vitro. *Strahlenther Onkol*, 180(3):157–164, Mar 2004.
- [42] Cordes, N., Blaese, M. A., Meineke, V., and Van Beuningen, D. Ionizing radiation induces up-regulation of functional beta1-integrin in human lung tumour cell lines in vitro. *Int J Radiat Biol*, 78(5):347–357, May 2002.
- [43] Cordes, N., Hansmeier, B., Beinke, C., Meineke, V., and van Beuningen, D. Irradiation differentially affects substratum-dependent survival, adhesion, and invasion of glioblastoma cell lines. *Br J Cancer*, 89(11):2122–2132, Dec 2003.
- [44] Cordes, N. and Meineke, V. Cell adhesion-mediated radioresistance (CAM-RR). Extracellular matrix-dependent improvement of cell survival in human tumor and normal cells in vitro. *Strahlenther Onkol*, 179(5):337–344, May 2003.
- [45] Cordes, N., Seidler, J., Durzok, R., Geinitz, H., and Brakebusch, C. beta1-integrin-mediated signaling essentially contributes to cell survival after radiation-induced genotoxic injury. *Oncogene*, 25(9):1378–1390, Mar 2006.
- [46] Cordes, N. and van Beuningen, D. Cell adhesion to the extracellular matrix protein fibronectin modulates radiation-dependent G2 phase arrest involving integrin-linked kinase (ILK) and glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) in vitro. *Br J Cancer*, 88(9):1470–1479, May 2003.
- [47] Dacic, S., Flanagan, M., Cieply, K., Ramalingam, S., Luketich, J., Belani, C., and Yousem, S. Significance of EGFR protein expression and gene amplification in non-small cell lung carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, 125:860–865, Jun 2006.

- [48] Dai, D. L., Makretsov, N., Campos, E. I., Huang, C., Zhou, Y., Huntsman, D., Martinka, M., and Li, G. Increased expression of integrin-linked kinase is correlated with melanoma progression and poor patient survival. *Clin Cancer Res*, 9(12):4409–4414, Oct 2003.
- [49] Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A., and Dalton, W. S. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood*, 93(5):1658–1667, Mar 1999.
- [50] Damiano, J. S., Hazlehurst, L. A., and Dalton, W. S. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) protects the K562 chronic myelogenous leukemia cell line from apoptosis induced by BCR/ABL inhibition, cytotoxic drugs, and gamma-irradiation. *Leukemia*, 15(8):1232–1239, Aug 2001.
- [51] Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91(2):231–241, Oct 1997.
- [52] de la Fuente, M. T., Casanova, B., Garcia-Gila, M., Silva, A., and Garcia-Pardo, A. Fibronectin interaction with alpha4beta1 integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax. *Leukemia*, 13(2):266–274, Feb 1999.
- [53] de la Fuente, M. T., Casanova, B., Moyano, J. V., Garcia-Gila, M., Sanz, L., Garcia-Marco, J., Silva, A., and Garcia-Pardo, A. Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *J Leukoc Biol*, 71(3):495–502, Mar 2002.
- [54] Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(19):11211–11216, Sep 1998.
- [55] Deng, J. T., Sutherland, C., Brautigan, D. L., Eto, M., and Walsh, M. P. Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase. *Biochem J*, 367(Pt 2):517–524, Oct 2002.
- [56] Dent, P., Reardon, D., Park, J., Bowers, G., Logsdon, C., Valerie, K., and Schmidt-Ullrich, R. Radiation-induced release of transforming growth factor alpha activates the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase pathway

in carcinoma cells, leading to increased proliferation and protection from radiation-induced cell death. *Mol. Biol. Cell*, 10:2493–2506, Aug 1999.

- [57] Dent, P., Yacoub, A., Fisher, P. B., Hagan, M. P., and Grant, S. MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene*, 22(37):5885–5896, Sep 2003.
- [58] DiGiovanna, M. P., Lerman, M. A., Coffey, R. J., Muller, W. J., Cardiff, R. D., and Stern, D. F. Active signaling by Neu in transgenic mice. *Oncogene*, 17(14):1877–1884, Oct 1998.
- [59] Dittrich, C., Greim, G., Borner, M., Weigang-Kohler, K., Huisman, H., Amelsberg, A., Ehret, A., Wanders, J., Hanauske, A., and Fumoleau, P. Phase I and pharmacokinetic study of BIBX 1382 BS, an epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor, given in a continuous daily oral administration. *Eur J Cancer*, 38(8):1072–1080, May 2002.
- [60] Dong, L., Sun, H., Liu, W., Tao, D., Zhang, Y., and Xu, H. Effect of ligustrazine on expression of adherent molecule CD49d and cyclin D2 in hematopoietic cells in acute radiation injured mice. *J Tongji Med Univ*, 19(2):99–101, 1999.
- [61] Duxbury, M. S., Ito, H., Benoit, E., Waseem, T., Ashley, S. W., and Whang, E. E. RNA interference demonstrates a novel role for integrin-linked kinase as a determinant of pancreatic adenocarcinoma cell gemcitabine chemoresistance. *Clin Cancer Res*, 11(9):3433–3438, May 2005.
- [62] Edwards, L. A., Thiessen, B., Dragowska, W. H., Daynard, T., Bally, M. B., and Dedhar, S. Inhibition of ILK in PTEN-mutant human glioblastomas inhibits PKB/Akt activation, induces apoptosis, and delays tumor growth. *Oncogene*, 24(22):3596–3605, May 2005.
- [63] Egeblad, M., Mortensen, O. H., van Kempen, L. C., and Jaattela, M. BIBX1382BS, but not AG1478 or PD153035, inhibits the ErbB kinases at different concentrations in intact cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 281(1):25–31, Feb 2001.
- [64] Eicheler, W., Zips, D., Dörfler, A., Grénman, R., and Baumann, M. Splicing mutations in TP53 in human squamous cell carcinoma lines influence immunohistochemical detection. *J. Histochem. Cytochem.*, 50:197–204, Feb 2002.
- [65] Ekstrand, A., Sugawa, N., James, C., and Collins, V. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:4309–4313, May 1992.

- [66] Ellerbroek, S. M., Fishman, D. A., Kearns, A. S., Bafetti, L. M., and Stack, M. S. Ovarian carcinoma regulation of matrix metalloproteinase-2 and membrane type 1 matrix metalloproteinase through beta1 integrin. *Cancer Res*, 59(7):1635–1641, Apr 1999.
- [67] Fabian, M., Biggs, W., Treiber, D., Atteridge, C., Azimioara, M., Benedetti, M., Carter, T., Ciceri, P., Edeen, P., Floyd, M., Ford, J., Galvin, M., Gerlach, J., Grotzfeld, R., Herrgard, S., Insko, D., Insko, M., Lai, A., Lélías, J., Mehta, S., Milanov, Z., Velasco, A., Wodicka, L., Patel, H., Zarrinkar, P., and Lockhart, D. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.*, 23:329–336, Mar 2005.
- [68] Fan, Z., Lu, Y., Wu, X., and Mendelsohn, J. Antibody-induced epidermal growth factor receptor dimerization mediates inhibition of autocrine proliferation of A431 squamous carcinoma cells. *J Biol Chem*, 269(44):27595–27602, Nov 1994.
- [69] Fehrmann, A. and Dörr, W. Effect of EGFR-inhibition on the radiation response of oral mucosa: experimental studies in mouse tongue epithelium. *Int. J. Radiat. Biol.*, 81:437–443, Jun 2005.
- [70] Felsenfeld, D. P., Schwartzberg, P. L., Venegas, A., Tse, R., and Sheetz, M. P. Selective regulation of integrin–cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src. *Nat Cell Biol*, 1(4):200–206, Aug 1999.
- [71] French, A. R., Tadaki, D. K., Niyogi, S. K., and Lauffenburger, D. A. Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. *J Biol Chem*, 270(9):4334–4340, Mar 1995.
- [72] Fridman, R., Giaccone, G., Kanemoto, T., Martin, G. R., Gazdar, A. F., and Mulshine, J. L. Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(17):6698–6702, Sep 1990.
- [73] Fritsch, P. *Dermatologie Venerologie*. Springer-Verlag, zweite edition, 2003.
- [74] Fu, M., Wang, C., Rao, M., Wu, X., Bouras, T., Zhang, X., Li, Z., Jiao, X., Yang, J., Li, A., Perkins, N. D., Thimmapaya, B., Kung, A. L., Munoz, A., Giordano, A., Lisanti, M. P., and Pestell, R. G. Cyclin D1 represses p300 transactivation through a cyclin-dependent kinase-independent mechanism. *J Biol Chem*, 280(33):29728–29742, Aug 2005.

- [75] Fukuoka, M., Yano, S., Giaccone, G., Tamura, T., Nakagawa, K., Douillard, J., Nishiwaki, Y., Vansteenkiste, J., Kudoh, S., Rischin, D., Eek, R., Horai, T., Noda, K., Takata, I., Smit, E., Averbuch, S., Macleod, A., Feyereislova, A., Dong, R., and Baselga, J. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J. Clin. Oncol.*, 21:2237–2246, Jun 2003.
- [76] George, E. L., Georges-Labouesse, E. N., Patel-King, R. S., Rayburn, H., and Hynes, R. O. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*, 119(4):1079–1091, Dec 1993.
- [77] Glenney, J. R. J., Chen, W. S., Lazar, C. S., Walton, G. M., Zokas, L. M., Rosenfeld, M. G., and Gill, G. N. Ligand-induced endocytosis of the EGF receptor is blocked by mutational inactivation and by microinjection of anti-phosphotyrosine antibodies. *Cell*, 52(5):675–684, Mar 1988.
- [78] Goldkorn, T., Balaban, N., Shannon, M., and Matsukuma, K. EGF receptor phosphorylation is affected by ionizing radiation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1358:289–299, Oct 1997.
- [79] Graff, J. R., Deddens, J. A., Konicek, B. W., Colligan, B. M., Hurst, B. M., Carter, H. W., and Carter, J. H. Integrin-linked kinase expression increases with prostate tumor grade. *Clin Cancer Res*, 7(7):1987–1991, Jul 2001.
- [80] Grashoff, C., Aszodi, A., Sakai, T., Hunziker, E. B., and Fässler, R. Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Rep*, 4(4):432–438, Apr 2003.
- [81] Grashoff, C., Thievessen, I., Lorenz, K., Ussar, S., and Fässler, R. Integrin-linked kinase: integrin's mysterious partner. *Curr Opin Cell Biol*, 16(5):565–571, Oct 2004.
- [82] Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M., and Hynes, N. E. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*, 16(7):1647–1655, Apr 1997.
- [83] Grisar-Granovsky, S., Salah, Z., Maoz, M., Pruss, D., Beller, U., and Bar-Shavit, R. Differential expression of protease activated receptor 1 (Par1) and pY397FAK in benign and malignant human ovarian tissue samples. *Int J Cancer*, 113(3):372–378, Jan 2005.

- [84] Guilford, P., Hopkins, J., Harraway, J., McLeod, M., McLeod, N., Harawira, P., Taite, H., Scoular, R., Miller, A., and Reeve, A. E. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*, 392(6674):402–405, Mar 1998.
- [85] Gutenberg, A., Bruck, W., Buchfelder, M., and Ludwig, H. C. Expression of tyrosine kinases FAK and Pyk2 in 331 human astrocytomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, 108(3):224–230, Sep 2004.
- [86] Hallahan, D., Geng, L., Qu, S., Scarfone, C., Giorgio, T., Donnelly, E., Gao, X., and Clanton, J. Integrin-mediated targeting of drug delivery to irradiated tumor blood vessels. *Cancer Cell*, 3(1):63–74, Jan 2003.
- [87] Hanks, S. K., Ryzhova, L., Shin, N.-Y., and Brabek, J. Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front Biosci*, 8:982–996, May 2003.
- [88] Hannigan, G., Troussard, A. A., and Dedhar, S. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer*, 5(1):51–63, Jan 2005.
- [89] Hannigan, G. E., Bayani, J., Weksberg, R., Beatty, B., Pandita, A., Dedhar, S., and Squire, J. Mapping of the gene encoding the integrin-linked kinase, ILK, to human chromosome 11p15.5-p15.4. *Genomics*, 42(1):177–179, May 1997.
- [90] Hannigan, G. E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M. G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J. C., and Dedhar, S. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature*, 379(6560):91–96, Jan 1996.
- [91] Haugh, J. M. Localization of receptor-mediated signal transduction pathways: the inside story. *Mol Interv*, 2(5):292–307, Sep 2002.
- [92] Hayashi, I., Vuori, K., and Liddington, R. C. The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. *Nat Struct Biol*, 9(2):101–106, Feb 2002.
- [93] Hazlehurst, L. A., Argilagos, R. F., Emmons, M., Boulware, D., Beam, C. A., Sullivan, D. M., and Dalton, W. S. Cell adhesion to fibronectin (CAM-DR) influences acquired mitoxantrone resistance in U937 cells. *Cancer Res*, 66(4):2338–2345, Feb 2006.
- [94] Hazlehurst, L. A., Damiano, J. S., Buyuksal, I., Pledger, W. J., and Dalton, W. S. Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes

- to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene*, 19(38):4319–4327, Sep 2000.
- [95] Hazlehurst, L. A., Valkov, N., Wisner, L., Storey, J. A., Boulware, D., Sullivan, D. M., and Dalton, W. S. Reduction in drug-induced DNA double-strand breaks associated with beta1 integrin-mediated adhesion correlates with drug resistance in U937 cells. *Blood*, 98(6):1897–1903, Sep 2001.
- [96] Hehlhans, S., Haase, M., and Cordes, N. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim. Biophys. Acta*, 1775:163–180, Jan 2007.
- [97] Heldin, C. H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, 80(2):213–223, Jan 1995.
- [98] Herbst, R. S., Fukuoka, M., and Baselga, J. Gefitinib—a novel targeted approach to treating cancer. *Nat Rev Cancer*, 4(12):956–965, Dec 2004.
- [99] Hess, F., Estrugo, D., Fischer, A., Belka, C., and Cordes, N. Integrin-linked kinase interacts with caspase-9 and -8 in an adhesion-dependent manner for promoting radiation-induced apoptosis in human leukemia cells. *Oncogene*, Aug 2006.
- [100] Hoellerer, M. K., Noble, M. E. M., Labesse, G., Campbell, I. D., Werner, J. M., and Arold, S. T. Molecular recognition of paxillin LD motifs by the focal adhesion targeting domain. *Structure*, 11(10):1207–1217, Oct 2003.
- [101] Hood, J. D. and Cheresch, D. A. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*, 2(2):91–100, Feb 2002.
- [102] Howe, A. K. Cell adhesion regulates the interaction between Nck and p21-activated kinase. *J Biol Chem*, 276(18):14541–14544, May 2001.
- [103] Hsia, D. A., Mitra, S. K., Hauck, C. R., Streblov, D. N., Nelson, J. A., Ilic, D., Huang, S., Li, E., Nemerow, G. R., Leng, J., Spencer, K. S. R., Cheresch, D. A., and Schlaepfer, D. D. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol*, 160(5):753–767, Mar 2003.
- [104] Huang, L., Clarkin, K., and Wahl, G. Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93:4827–4832, May 1996.

- [105] Huang, S., Li, J., Armstrong, E., and Harari, P. Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 (Iressa). *Cancer Res.*, 62:4300–4306, Aug 2002.
- [106] Hunter, T., Ling, N., and Cooper, J. A. Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. *Nature*, 311(5985):480–483, Oct 1984.
- [107] Hynes, N. and Lane, H. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*, 5:341–354, May 2005.
- [108] Hynes, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69(1):11–25, Apr 1992.
- [109] Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6):673–687, Sep 2002.
- [110] Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., and Yamamoto, T. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*, 377(6549):539–544, Oct 1995.
- [111] Ito, R., Oue, N., Zhu, X., Yoshida, K., Nakayama, H., Yokozaki, H., and Yasui, W. Expression of integrin-linked kinase is closely correlated with invasion and metastasis of gastric carcinoma. *Virchows Arch*, 442(2):118–123, Feb 2003.
- [112] Itoh, S., Maeda, T., Shimada, M., Aishima, S.-i., Shirabe, K., Tanaka, S., and Maehara, Y. Role of expression of focal adhesion kinase in progression of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10(8):2812–2817, Apr 2004.
- [113] Jannot, C. B., Beerli, R. R., Mason, S., Gullick, W. J., and Hynes, N. E. Intracellular expression of a single-chain antibody directed to the EGFR leads to growth inhibition of tumor cells. *Oncogene*, 13(2):275–282, Jul 1996.
- [114] Ji, H., Zhao, X., Yuza, Y., Shimamura, T., Li, D., Protopopov, A., Jung, B., McNamara, K., Xia, H., Glatt, K., Thomas, R., Sasaki, H., Horner, J., Eck, M., Mitchell, A., Sun, Y., Al-Hashem, R., Bronson, R., Rabindran, S., Discafani, C., Maher, E., Shapiro, G., Meyerson, M., and Wong, K. Epidermal growth factor receptor variant III mutations in lung tumorigenesis and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:7817–7822, May 2006.

- [115] Kasahara, T., Koguchi, E., Funakoshi, M., Aizu-Yokota, E., and Sonoda, Y. Antia-poptotic action of focal adhesion kinase (FAK) against ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal*, 4(3):491–499, Jun 2002.
- [116] Katz, B.-Z., Romer, L., Miyamoto, S., Volberg, T., Matsumoto, K., Cukierman, E., Geiger, B., and Yamada, K. M. Targeting membrane-localized focal adhesion kinase to focal adhesions: roles of tyrosine phosphorylation and SRC family kinases. *J Biol Chem*, 278(31):29115–29120, Aug 2003.
- [117] Kavanagh, B., Lin, P., Chen, P., and Schmidt-Ullrich, R. Radiation-induced enhanced proliferation of human squamous cancer cells in vitro: a release from inhibition by epidermal growth factor. *Clin. Cancer Res.*, 1:1557–1562, Dec 1995.
- [118] Kim, S. J., Park, J. W., Yoon, J. S., Mok, J. O., Kim, Y. J., Park, H. K., Kim, C. H., Byun, D. W., Lee, Y. J., Jin, S. Y., Suh, K. I., and Yoo, M. H. Increased expression of focal adhesion kinase in thyroid cancer: immunohistochemical study. *J Korean Med Sci*, 19(5):710–715, Oct 2004.
- [119] Kokai, Y., Myers, J. N., Wada, T., Brown, V. I., LeVeae, C. M., Davis, J. G., Dobashi, K., and Greene, M. I. Synergistic interaction of p185c-neu and the EGF receptor leads to transformation of rodent fibroblasts. *Cell*, 58(2):287–292, Jul 1989.
- [120] Kraus, A. C., Ferber, I., Bachmann, S.-O., Specht, H., Wimmel, A., Gross, M. W., Schlegel, J., Suske, G., and Schuermann, M. In vitro chemo- and radio-resistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways. *Oncogene*, 21(57):8683–8695, Dec 2002.
- [121] Krause, M., Hessel, F., Zips, D., Hilberg, F., and Baumann, M. Adjuvant inhibition of the epidermal growth factor receptor after fractionated irradiation of FaDu human squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol*, 72(1):95–101, Jul 2004.
- [122] Kris, M., Natale, R., Herbst, R., Lynch, T., Prager, D., Belani, C., Schiller, J., Kelly, K., Spiridonidis, H., Sandler, A., Albain, K., Cella, D., Wolf, M., Averbuch, S., Ochs, J., and Kay, A. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA*, 290:2149–2158, Oct 2003.
- [123] Kumar, A. S., Naruszewicz, I., Wang, P., Leung-Hagesteijn, C., and Hannigan, G. E. ILKAP regulates ILK signaling and inhibits anchorage-independent growth. *Oncogene*, 23(19):3454–3461, Apr 2004.

- [124] Lammering, G., Hewit, T., Valerie, K., Contessa, J., Amorino, G., Dent, P., and Schmidt-Ullrich, R. EGFRvIII-mediated radioresistance through a strong cytoprotective response. *Oncogene*, 22:5545–5553, Aug 2003.
- [125] Landowski, T. H., Olashaw, N. E., Agrawal, D., and Dalton, W. S. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF-kappa B (RelB/p50) in myeloma cells. *Oncogene*, 22(16):2417–2421, Apr 2003.
- [126] Lane, D. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358:15–16, Jul 1992.
- [127] Lawlor, M. A. and Alessi, D. R. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci*, 114(Pt 16):2903–2910, Aug 2001.
- [128] Legate, K. R., Montanez, E., Kudlacek, O., and Fässler, R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(1):20–31, Jan 2006.
- [129] Leslie, K., Lang, C., Devgan, G., Azare, J., Berishaj, M., Gerald, W., Kim, Y., Paz, K., Darnell, J., Albanese, C., Sakamaki, T., Pestell, R., and Bromberg, J. Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res.*, 66:2544–2552, Mar 2006.
- [130] Leung-Hagesteijn, C., Mahendra, A., Naruszewicz, I., and Hannigan, G. E. Modulation of integrin signal transduction by ILKAP, a protein phosphatase 2C associating with the integrin-linked kinase, ILK1. *EMBO J*, 20(9):2160–2170, May 2001.
- [131] Liang, K., Ang, K., Milas, L., Hunter, N., and Fan, Z. The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 57:246–254, Sep 2003.
- [132] Lim, Y., Han, I., Jeon, J., Park, H., Bahk, Y.-Y., and Oh, E.-S. Phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861 is crucial for Ras transformation of fibroblasts. *J Biol Chem*, 279(28):29060–29065, Jul 2004.
- [133] Lin, S., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K., Bourguignon, L., and Hung, M. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat. Cell Biol.*, 3:802–808, Sep 2001.
- [134] Liu, G., Guibao, C. D., and Zheng, J. Structural insight into the mechanisms of targeting and signaling of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol*, 22(8):2751–2760, Apr 2002.

- [135] Liu, S., Calderwood, D. A., and Ginsberg, M. H. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci*, 113 (Pt 20):3563–3571, Oct 2000.
- [136] Liu, Y., Poon, R., Shao, W., Sun, X., Chen, H., Kok, T., and Fan, S. Blockage of epidermal growth factor receptor by quinazoline tyrosine kinase inhibitors suppresses growth of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.*, 248:32–40, Apr 2007.
- [137] Liu, Z.-X., Yu, C. F., Nickel, C., Thomas, S., and Cantley, L. G. Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *J Biol Chem*, 277(12):10452–10458, Mar 2002.
- [138] Lu, Z., Jiang, G., Blume-Jensen, P., and Hunter, T. Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol*, 21(12):4016–4031, Jun 2001.
- [139] Lux, S. E., John, K. M., and Bennett, V. Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. *Nature*, 344(6261):36–42, Mar 1990.
- [140] Lynch, D. K., Ellis, C. A., Edwards, P. A., and Hiles, I. D. Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism. *Oncogene*, 18(56):8024–8032, Dec 1999.
- [141] Mackinnon, A., Qadota, H., Norman, K., Moerman, D., and Williams, B. C. *C. elegans* PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr. Biol.*, 12:787–797, May 2002.
- [142] Marotta, A., Tan, C., Gray, V., Malik, S., Gallinger, S., Sanghera, J., Dupuis, B., Owen, D., Dedhar, S., and Salh, B. Dysregulation of integrin-linked kinase (ILK) signaling in colonic polyposis. *Oncogene*, 20(43):6250–6257, Sep 2001.
- [143] Massague, J. and Pandiella, A. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem*, 62:515–541, 1993.
- [144] Massagué, J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432:298–306, Nov 2004.
- [145] Masui, T., Wakefield, L. M., Lechner, J. F., LaVeck, M. A., Sporn, M. B., and Harris, C. C. Type beta transforming growth factor is the primary differentiation-inducing serum factor for normal human bronchial epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(8):2438–2442, Apr 1986.

- [146] Maubant, S., Cruet-Hennequart, S., Poulain, L., Carreiras, F., Sichel, F., Luis, J., Staedel, C., and Gauduchon, P. Altered adhesion properties and alphav integrin expression in a cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell line. *Int J Cancer*, 97(2):186–194, Jan 2002.
- [147] Meineke, V., Muller, K., Ridi, R., Cordes, N., Kohn, F.-M., Mayerhofer, A., Ring, J., and van Beuningen, D. Development and evaluation of a skin organ model for the analysis of radiation effects. *Strahlenther Onkol*, 180(2):102–108, Feb 2004.
- [148] Menendez, J. A., Vellon, L., Mehmi, I., Teng, P. K., Griggs, D. W., and Lupu, R. A novel CYR61-triggered 'CYR61-alphavbeta3 integrin loop' regulates breast cancer cell survival and chemosensitivity through activation of ERK1/ERK2 MAPK signaling pathway. *Oncogene*, 24(5):761–779, Jan 2005.
- [149] Millan, J., Hewlett, L., Glyn, M., Toomre, D., Clark, P., and Ridley, A. J. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol*, 8(2):113–123, Feb 2006.
- [150] Mitra, S. K., Hanson, D. A., and Schlaepfer, D. D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1):56–68, Jan 2005.
- [151] Moro, L., Dolce, L., Cabodi, S., Bergatto, E., Boeri Erba, E., Smeriglio, M., Turco, E., Retta, S., Giuffrida, M., Venturino, M., Godovac-Zimmermann, J., Conti, A., Schaefer, E., Beguinot, L., Tacchetti, C., Gaggini, P., Silengo, L., Tarone, G., and Defilippi, P. Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J. Biol. Chem.*, 277:9405–9414, Mar 2002.
- [152] Mosavi, L. K., Minor, D. L. J., and Peng, Z.-Y. Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(25):16029–16034, Dec 2002.
- [153] Moscatello, D., Holgado-Madruga, M., Godwin, A., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P., Biegel, J., Hayes, R., and Wong, A. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.*, 55:5536–5539, Dec 1995.
- [154] Mulrooney, J., Foley, K., Vineberg, S., Barreuther, M., and Gabel, L. Phosphorylation of the beta1 integrin cytoplasmic domain: toward an understanding of function and mechanism. *Exp Cell Res*, 258(2):332–341, Aug 2000.

- [155] Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., and Rini, J. M. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature*, 380(6572):360–364, Mar 1996.
- [156] Nikolopoulos, S. N. and Turner, C. E. Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *J Biol Chem*, 276(26):23499–23505, Jun 2001.
- [157] Nishimura, M., Machida, K., Imaizumi, M., Abe, T., Umeda, T., Takeshima, E., Watanabe, T., Ohnishi, Y., Takagi, K., and Hamaguchi, M. Tyrosine phosphorylation of 100-130 kDa proteins in lung cancer correlates with poor prognosis. *Br J Cancer*, 74(5):780–787, Sep 1996.
- [158] Noble, M. E. M., Endicott, J. A., and Johnson, L. N. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science*, 303(5665):1800–1805, Mar 2004.
- [159] Novak, A., Hsu, S. C., Leung-Hagesteijn, C., Radeva, G., Papkoff, J., Montesano, R., Roskelley, C., Grosschedl, R., and Dedhar, S. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(8):4374–4379, Apr 1998.
- [160] Nyati, M., Maheshwari, D., Hanasoge, S., Sreekumar, A., Rynkiewicz, S., Chinnaiyan, A., Leopold, W., Ethier, S., and Lawrence, T. Radiosensitization by pan ErbB inhibitor CI-1033 in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.*, 10:691–700, Jan 2004.
- [161] Obara, S., Nakata, M., Takeshima, H., Katagiri, H., Asano, T., Oka, Y., Maruyama, I., and Kuratsu, J.-I. Integrin-linked kinase (ILK) regulation of the cell viability in PTEN mutant glioblastoma and in vitro inhibition by the specific COX-2 inhibitor NS-398. *Cancer Lett*, 208(1):115–122, May 2004.
- [162] Ogino, S., Meyerhardt, J., Cantor, M., Brahmandam, M., Clark, J., Namgyal, C., Kawasaki, T., Kinsella, K., Michelini, A., Enzinger, P., Kulke, M., Ryan, D., Loda, M., and Fuchs, C. Molecular alterations in tumors and response to combination chemotherapy with gefitinib for advanced colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 11:6650–6656, Sep 2005.
- [163] Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P., Burkhard, C., Schüler, D., Probst-Hensch, N., Maiorka, P., Baeza, N., Pisani, P., Yonekawa, Y., Yasargil, M., Lütolf, U., and Kleihues, P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.*, 64:6892–6899, Oct 2004.

- [164] Okabayashi, Y., Kido, Y., Okutani, T., Sugimoto, Y., Sakaguchi, K., and Kasuga, M. Tyrosines 1148 and 1173 of activated human epidermal growth factor receptors are binding sites of Shc in intact cells. *J Biol Chem*, 269(28):18674–18678, Jul 1994.
- [165] Okutani, T., Okabayashi, Y., Kido, Y., Sugimoto, Y., Sakaguchi, K., Matuoka, K., Takenawa, T., and Kasuga, M. Grb2/Ash binds directly to tyrosines 1068 and 1086 and indirectly to tyrosine 1148 of activated human epidermal growth factor receptors in intact cells. *J Biol Chem*, 269(49):31310–31314, Dec 1994.
- [166] Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., and Hynes, N. E. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*, 19(13):3159–3167, Jul 2000.
- [167] Oloumi, A., McPhee, T., and Dedhar, S. Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1691:1–15, Apr 2004.
- [168] Opresko, L. K., Chang, C. P., Will, B. H., Burke, P. M., Gill, G. N., and Wiley, H. S. Endocytosis and lysosomal targeting of epidermal growth factor receptors are mediated by distinct sequences independent of the tyrosine kinase domain. *J Biol Chem*, 270(9):4325–4333, Mar 1995.
- [169] Owen, J. D., Ruest, P. J., Fry, D. W., and Hanks, S. K. Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol*, 19(7):4806–4818, Jul 1999.
- [170] Park, O., Schaefer, T., and Nathans, D. In vitro activation of Stat3 by epidermal growth factor receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93:13704–13708, Nov 1996.
- [171] Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Mawji, N., Deng, J. T., Leung, D., Yan, J., Sanghera, J., Walsh, M. P., and Dedhar, S. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J Biol Chem*, 276(29):27462–27469, Jul 2001.
- [172] Petty, W., Dragnev, K., Memoli, V., Ma, Y., Desai, N., Biddle, A., Davis, T., Nugent, W., Memoli, N., Hamilton, M., Iwata, K., Rigas, J., and Dmitrovsky, E. Epidermal growth

- factor receptor tyrosine kinase inhibition represses cyclin D1 in aerodigestive tract cancers. *Clin. Cancer Res.*, 10:7547–7554, Nov 2004.
- [173] Pfaff, M., Liu, S., Erle, D. J., and Ginsberg, M. H. Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J Biol Chem*, 273(11):6104–6109, Mar 1998.
- [174] Prewett, M., Rockwell, P., Rockwell, R. F., Giorgio, N. A., Mendelsohn, J., Scher, H. I., and Goldstein, N. I. The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*, 19(6):419–427, Nov 1996.
- [175] Prutzman, K. C., Gao, G., King, M. L., Iyer, V. V., Mueller, G. A., Schaller, M. D., and Campbell, S. L. The focal adhesion targeting domain of focal adhesion kinase contains a hinge region that modulates tyrosine 926 phosphorylation. *Structure*, 12(5):881–891, May 2004.
- [176] Puck, T. T. and Marcus, P. I. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med*, 103(5):653–666, May 1956.
- [177] Qian, Y., Zhong, X., Flynn, D. C., Zheng, J. Z., Qiao, M., Wu, C., Dedhar, S., Shi, X., and Jiang, B.-H. ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling. *Oncogene*, 24(19):3154–3165, Apr 2005.
- [178] Rauch, F. and Glorieux, F. H. Osteogenesis imperfecta. *Lancet*, 363(9418):1377–1385, Apr 2004.
- [179] Richter, M. and Zhang, H. Receptor-targeted cancer therapy. *DNA Cell Biol.*, 24:271–282, May 2005.
- [180] Riley, P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*, 65(1):27–33, Jan 1994.
- [181] Roche, S., Koegl, M., and Courtneidge, S. A. The phosphatidylinositol 3-kinase alpha is required for DNA synthesis induced by some, but not all, growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(19):9185–9189, Sep 1994.
- [182] Rodriguez-Viciana, P., Warne, P. H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D., and Downward, J. Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J*, 15(10):2442–2451, May 1996.

- [183] Rogers, S., Harrington, K., Rhys-Evans, P., O-Charoenrat, P., and Eccles, S. Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 24:47–69, Jan 2005.
- [184] Roninson, I. B., Broude, E. V., and Chang, B. D. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat*, 4(5):303–313, Oct 2001.
- [185] Rosenberger, G., Jantke, I., Gal, A., and Kutsche, K. Interaction of alphaPIX (ARHGEF6) with beta-parvin (PARVB) suggests an involvement of alphaPIX in integrin-mediated signaling. *Hum Mol Genet*, 12(2):155–167, Jan 2003.
- [186] Roskoski, R. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 319:1–11, Jun 2004.
- [187] Rotin, D., Margolis, B., Mohammadi, M., Daly, R. J., Daum, G., Li, N., Fischer, E. H., Burgess, W. H., Ullrich, A., and Schlessinger, J. SH2 domains prevent tyrosine dephosphorylation of the EGF receptor: identification of Tyr992 as the high-affinity binding site for SH2 domains of phospholipase C gamma. *EMBO J*, 11(2):559–567, Feb 1992.
- [188] Rundhaug, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 9(2):267–285, Apr 2005.
- [189] Sakai, T., Li, S., Docheva, D., Grashoff, C., Sakai, K., Kostka, G., Braun, A., Pfeifer, A., Yurchenco, P. D., and Fässler, R. Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes Dev*, 17(7):926–940, Apr 2003.
- [190] Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, 19(3):183–232, Jul 1995.
- [191] Sapan, C. V., Lundblad, R. L., and Price, N. C. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol Appl Biochem*, 29 (Pt 2):99–108, Apr 1999.
- [192] Sato, K., Sato, A., Aoto, M., and Fukami, Y. c-Src phosphorylates epidermal growth factor receptor on tyrosine 845. *Biochem Biophys Res Commun*, 215(3):1078–1087, Oct 1995.

- [193] Schmidt-Ullrich, R., Mikkelsen, R., Dent, P., Todd, D., Valerie, K., Kavanagh, B., Contessa, J., Rorrer, W., and Chen, P. Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene*, 15:1191–1197, Sep 1997.
- [194] Sedgwick, S. G. and Smerdon, S. J. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci*, 24(8):311–316, Aug 1999.
- [195] Seidler, J., Durzok, R., Brakebusch, C., and Cordes, N. Interactions of the integrin subunit beta1A with protein kinase B/Akt, p130Cas and paxillin contribute to regulation of radiation survival. *Radiother Oncol*, 76(2):129–134, Aug 2005.
- [196] Sethi, T., Rintoul, R. C., Moore, S. M., MacKinnon, A. C., Salter, D., Choo, C., Chilvers, E. R., Dransfield, I., Donnelly, S. C., Strieter, R., and Haslett, C. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med*, 5(6):662–668, Jun 1999.
- [197] Sieg, D. J., Hauck, C. R., Ilic, D., Klingbeil, C. K., Schaefer, E., Damsky, C. H., and Schlaepfer, D. D. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol*, 2(5):249–256, May 2000.
- [198] Simon, E. L., Goel, H. L., Teider, N., Wang, T., Languino, L. R., and Fitzgerald, T. J. High dose fractionated ionizing radiation inhibits prostate cancer cell adhesion and beta(1) integrin expression. *Prostate*, 64(1):83–91, Jun 2005.
- [199] Solca, F. F., Baum, A., Langkopf, E., Dahmann, G., Heider, K.-H., Himmelsbach, F., and van Meel, J. C. A. Inhibition of epidermal growth factor receptor activity by two pyrimidopyrimidine derivatives. *J Pharmacol Exp Ther*, 311(2):502–509, Nov 2004.
- [200] Solomon, B., Hagekyriakou, J., Trivett, M., Stacker, S., McArthur, G., and Cullinane, C. EGFR blockade with ZD1839 (Iressa) potentiates the antitumor effects of single and multiple fractions of ionizing radiation in human A431 squamous cell carcinoma. Epidermal growth factor receptor. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 55:713–723, Mar 2003.
- [201] Soltoff, S. P., Carraway, K. L. r., Prigent, S. A., Gullick, W. G., and Cantley, L. C. ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*, 14(6):3550–3558, Jun 1994.

- [202] Stanton, P., Richards, S., Reeves, J., Nikolic, M., Edington, K., Clark, L., Robertson, G., Souter, D., Mitchell, R., and Hendler, F. Epidermal growth factor receptor expression by human squamous cell carcinomas of the head and neck, cell lines and xenografts. *Br. J. Cancer*, 70:427–433, Sep 1994.
- [203] Stover, D. R., Becker, M., Liebetanz, J., and Lydon, N. B. Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha. *J Biol Chem*, 270(26):15591–15597, Jun 1995.
- [204] Stupack, D. G., Puente, X. S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C. M., and Cheresch, D. A. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol*, 155(3):459–470, Oct 2001.
- [205] Sunpaweravong, P., Sunpaweravong, S., Puttawibul, P., Mitarnun, W., Zeng, C., Barón, A., Franklin, W., Said, S., and Varella-Garcia, M. Epidermal growth factor receptor and cyclin D1 are independently amplified and overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 131:111–119, Feb 2005.
- [206] Sutter, A., Höpfner, M., Huether, A., Maaser, K., and Scherübl, H. Targeting the epidermal growth factor receptor by erlotinib (Tarceva) for the treatment of esophageal cancer. *Int. J. Cancer*, 118:1814–1822, Apr 2006.
- [207] Tachibana, K., Sato, T., D’Avirro, N., and Morimoto, C. Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. *J Exp Med*, 182(4):1089–1099, Oct 1995.
- [208] Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T., and Springer, T. A. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, 110(5):599–511, Sep 2002.
- [209] Takanami, I. Increased expression of integrin-linked kinase is associated with shorter survival in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 5:1, Jan 2005.
- [210] Tamagiku, Y., Sonoda, Y., Kunisawa, M., Ichikawa, D., Murakami, Y., Aizu-Yokota, E., and Kasahara, T. Down-regulation of procaspase-8 expression by focal adhesion kinase protects HL-60 cells from TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 323(2):445–452, Oct 2004.
- [211] Tan, C., Costello, P., Sanghera, J., Dominguez, D., Baulida, J., de Herreros, A. G., and Dedhar, S. Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-

- Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC^{-/-} human colon carcinoma cells. *Oncogene*, 20(1):133–140, Jan 2001.
- [212] Teicher, B., Herman, T., Holden, S., Wang, Y., Pfeffer, M., Crawford, J., and Frei, E. Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo. *Science*, 247:1457–1461, Mar 1990.
- [213] Tetsu, O. and McCormick, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 398(6726):422–426, Apr 1999.
- [214] Throckmorton, D. C., Brogden, A. P., Min, B., Rasmussen, H., and Kashgarian, M. PDGF and TGF-beta mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products. *Kidney Int*, 48(1):111–117, Jul 1995.
- [215] Toker, A. and Cantley, L. C. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*, 387(6634):673–676, Jun 1997.
- [216] Torrance, C. J., Jackson, P. E., Montgomery, E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Wissner, A., Nunes, M., Frost, P., and Discafani, C. M. Combinatorial chemoprevention of intestinal neoplasia. *Nat Med*, 6(9):1024–1028, Sep 2000.
- [217] Toulany, M., Dittmann, K., Baumann, M., and Rodemann, H. P. Radiosensitization of Ras-mutated human tumor cells in vitro by the specific EGF receptor antagonist BIBX1382BS. *Radiother Oncol*, 74(2):117–129, Feb 2005.
- [218] Tu, Y., Kucik, D. F., and Wu, C. Identification and kinetic analysis of the interaction between Nck-2 and DOCK180. *FEBS Lett*, 491(3):193–199, Mar 2001.
- [219] Tzahar, E., Moyer, J. D., Waterman, H., Barbacci, E. G., Bao, J., Levkowitz, G., Shelly, M., Strano, S., Pinkas-Kramarski, R., Pierce, J. H., Andrews, G. C., and Yarden, Y. Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signaling network. *EMBO J*, 17(20):5948–5963, Oct 1998.
- [220] Tzahar, E., Pinkas-Kramarski, R., Moyer, J. D., Klapper, L. N., Alroy, I., Levkowitz, G., Shelly, M., Henis, S., Eisenstein, M., Ratzkin, B. J., Sela, M., Andrews, G. C., and Yarden, Y. Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J*, 16(16):4938–4950, Aug 1997.
- [221] Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunagaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B. J., and Yarden, Y. A hierarchical network of interreceptor interactions determines

- signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*, 16(10):5276–5287, Oct 1996.
- [222] Uhm, J. H., Dooley, N. P., Kyritsis, A. P., Rao, J. S., and Gladson, C. L. Vitronectin, a glioma-derived extracellular matrix protein, protects tumor cells from apoptotic death. *Clin Cancer Res*, 5(6):1587–1594, Jun 1999.
- [223] Vadlamudi, R. K., Li, F., Adam, L., Nguyen, D., Ohta, Y., Stossel, T. P., and Kumar, R. Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol*, 4(9):681–690, Sep 2002.
- [224] Velyvis, A., Yang, Y., Wu, C., and Qin, J. Solution structure of the focal adhesion adaptor PINCH LIM1 domain and characterization of its interaction with the integrin-linked kinase ankyrin repeat domain. *J Biol Chem*, 276(7):4932–4939, Feb 2001.
- [225] von Andrian, U. H. and Mackay, C. R. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med*, 343(14):1020–1034, Oct 2000.
- [226] Vuori, K., Hirai, H., Aizawa, S., and Ruoslahti, E. Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*, 16(6):2606–2613, Jun 1996.
- [227] Wang, X.-Y., Liu, T., Zhu, C.-Z., Li, Y., Sun, R., Sun, C.-Y., and Wang, A.-X. [Expression of KAI1, MRP-1, and FAK proteins in lung cancer detected by high-density tissue microarray]. *Ai Zheng*, 24(9):1091–1095, Sep 2005.
- [228] Wang, Y., Ohkubo, T., Tsubouchi, H., and Ozawa, M. Enhanced cell-substratum adhesion of E-cadherin-expressing cells is mediated by activation of the small GTPase protein, Rac1. *Int. J. Mol. Med.*, 17:637–642, Apr 2006.
- [229] Waterman, H., Sabanai, I., Geiger, B., and Yarden, Y. Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J Biol Chem*, 273(22):13819–13827, May 1998.
- [230] Watermann, D. O., Gabriel, B., Jager, M., Orłowska-Volk, M., Hasenburg, A., zur Hausen, A., Gitsch, G., and Stickeler, E. Specific induction of pp125 focal adhesion kinase in human breast cancer. *Br J Cancer*, 93(6):694–698, Sep 2005.

- [231] Webb, D. J., Donais, K., Whitmore, L. A., Thomas, S. M., Turner, C. E., Parsons, J. T., and Horwitz, A. F. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol*, 6(2):154–161, Feb 2004.
- [232] Weisel, J. W., Nagaswami, C., Vilaire, G., and Bennett, J. S. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J Biol Chem*, 267(23):16637–16643, Aug 1992.
- [233] Weiss, A. and Schlessinger, J. Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell*, 94(3):277–280, Aug 1998.
- [234] Werb, Z., Vu, T. H., Rinkenberger, J. L., and Coussens, L. M. Matrix-degrading proteases and angiogenesis during development and tumor formation. *APMIS*, 107(1):11–18, Jan 1999.
- [235] Wu, C., Keightley, S., Leung-Hagesteijn, C., Radeva, G., Coppolino, M., Goicoechea, S., McDonald, J., and Dedhar, S. Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression, and tumorigenicity. *J. Biol. Chem.*, 273:528–536, Jan 1998.
- [236] Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L., and Arnaout, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science*, 294(5541):339–345, Oct 2001.
- [237] Yamaji, S., Suzuki, A., Kanamori, H., Mishima, W., Yoshimi, R., Takasaki, H., Takabayashi, M., Fujimaki, K., Fujisawa, S., Ohno, S., and Ishigatsubo, Y. Affixin interacts with alpha-actinin and mediates integrin signaling for reorganization of F-actin induced by initial cell-substrate interaction. *J Cell Biol*, 165(4):539–551, May 2004.
- [238] Yamaji, S., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Koide, Y., Yoshida, M., Kanamori, H., Mohri, H., Ohno, S., and Ishigatsubo, Y. A novel integrin-linked kinase-binding protein, affixin, is involved in the early stage of cell-substrate interaction. *J Cell Biol*, 153(6):1251–1264, Jun 2001.
- [239] Yang, Y., Guo, L., Blattner, S. M., Mundel, P., Kretzler, M., and Wu, C. Formation and phosphorylation of the PINCH-1-integrin linked kinase-alpha-parvin complex are important for regulation of renal glomerular podocyte adhesion, architecture, and survival. *J Am Soc Nephrol*, 16(7):1966–1976, Jul 2005.

- [240] Yao, R. and Cooper, G. M. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*, 267(5206):2003–2006, Mar 1995.
- [241] Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2):127–137, Feb 2001.
- [242] Yeatman, T. J. A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer*, 4(6):470–480, Jun 2004.
- [243] Younes, M. N., Kim, S., Yigitbasi, O. G., Mandal, M., Jasser, S. A., Dakak Yazici, Y., Schiff, B. A., El-Naggar, A., Bekele, B. N., Mills, G. B., and Myers, J. N. Integrin-linked kinase is a potential therapeutic target for anaplastic thyroid cancer. *Mol Cancer Ther*, 4(8):1146–1156, Aug 2005.
- [244] Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G. A., and Backer, J. M. Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol*, 18(3):1379–1387, Mar 1998.
- [245] Zent, R., Ailenberg, M., Downey, G. P., and Silverman, M. ROS stimulate reorganization of mesangial cell-collagen gels by tyrosine kinase signaling. *Am J Physiol*, 276(2 Pt 2):278–287, Feb 1999.
- [246] Zervas, C. G., Gregory, S. L., and Brown, N. H. Drosophila integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane. *J Cell Biol*, 152(5):1007–1018, Mar 2001.
- [247] Zhang, H., Ozaki, I., Mizuta, T., Matsubishi, S., Yoshimura, T., Hisatomi, A., Tadano, J., Sakai, T., and Yamamoto, K. Beta 1-integrin protects hepatoma cells from chemotherapy induced apoptosis via a mitogen-activated protein kinase dependent pathway. *Cancer*, 95(4):896–906, Aug 2002.
- [248] Zhang, Y., Chen, K., Tu, Y., and Wu, C. Distinct roles of two structurally closely related focal adhesion proteins, alpha-parvins and beta-parvins, in regulation of cell morphology and survival. *J Biol Chem*, 279(40):41695–41705, Oct 2004.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Priv. Doz. Dr. N. Cordes für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die hervorragende fachliche Betreuung meiner Arbeit. Durch seine konstruktive Kritik, seine Anregungen und Ideen sowie seine permanente Bereitschaft, die erzielten Ergebnisse zu diskutieren, wurde die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglicht.

Prof. Dr. M. Molls danke ich dafür, dass er sich dazu bereit erklärt hat, diese Arbeit vor der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zu vertreten.

Für die Möglichkeit, die Dissertation am Institut für Radiobiologie der Bundeswehr in München durchführen zu können, möchte ich mich bei Priv. Doz. Dr. V. Meineke bedanken.

Wesentliche Teile meiner Arbeiten wurden durch Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen ermöglicht. Hier danke ich insbesondere Prof. Dr. R. Fässler (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) und Prof. Dr. M. Baumann (Klinik für Strahlentherapie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden) für die Bereitstellung der verwendeten Zelllinien sowie die vielen wertvollen Anregungen.

Den technischen Assistenten und Assistentinnen sowie allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Radiobiologie der Bundeswehr möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Desweiteren gilt mein Dank der Firma Boehringer Ingelheim Austria GmbH für die Bereitstellung des verwendeten EGF-Rezeptor TK-Inhibitors BIBX1382BS.