Lehrstuhl II des Instituts für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München

Tumorbiologische Rolle des Integrins avß3 beim humanen Ovarialkarzinom:

- Differentielle Genexpression des *Epidermal Growth Factor Receptors* (EGF-R) und der *Integrin-Linked Kinase* (ILK) als Funktion des Integrins avß3

- Evaluierung der Bindung spezifischer Integrin-Antagonisten mittels Oberflächenplasmonenspektroskopie

Daniela Lössner

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

<u>Vorsitzender</u>	Univ Prof. Dr. St. J. Glaser
Prüfer der Dissertation	1. Univ Prof. Dr. H. Kessler
	2. Priv Doz. Dr. U. Reuning

Die Dissertation wurde am 21.09.2007 an der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 19.10.2007 angenommen.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2002 bis Januar 2007 in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der Technischen Universität München, Leiter Prof. Dr. Manfred Schmitt, am Klinikum rechts der Isar u.a. im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 456 "Zielstrukturen für selektive Tumorinterventionen", Teilprojekt B5, unter der Anleitung von PD Dr. Ute Reuning und mit Unterstützung von Prof. Dr. Horst Kessler, Lehrstuhl II des Instituts für Organische Chemie und Biochemie, angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Ute Reuning, die mich während der gesamten Arbeit mit stetem Interesse und anhaltender Begeisterungsfähigkeit betreut und begleitet hat. Das mir von ihr entgegengebrachte Vertrauen, nicht nur während meines Forschungsaufenthaltes in der Abteilung für Membranbiochemie im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, sondern auch hinsichtlich meiner wissenschaftlichen Entwicklung, trug maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Neben der konstruktiven fachlichen, aber auch menschlich angenehmen Zusammenarbeit gewährte sie mir einen für mich bis dahin unentdeckten, neuen Einblick in die bewegte Welt der Zellbiologie.

Ein großes Dankeschön auch Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt, zum einen für die Möglichkeit in der Klinischen Forschergruppe eine naturwissenschaftliche Doktorarbeit durchführen zu können, zum anderen für seine hilfreiche Kritik bei der Auswertung von wissenschaftlichen Daten.

Herrn Prof. Dr. Horst Kessler danke ich sehr für die Bereitstellung der synthetischen monound oligomeren Integrin-Liganden von seinen Mitarbeiterinnen Dr. Georgette Thumshirn und Dr. Claudia Dahmen sowie für die Bereitschaft, die Doktorarbeit an der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zu vertreten.

Ganz herzlich möchte ich Frau Dr. Eva-Kathrin Sinner für die spannende und erfolgreiche Kooperation mit der Abteilung für Membranbiochemie am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried danken. Sie hat mich während meines Forschungsaufenthaltes umstandslos in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen und mich in die Messkunst der Plasmonenspektroskopie eingeführt. Ebenso danke ich Frau Dr. Birgit Wiltschi, die für jede Frage stets ein offenes Ohr und eine passende chemische Erklärung bereit hatte.

Herrn PD Dr. Viktor Magdolen möchte ich neben den vielseitigen wissenschaftlichen Anregungen auch für die "souligen" Stunden außerhalb des Labors danken. Es war seine Unterstützung, die mich dazu ermutigte, mich für ein IHBI (Institute of Health & Biomedical Innovation)-Forschungsstipendium in Brisbane (Australien) zu bewerben.

Sehr herzlich danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen in der Klinischen Forschergruppe, die mir sowohl in den alten Laborräumen in der Frauenklinik, als auch in der neuen "Schneckenburg" eine sehr angenehme Forschungsatmosphäre vermittelt haben.

Für die Einführung in die sterile Zellkultur, die Erprobung verschiedener Western Blot-Techniken sowie die Einweisung in die sensible Durchführung transienter und stabiler Transfektionen möchte ich mich bei Claudia Abou-Ajram bedanken. Ihre Zuverlässigkeit, Geduld und kompetente Umsetzung unserer Ideen vermisse ich bereits sehr.

Anke Benge danke ich für die vielen anregenden Diskussionen, die Unterstützung, insbesondere in der Handhabung des FACS-Gerätes sowie die Weitergabe ihrer langjährigen und bewährten Laborerfahrungen.

Weiterhin möchte ich Christel Schnelldorfer danken, die meine Fragen zur Durchführung und Auswertung von ELISA-Messungen immer geduldig beantwortete. Stefanie Neubauer danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der alltäglichen Laborarbeit und ihre Freundschaft. Unsere gemeinsamen Mittagspausen stellten einen willkommenen Ausgleich zum Laboralltag dar.

Außerdem bedanke ich mich bei Julie Laabs, Karin Mengele und Dr. Nathalie Beaufort für ihre wissenschaftlichen Ratschläge und moralische Unterstützung.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, besonders meiner Mutter, die telefonisch in besonders schwierigen Zeiten immer an meiner Seite stand und meinem Vater, der immer für mich erreichbar war und an mich geglaubt hat.

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	1
INHALTSVERZEICHNIS	3
1. EINLEITUNG	6
1.1. Das humane Ovarialkarzinom	6
1.2. Die Superfamilie der Integrine	7
1.2.1. Die Funktionen der Integrine	8
1.2.2. Der Aufbau der Integrine und die Kristallstruktur des Integrins αvβ3	9
1.2.3. Die Rolle des Integrins αvß3 im humanen Ovarialkarzinom	11
1.3. Peptidische und nicht-peptidische RGD-basierte Integrin-Antagonisten	13
1.3.1. Die Messung der Selektivität der Ligand-Rezeptor-Interaktionen	14
1.4. Signaltransduktionsmodelle der Integrinaktivierung	15
	10
1.5. Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R)	
1.5.1. Die Rolle des EGF-R im humanen Ovarialkarzinom	19
1.5.2. Die Suuktur und Aktivierung des EOF-K	19 21
1.5.5. Die gehöhnsene Struktur und der Frömötör des humanen EGF-R	
1.5.5. Die Interaktionen zwischen dem EGF-R und Integrinen	
1.6. Die Integrin-linked Kingse (IIK)	23
1.6.1 Die Funktionen der ILK	
1.6.2. Die Rolle der ILK im humanen Ovarialkarzinom	
1.6.3. Die Struktur des ILK-Proteins	
1.6.4. Die genomische Struktur und der Promotor des humanen ILK Gens	27
1.6.5. Die Aktivierung und Signaltransduktionskaskaden der ILK	
2. ZIELSETZUNG	
3. MATERIAL UND METHODEN	
3.1. Reagenzien und Materialien	
3.1.1. Materialien für zellbiologische und proteinbiochemische Methoden	
3.1.2. Geräte und Software für zellbiologische und proteinbiochemische Methoden	33
3.1.3. Materialien und Geräte für Oberflächenplasmonenspektroskopie	33
3.1.4. Materialien und Geräte für molekularbiologische Methoden	34
3.2. Zellbiologische Methoden	
3.2.1. Zelllinien	
3.2.2. Zellkultur humaner Ovarialkarzinomzellen	35
3.2.3. Beschichtung von Zellkulturgefäßen mit EZM-Proteinen	36
3.2.4. Zelllyse humaner Ovarialkarzinomzellen	

	3.2.5. Nachweis der Integrin $\alpha v\beta$ 3-Expression in stabilen humanen	
	Ovarialkarzinomzelltransfektanten mittels Immuncytochemie (ICC) und konfokaler Laserscanni	ing-
	Mikroskopie (CLSM)	37
	3.2.6. Nachweis der EGF-R- und ILK-Expression in humanen Ovarialkarzinomzellen mittels IC	С
	und CLSM	38
	3.2.7. Nachweis transienter Transfektionen in humanen Ovarialkarzinomzellen mittels dualer	
	Luziferase-Reportergen-Assays	38
	3.2.8. Nachweis der Adhäsionskapazität humaner Ovarialkarzinomzellen mittels in vitro	
	Zelladhäsionstests	40
_		
3	3. Proteinbiochemische Methoden	41
	3.3.1. Quantifizierung der Proteinkonzentration	41
	3.3.2. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
	3.3.3. Farbung der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine	43
	3.3.4. Nachweis der EGF-R- und ILK-Expression in humanen Ovarialkarzinomzellen mittels	10
	Western Blot-Analyse	43 D
	3.3.5. Nachweis der EGF-K-Proteinexpression in numanen Ovarialkarzinomzellen mittels EGF-	K-
	ELISA	43
	3.3.6. Nachweis der Integrin avb3-Expression in numanen Ovariaikarzinomzeilen mittels	10
	Durchflusscytofluorometrie (FACS)	46
	2.2.8 Markierung von EZM Broteinen und gunthatigehen Integrin Ligenden	47
	2.2.0 Ermittlung von EzM-Proteinen und synthetischen Integrin-Liganden	49
	5.5.9. Efficiency on Integrin/Ligand-weenselwirkungen mittels	50
	2 3 0 1 Plasmonenspektroskopie (Surface Plasmon Resonance Spectroscopy, SPS)	30
	Signature Standing Series Standing Strategy Strategy Series Standing Strategy Series Strategy	52
	3.3.9.2. Messanordnung für SPFS-Messungen	52
	3.3.9.3. Aufbau Peptid-unterstützter Phospholipiddoppelschichten mit inkorporierten Integrinen	54
	3.3.9.4. Durchführung von Integrin/Ligand-Bindungsstudien mittels SPS/SPFS	57
	3.3.10. Entwicklung eines Mikrotiter-Liganden-Bindungstests	58
-		~ ~
3	4. Molekularbiologische Methoden	60
	3.4.1. Kultivierung von <i>E. coli</i> und Transformation von Plasmid-DNA	60
	3.4.2. Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien	60
	3.4.3. Expressionsvektoren	61
	3.4.4. site-directed in vitro DNA-Mutagenese	61
	3.4.4.1. Design von Oligonukleotid-Primern für die DNA-Mutagenese	62
	3.4.5 DNA Gelelektronhorese	05 65
	3.4.6 Nachweis der differentiellen Genexpression in humanen Ovarialkarzinomzellen mittels	05
	cDNA Expression Microarray-Analyse	65
		00
4	. ERGEBNISSE	. 66
4	1. Charakterisierung der Integrin avß3-abhängigen Expression des EGF-R	66
	4.1.1. Untersuchungen des EGF-R auf der mRNA-Ebene mittels cDNA <i>Expression Microarray</i> -	•
	Analyse	66
	4.1.2. Untersuchungen zur Integrin αvß3-abhängigen Expression des EGF-R mittels ICC	67
	4.1.3. Untersuchungen zur Integrin αvß3-abhängigen Expression des EGF-R mittels Western Blo	ot-
	Analyse	69 1~
	4.1.4. Untersuchungen zur Integrin avb3-abhangigen Modulierung der EGF-K-Expression mittel	1S 71
	ELIDA 415 Untergrade and ECE D. Deconstantities to la European des ECE D. Deconstantities to la European des 200	/1
	4.1.5. Untersuchungen der EUF-K-PTOMOTOFAKTIVITÄT Als Funktion des Integrins av153	12 +
	4.1.0. Onersuchungen zur mitegrin uvb5-vermittenen EOF-K-Promotoraktivität in Abnangigken	ι 7/
	VUII uti FIUIIUUIIAIIgt	/4 75
	+.1.7. Unitersuchungen der Errekte des integrins uviss auf EOF-K-Promotormutanten	73

4.2. Charakterisierung der Integrin αvβ3-abhängigen Expression der ILK	.78
4.2.1. Ontersuchungen der TEK auf der mixtvA-Boene mittels eDIVA Expression microurray-	78
4 2 2 Untersuchungen zur Integrin αvβ3-abhängigen Expression der ILK mittels ICC	79
4.2.3. Untersuchungen zur Integrin αvβ3-abhängigen Expression der ILK mittels Western Blot-	
Analyse	. 80
4.2.4. Untersuchungen der ILK-Promotoraktivität als Funktion des Integrins αvβ3	. 81
4.2.5. Untersuchungen zur Integrin αvβ3-vermittelten ILK-Promotoraktivität in Abhängigkeit vo	n
der Promotorlänge	. 82
4.2.6. Untersuchungen der Effekte des Integrins αvß3 auf ILK-Promotormutanten	. 83
4.3. Studium der Bindung synthetischer mono- und multimerer Integrin-Liganden an	
Membran-inkorporierte Integrine	. 86
4.3.1. Aufbau Integrin avß3-, avß5- bzw. aIIbß3-funktionalisierter Phospholipiddoppelschichten	86
4.3.2. Nachweis der Orientierung und Funktionalität Membran-inkorporierter Integrine	. 86
4.3.3. Nachweis der Dissoziation der Integrin-Ligand-Interaktion durch EDTA	. 89
4.3.4. Nachweis der Bindung synthetischer mono- und multimerer Integrin-Liganden an Membra	ın-
inkorporierte Integrine	. 90
4.3.5. Behandlung Integrin-funktionalisierter Phospholipiddoppelschichten mit Proteinase K	. 94
4.5. Entwicklung eines Liganden-Bindungstests auf immobilisierten Integrinen an Mikrotiterplatten	.90
4.5.1. Verwendung fluoreszenzmarkierter EZM-Liganden	. 98
4.5.2. Biotinylierung von EZM-Liganden	. 98
4.5.3. Verwendung unmarkierter EZM-Liganden	. 99
5. DISKUSSION	01
6. ANHANG 1	15
Zusammenfassung1	115
Abbildungsverzeichnis1	116
Abkürzungsverzeichnis1	18
Literaturverzeichnis1	121
Lebenslauf1	144
Veröffentlichungen 1	145

1. EINLEITUNG

1.1. Das humane Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom steht in Deutschland mittlerweile [nach Brustkrebs, Darmkrebs, Leukämien, Lymphomen, Karzinom des Gebärmutterkörpers, Magenkrebs und Bronchialkarzinom] an siebenter Stelle in der Rangfolge der Inzidenz und ist nach dem die Endometriumkarzinom maligne zweithäufigste Erkrankung der weiblichen Geschlechtsorgane. In Deutschland erkranken jährlich etwa 8.000 Frauen am epithelialen Ovarialkarzinom, von denen mehr als 90 % sporadisch auftreten, jedoch scheinen etwa 10 % genetisch bedingt zu sein (Engel et al. 2004). Bei Diagnosestellung liegt in 75 % der Fälle bereits ein fortgeschrittenes Stadium (FIGO IIb bis IV) mit intra-, extra- oder retroperitonealer Tumorausbreitung vor, weil die maligne Erkrankung des Ovars lange Zeit symptomarm verläuft. Deutliche Symptome zeigen sich erst im Spätstadium (Schelling et al. 2004).

Das Stadium hat demzufolge einen wesentlichen Einfluss auf die Prognose und ist einer der Gründe für die hohe Mortalität beim Ovarialkarzinom. Nur 30 % der Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom werden im Frühstadium (FIGO I und IIa) diagnostiziert und haben eine wesentlich günstigere Prognose hinsichtlich einer dauerhaften Heilung. In Relation zur Anzahl der Erkrankten ist das Ovarialkarzinom die häufigste gynäkologische Krebstodesursache und die 5-Jahres-Überlebensrate liegt stadienabhängig bei 65 - 90 %.

Die histologische Klassifikation des Ovarialkarzinoms und anderer Ovarialtumore erfolgt gemäß der aktuellen WHO Klassifikation von 2003. Histologisch und klinisch sind morphologisch zwar nahe stehende, tumorbiologisch jedoch verschiedene Läsionen mit entsprechenden Subtypen voneinander abzugrenzen: Borderline-Tumore (LMP, low malignant potential), Ovarialkarzinome und extraovarielle Karzinome. Innerhalb der Frühstadien werden low risk-Patientinnen mit einem hoch differenzierten Ovarialkarzinom und high risk-Patientinnen mit einem mäßig bis schlecht differenzierten Ovarialkarzinom unterschieden.

Nach Operation erfolgt eine kombinierte Chemotherapie aus Carboplatin und Paclitaxel. Messungen des spezifischen Antigens CA (cancer antigen) 125 können Auskunft über Verlauf und Ansprechen einer Behandlung geben. Der Tumormarker CA 125, ein in erster Linie von serösen Ovarialkarzinomen gebildetes hochmolekulares Glykoprotein, ist bei mehr als 80 % der Patientinnen mit fortgeschrittenen Ovarialtumoren erhöht. Allerdings ist CA 125 zur Früherkennung von Ovarialkarzinomen ungeeignet und führt oftmals zu falschen positiven Werten (Hermsen et al. 2007, Karlan and McIntosh 2007, Schelling et al. 2004).

In neuesten Studien wird tumorspezifische Plasma-DNA in Hinblick auf eine mögliche Verwendung als Biomarker bezüglich Tumorbefall und Therapieerfolg untersucht (Kamat et al. 2006). Andere mögliche Tumormarker, wie die humanen Kallikreine 5 und 8 (hK5, hK8), das humane Epididymis (HE4)-Protein oder die Matrix-Metalloproteinase (MMP)-9, werden derzeit hinsichtlich ihrer klinischen Wertigkeit überprüft, stehen aber als validierte Ergänzung zu etablierten Markern noch nicht zur Verfügung (Bast et al. 2007, Borgono et al. 2006, Drapkin et al. 2005, Hellstrom et al. 2003, Lengyel et al. 2001, Yousef et al. 2003).

Da die Krebserkrankung lange Zeit meist symptomarm und schmerzfrei verläuft, wird die Diagnose häufig erst im Stadium der Metastasierung gestellt. Ein erster Schritt der Metastasierung von Ovarialkarzinomzellen ist dabei die Ausbreitung über mesotheliale Zelloberflächen des Peritoneums in den abdominalen Hohlraum und das Vordringen in die extrazelluläre Matrix (EZM), Organe des kleinen Beckens sowie das retroperitoneale Lymphgewebe. Der Befall des Bauchfells durch Tumorzellen, z.B. Ovarialkarzinomzellen, was als Peritonealkarzinose bezeichnet wird, ist in der Regel die Folge einer fortgeschrittenen Krebserkrankung und mit einer deutlich reduzierten Lebenserwartung verbunden. In der Tumorpathologie sind adhäsive Interaktionen von Tumorzellen mit der EZM von entscheidender Bedeutung und durch das Vorhandensein von transmembranen Adhäsionsmolekülen, z.B. Integrinen, die Zelladhäsion-, Migrations- und Invasionsprozesse vermitteln, geprägt.

1.2. Die Superfamilie der Integrine

Die Terminologie "Integrin" wurde vor fast 20 Jahren eingeführt und beschreibt eine Familie strukturell, immunochemisch und funktionell verwandter heterodimerer Zelloberflächenrezeptoren, die in die EZM integriert sind (Hynes 1987). Die Superfamilie der Integrine beschränkt sich auf die Metazoen (Hynes 2002) und setzt sich aus transmembranen Adhäsivrezeptoren zusammen, die als gemeinsames Merkmal die Zelladhäsion und Migration vermitteln, indem sie eine physikalische Verknüpfung zwischen der EZM und dem Zytoskelett darstellen.

Integrin-vermittelte Interaktionen werden von Zellen mit den meisten EZM-Proteinen über die Zelladhäsionssequenz Arg-Gly-Asp (RGD), die in etwa der Hälfte aller Matrixproteine

vorkommt, vermittelt (Hynes 1992). Integrine binden extrazelluläre Liganden, z.B. Fibronektin, Kollagen, Vitronektin, Laminin, von Willebrand Faktor, Thrombospondin sowie Plasmaproteine, und lösen verschiedenartige intrazelluläre Signalwege aus, die Einfluss auf Zellwachstum, -differenzierung und -überleben ausüben (Giancotti and Ruoslahti 1999). Im Wachstumsfaktor-Rezeptoren besitzen Integrine keine Gegensatz zu intrinsische Kinaseaktivität. Die Signalweiterleitung der Integrine erfolgt über Interaktionen zwischen ihrer zytoplasmatischen Domäne und intrazellulären Signalmolekülen, z.B. der Integrinlinked kinase (ILK) (Melchior et al. 2002). Begleitend werden unterschiedliche zytoskelettale und regulatorische Proteine zu den Zelladhäsionspunkten, den sogenannten fokalen Anhaftungsstellen, rekrutiert, an denen infolge einer Liganden-Bindung Signale der EZM in intrazelluläre Kompartimente übertragen werden.

1.2.1. Die Funktionen der Integrine

Neben ihren regulatorischen Funktionen bei physiologischen Prozessen, z.B. während der Embryonalentwicklung, Apoptose, Hämostase, Immunantwort und fundamentalen zellulären Vorgängen, wie Zelladhäsion, Migration, Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben, sind Integrine ebenso in pathophysiologische Abläufe, z.B. Tumorwachstum und tumorinduzierte Angiogenese, Thrombose, Neoplasie, Metastasierung, Osteoporose, Retinopathie, Arthritis und akutes Nierenversagen, involviert (Ruegg et al. 2004). Resultierend aus der Adhäsions-, Stütz- und Verankerungsfunktion übermitteln Integrine, nach Aktivierung durch Bindung verschiedener EZM-Liganden, Signale über ihre zytoplasmatische Domäne ins Zellinnere. Über ihre ß-Untereinheiten sind Integrine u.a. direkt an fokalen Anhaftungsstellen mit Komponenten des Zytoskeletts verbunden, an denen durch Wechselwirkungen mit Vinculin, Paxillin und Tensin eine Assoziation mit Aktinfasern stattfindet (Abb. 1) und zur Ausprägung eines migratorischen Phänotyps und einer zellulären Morphologie führt (Johnson and Craig 1995). Aufgrund der Integrin-Ligand-Interaktionen werden Signale bidirektional induziert und unterschiedliche Signalkaskaden, z.B. der Focal adhesion kinase (FAK), Mitogen activated protein kinase (MAPK) oder Proteinkinase B (PKB/Akt), stimuliert, die Einfluss auf die Expression von Genen aus unterschiedlichsten zellulären Funktionsbereichen nehmen können.

Die tumorbiologische Bedeutung der membranständigen Integrine besteht in der festen Verankerung von Tumorzellen mit der EZM. Integrine verhindern einerseits die Auswanderung von Krebszellen, andererseits unterstützen sie adhäsionsabhängige Migrationen und Reimplantationen von Krebszellen am Ort der Metastasierung (Giancotti 1997). Integrine sind u.a. in diverse pathologischen Vorgänge impliziert, z.B. werden α v-Integrin-Subtypen in Tumorzellen während der Progression und in Endothelzellen während der Tumorangiogenese verstärkt exprimiert (Arndt et al. 2005, Stupack and Cheresh 2004).



Abb. 1. Integrine-EZM-Interaktion. Integrine sind heterodimere transmembrane Zelloberflächenrezeptoren, die durch ihre ß-Untereinheiten die EZM mit dem Aktinskelett verbinden und so Signale durch verschiedene Signaltransduktionskaskaden ins Zellinnere weiterleiten (verändert nach Brakebusch and Fässler 2003).

1.2.2. Der Aufbau der Integrine und die Kristallstruktur des Integrins avß3

Heterodimere Integrine setzen sich aus je einer der 18 α- und einer der 8 β-Untereinheiten zusammen, die nicht-kovalent verknüpft sind. Sie existieren in Säugetieren in 24 unterschiedlichen Kombinationen. Die Glykoproteine haben eine Größe von 280 Å bzw. 24 nm und bestehen aus einer großen N-terminalen extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne, einer hydrophoben transmembranen Region (20-30 aa [amino acid]) sowie einer kleinen (< 50 aa) zytoplasmatischen Domäne (Hynes 2002). Die α/β -heterodimeren Zelloberflächenrezeptoren werden anhand ihrer Untereinheiten charakterisiert (Abb. 2 A). Die α -Untereinheit enthält einen siebenblättrigen β -Propeller und z.T. eine besondere α A- (von Willebrand Faktor Typ A) oder I- (inserted) Domäne (Bella and Berman 2000, Lee et al. 1995). Die bislang einzige veröffentlichte Kristallstruktur der extrazellulären Domäne der Integrine, die des Integrins avß3, offenbarte, dass die Zelloberflächenrezeptoren V-förmig gebogen sind und aus 12 Domänen bestehen, die in eine Kopfregion und zwei parallele Schwanzregionen unterteilt werden können (Abb. 2 B). Über die N-terminale Kopfregion Kationen-abhängige Zell-Zellund Zell-EZM-Adhäsionen werden durch Bindung extrazellulärer Liganden an Integrine vermittelt. Oberhalb der B-Faltblätter, in der I-Domäne, befindet sich eine Bindungsstelle für divalente Kationen, z.B. Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, die als *metal* ion dependent adhesion site (MIDAS) bezeichnet wird sowie eine benachbarte adjacent to MIDAS (ADMIDAS) Bindungsstelle (Xiong et al. 2001). Die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des Integrins avß3 im Komplex mit einem zyklischen RGD-Peptid zeigt, dass die Bindungsstelle der EZM-Liganden in einer kleinen Einbuchtung zwischen dem β-Propeller der αv-Untereinheit und der A-Domäne der β3-Untereinheit der Kopfgruppe der Integrine liegt. Die Bindung des pentapeptidischen RGD-Liganden ist mit einer Veränderung sowohl der Tertiär- als auch Quartärstruktur des Integrins avß3 verbunden (Alonso et al. 2002, Xiong et al. 2002).



Abb. 2. Die Struktur der Integrine. A. Schematischer Aufbau der Integrine. Die α -Untereinheit enthält einen siebenblättrigen β -Propeller und in einigen Integrinen eine zusätzliche I-Domäne (verändert nach Bella and Berman 2000). B. Kristallstruktur der Extrazellulärdomäne des Integrins $\alpha v\beta 3$. Die korrigierte Röntgenstruktur der extrazellulären Domäne des Integrins $\alpha v\beta 3$ ist aus 4 Domänen der αv -Untereinheit (blau) und 8 Domänen der $\beta 3$ -Untereinheit (rot) zusammengesetzt (verändert nach Xiong et al. 2001). Die Kopfregion wird aus einem siebenblättrigen β -Propeller der αv -Untereinheit und der A-Domäne der $\beta 3$ -Untereinheit gebildet. Die αv -Schwanzregion besteht aus drei β -Sandwich-Domänen: einer Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Schenkel-Domäne und zwei sehr ähnlichen Calf-Domänen. Die $\beta 3$ -Schwanzgruppe enthält eine PSI (Plexin, Semaphorin, Integrin)-Domäne, vier cysteinreiche Epidermal growth factor (EGF)-Domänen und eine βT (tail)-Domäne (Bork et al. 1999, Xiong et al. 2001).

1.2.3. Die Rolle des Integrins avß3 im humanen Ovarialkarzinom

Die Mitglieder der Superfamilie der Integrine sind zellspezifisch exprimiert. Unter ihnen wird das Integrin $\alpha\nu\beta3$ in einer großen Anzahl verschiedenartiger Zelltypen exprimiert, z.B. Endothelzellen, Epithelzellen, glatten Muskelzellen, Leukocyten und Osteoclasten (Arndt et al. 2005). Das Integrin $\alpha\nu\beta3$ ist nicht nur in normalen Gewebszellen, sondern auch in Tumorzellen, z.B. Melanomzellen, Gehirntumorzellen des fortgeschrittenen Stadiums sowie Ovarialkarzinomzellen zu finden (Gladson and Cheresh 1991, Jones et al. 1995, Lafrenie et al. 1994, Marshall et al. 1991, Montgomery et al. 1994, Nip and Brodt 1995, Rabb et al. 1996, Seftor et al. 1992) und wird als Indikator der invasiven Phase von Tumorzellen betrachtet (Felding-Habermann et al. 1992, Kerr et al. 2000). Das Auftreten entfernter Metastasen und einer ungünstigen Prognose stehen im Zusammenhang mit einer erhöhten Integrin $\alpha\nu\beta3$ -Expression (Albelda et al. 1990, Cheresh 1991). Überdies werden eine Reihe von $\beta1$ -Integrin-Subtypen in Ovarialkarzinomzellen exprimiert und vermitteln neben der peritonealen Ausbreitung auch durch Bindung an EZM-Proteine die Invasion in die submesotheliale EZM sowie die Metastasierung (Cannistra et al. 1995).

Die Expression des Integrins $\alpha\nu\beta3$ korreliert mit der Malignität von Ovarialtumoren (Liapis et al. 1997). Neben dem Integrin $\alpha\nu\beta3$ wird auch dessen Hauptligand Vitronektin (VN), der über die RGD-Erkennungssequenz mit dem Integrin $\alpha\nu\beta3$ interagiert (Abb. 3), von Ovarialkarzinomzellen exprimiert und als primäres Adhäsionssubstrat sezerniert (Carreiras et al. 1999, Carreiras et al. 1996, Giancotti 1997). Deshalb beschäftigt sich ein Teil der vorgelegten Arbeit mit der Interaktion zwischen dem Integrin $\alpha\nu\beta3$ und seinem EZM-Liganden VN in humanen Ovarialkarzinomzellen und deren Auswirkungen auf Integrinvermittelte bidirektionale Signaltransduktionsprozesse sowie das zelluläre Genexpressionsprofil und deren funktionelle Rolle.

Das Integrin αvß3 ist eines der am besten untersuchten Integrine, da es in unterschiedlichste physiologische sowie pathophysiologische Zelladhäsions- und Migrationsprozesse involviert ist, z.B. Knochenresorption (Ertl et al. 2000, Lahana 1999), Phagocytose apoptotischer Zellen (Tannock and Rotin 1989) oder Fehlfunktionen des Gefäßsystems (Mousa 2003). Das Integrin αvß3 hat nicht nur eine Schlüsselfunktion bei der Ausbildung neuer Blutgefäße (Angiogenese), sondern auch während zellulärer Abläufe der Tumorbildung, z.B. Metastasierung, Zellüberleben, Proliferation sowie Tumorangiogenese, die durch eine aggressive Proliferation von Tumorzellen hinsichtlich der Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff gekennzeichnet ist (D'Amore and Thompson 1987, Eliceiri and

Cheresh 1999, Felding-Habermann 2003, Felding-Habermann et al. 2002, Folkman 1995, Montgomery et al. 1994, Nip and Brodt 1995, Seftor et al. 1992). Auf angiogenetischen Endothelzellen kann das Integrin $\alpha\nu\beta3$ als Marker für die Neovaskularisierung eines Tumors herangezogen werden (Brooks et al. 1994, Brooks et al. 1995). Eine Inhibierung des Integrins $\alpha\nu\beta3$, das für die zielgerichtete Wanderung und Adhäsion von Endothelzellen in umgebendes Gewebe verantwortlich ist, verhindert während der tumorinduzierten Angiogenese die Bildung neuer Blutgefäße (Aumailley et al. 1991, Brooks et al. 1994, Pfaff et al. 1994). Ausgehend von der dargelegten tumorbiologischen Bedeutung stellt das Integrin $\alpha\nu\beta3$ eine Zielstruktur für die Entwicklung selektiv wirkender Antagonisten, z.B. zyklische RGD-Peptide oder monoklonale Antikörper dar. Das Integrin $\alpha\nu\beta3$ stellt einen entscheidenden Angriffspunkt in der Krebstherapie, z.B. im Hinblick auf die Hemmung der Angiogenese und Tumorprogression, dar (Belvisi et al. 2005, Heckmann et al. 2007, Posey et al. 2001, Ruegg et al. 2004, Rust et al. 2002, Shimaoka and Springer 2003, Tucker 2003).



Abb. 3. Effekte Integrin $\alpha\nu\beta3$ -vermittelter Signaltransduktionen. Das Integrin $\alpha\nu\beta3$ interagiert mit dem EZM-Liganden VN über das RGD-Erkennungsmotiv und beeinflusst durch Induktion verschiedener bidirektionaler Signaltransduktionswege die Zelladhäsion, -invasion, -migration und proliferation, die letztendlich zu einer veränderten Genexpression führen. Da das Integrin $\alpha\nu\beta3$ mit der Malignität von Ovarialtumoren korreliert sowie in Prozesse der Metastasierung und Angiogenese involviert ist, wurden verschiedene Integrin $\alpha\nu\beta3$ -selektive zyklische peptidische und nichtpeptidische RGD-basierte Integrin-Antagonisten entwickelt, die die Integrin/Ligand-Interaktionen unterbrechen.

1.3. Peptidische und nicht-peptidische RGD-basierte Integrin-Antagonisten

Aufgrund der aufgezählten vielfältigen pathophysiologischen Wechselwirkungen, in die das Integrin $\alpha\nu\beta3$ involviert ist, wurden in den letzten Jahren zahlreiche synthetische, lösliche $\alpha\nu\beta3$ -Integrin-Liganden entwickelt. Die Peptidsequenz RGD wurde als minimales Fragment zur Stimulierung der Zelladhäsion an Fibronektin identifiziert und als eine der Bindungsstellen der Integrine entdeckt (Pierschbacher and Ruoslahti 1984). Ausgehend von dieser natürlichen Bindungssequenz wurden peptidische und nicht-peptidische Integrin-Liganden entwickelt und synthetisiert, die hoch-affin, selektiv gegenüber dem Integrin $\alpha\nu\beta3$ und z.T. den natürlichen Integrin-Liganden deutlich überlegen sind. Die ersten synthetischen, hochaktiven, $\alpha\nu\beta3$ -selektiven zyklischen RGD-basierten Peptide wurden vor ungefähr 15 Jahren in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Horst Kessler (Institut für Organische Chemie und Biochemie der TU München in Garching) beschrieben (Aumailley et al. 1991, Pfaff et al. 1994).

Das zyklische Pentapeptid c(-RGDfV-) bildete nach systematischer Derivatisierung die Grundlage für c(-RGDf[NMe]V-), was auch unter dem Namen Cilengitide bekannt ist (Dechantsreiter et al. 1999). Cilengitide wird bereits in der Klinischen Phase II als Angiogenese-Inhibitor getestet (Arndt et al. 2005, Eskens et al. 2003, Raguse et al. 2004). Unterdessen wurden auch multimere zyklische RGD-basierte Peptide entwickelt, um die selektive Bindung an die Zielmoleküle noch weiter zu verstärken (Arndt et al. 2005, Poethko et al. 2004, Thumshirn et al. 2003). Dennoch sind Einfluss der räumlichen Anordnung und Abstand der einzelnen RGD-Gruppen zueinander für eine optimale Bindung an Integrine auf der Zelloberfläche noch weitgehend ungeklärt. Eine veränderliche Beweglichkeit der zyklischen Peptide und gleichzeitige Präsentation mehrerer RGD-Motive konnte dadurch erreicht werden, dass Peptide an unterschiedlich lange Spacer, zum einen mit der eher unpolaren ɛ-Aminohexansäure (Ahx), zum anderen mit der gut wasserlöslichen Heptaethylenglykolaminosäure gekoppelt wurden. Dabei (Hegas), kann die Hydrophilie/Lipophilie bzw. die Löslichkeit der multimeren Peptide beeinflusst werden. Die multivariaten Wechselwirkungen der Spacer spielen eine entscheidende thermodynamische Rolle und wirken sich auf die biologische Aktivität der synthetischen Integrin-Liganden aus. Deshalb wurden monomere Peptide mit graduell zunehmenden Ahx Spacer-Längen synthetisiert und auf ihre Fähigkeit zur Integrin-Bindung untersucht (Arndt et al. 2005, Hersel et al. 2003, Thumshirn et al. 2003).

14

Da zyklische Peptide metabolisch stabil sind, konnte die Bioverfügbarkeit verbessert werden, indem nicht-peptidische $\alpha\nu\beta3$ -selektive Integrin-Liganden auf der Basis des c(-RGDfV-) entwickelt wurden (Duggan et al. 2000, Gibson et al. 1999, Gibson et al. 2001, Sulyok et al. 2001, Yasuda et al. 2004).

1.3.1. Die Messung der Selektivität der Ligand-Rezeptor-Interaktionen

Um die Bindungsspezifität und -selektivität sowohl natürlicher als auch synthetischer gegenüber bestimmten Integrinen zu untersuchen, sind sensitive Liganden und reproduzierbare in vitro Messtechniken zur Bestimmung der Bindungseigenschaften eine unbedingte Voraussetzung. Um die native Konformation der Integrine zu erhalten, werden in vitro Zellkulturmodelle benutzt. Jedoch sind diese zell-basierten experimentellen Ergebnisse oftmals schwierig zu interpretieren, da Integrine vielzählig und allgegenwärtig auf natürlichen Zellmembranen vorkommen sowie häufig überlappende Erkennungssequenzen in EZM-Proteinen aufweisen. Infolgedessen wurden zusätzlich zell-freie Bindungsstudien durchgeführt, bei denen gereinigte Integrine auf Plastikoberflächen immobilisiert werden. Dies hat jedoch den Nachteil, dass die natürliche Konformation der Integrine nicht bewahrt werden kann (Goodman et al. 2002). Ferner lässt das zell-freie Untersuchungsformat die transmembrane Einbindung der Integrine vollkommen außer Betracht (Shimaoka et al. 2002). Um die aufgeführten intrinsischen und experimentellen Nachteile zu vermeiden und zuverlässige Aussagen über die Integrin-Liganden-Interaktionen treffen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein alternativer zell-freier Bindungstest durchgeführt. Hierbei wird die Konformation der Integrine, basierend auf Anwesenheit künstlicher Membranen, in die Integrine eingebettet sind, erhalten. Die experimentelle Herausforderung besteht darin, die gereinigten Integrine in eine Phospholipidmembran, die vergleichbar mit einer natürlichen Zellmembran ist, zu inkorporieren. Deshalb wurden Phospholipiddoppelschichten auf planaren Oberflächen rekonstruiert, die mit hydrophilen "Abstandhalter-Molekülen" (Spacer) von der Oberfläche des Biosensors separiert werden können (Knoll et al. 2000, Sackmann 1996, Sevin-Landais et al. 2000, Sinner and Knoll 2002, Wagner and Tamm 2000). Zur Untersuchung spezifischer Bindungsvorgänge an biologische Schichtsysteme sind die Plasmonenspektroskopie (SPS) und ihre Erweiterung, die plasmonenverstärkte Fluoreszenzspektroskopie (SPFS), geeignete Methoden (Schmidt et al. 1998). Mittels SPS können ultradünne Schichten, z.B. künstliche Membranen oder der Aufbau Peptidunterstützter Phospholipiddoppelschichten, kontrolliert werden. Mit Hilfe der SPFS wurden

dann spezifische Bindungsvorgänge von Rezeptor-Ligand-Interaktionen, z.B. von Integrinen und deren Wechselwirkungen mit sehr kleinen mono- und oligomeren RGD-Peptiden, detektiert (Krupka et al. 2006, Lossner et al. 2006, Saccà et al. 2002).

1.4. Signaltransduktionsmodelle der Integrinaktivierung

Integrin-Liganden-Interaktionen werden durch mehrere Faktoren, wie Spezifität der Liganden-Bindung, Erkennungssequenzen, divalente Kationen sowie Aktivitätszustand der Integrine, bestimmt. Den Aktivierungsmodellen zufolge wechseln Integrine nach Bindung extrazellulärer Liganden, in Anwesenheit zweiwertiger Kationen (Plow et al. 2000), von einer inaktiven in eine aktive Konformation mittels einer scherenförmigen Bewegung der Integrin-Untereinheiten (switchblade or jackknife model, alternative angle-poise or deadbolt model). Die Aktivierung und damit verbundene Konformationsänderung der Integrine erfolgt in weniger als einer Sekunde, ist temperaturabhängig und reversibel (Beglova et al. 2002, Shimaoka et al. 2002, Takagi et al. 2002, Xiong et al. 2003).

Integrine können in verschiedenen Affinitäten gegenüber EZM-Liganden vorliegen. Während niedrig affine Interaktionen durch gruppierte (*clustered*) Integrine vermittelt werden, erfordern hoch affine Bindungen physiologischer Liganden Konformationsänderungen und sind unabhängig vom Aktivitätszustand der Integrine. Nach einer zellulären (*inside-out signaling*) Stimulierung erfolgt eine Konformationsänderung von einer geschlossenen in eine offene Konformation (Arnaout et al. 2002, Arnaout et al. 2005, Mehta et al. 1998). Die Einleitung der Signaltransduktion durch Integrine lässt sich anhand eines 3-Stufen-Models erklären. Im ersten Zustand liegen Integrine aufgrund intrazellulärer Interaktionen im Ruhezustand vor. Nachdem intrazelluläre Proteine an die zytoplasmatischen Domäne der Integrine binden, wird eine Rotationsbewegung der beiden Integrine gegenüber EZM-Liganden bedingt. Der dritte Zustand umfasst die Bindung extrazellulärer EZM-Liganden, die weitere Konformationsveränderungen sowie die Trennung der Kopfgruppen beider Integrin-Untereinheiten hervorrufen (Gottschalk et al. 2002a, Gottschalk et al. 2002b, Gottschalk and Kessler 2002).

1.4.1. Die Signaltransduktionskaskaden der Integrine mit anderen Rezeptoren

Integrine können Signale bidirektional über die Zellmembran hinweg vermitteln. Dazu müssen Integrine, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, aktiviert werden. Zum einen geschieht die Aktivierung durch Bindung von EZM-Liganden, die eine Signalweiterleitung über die zytoplasmatischen Domänen der Integrine ins Zellinnere hervorrufen (*outside-in signaling*). Zum anderen bedingt die Bindung intrazellulärer Proteine an die zytoplasmatischen Domänen eine Aktivierung und damit eingeleitete Konformationsänderung der Integrine, wodurch Signale extrazellulär übertragen werden können (*inside-out signaling*) (Hynes 2002).

Das derzeitige Model der Integrinaktivierung und der damit verbundenen Signalweiterleitung erfordert eine Rekrutierung von Talin an die zytoplasmatischen Domänen der ß-Integrin-Untereinheiten, wofür inaktive Integrine zuvor durch Liganden-Bindung aktiviert werden müssen (Ginsberg et al. 2005, Legate et al. 2006, Luo et al. 2007, Luo and Springer 2006). Dabei wird die Salzbrücke, die die α - und β -Integrin-Untereinheit zytoplasmatisch verbindet, deren genaue Bedeutung in vivo allerdings fraglich bleibt, getrennt, um die Affinität der Integrine gegenüber EZM-Liganden zu erhöhen und Interaktionen der Integrine mit der EZM zu induzieren sowie Verknüpfungen zum Zytoskelett herzustellen (Calderwood et al. 2003, Critchley 2004, Czuchra et al. 2006, Garcia-Alvarez et al. 2003). Zusammen mit anderen Zelloberflächenrezeptoren, einschließlich der Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wirken Integrine synergistisch auf die Initiation verschiedenster Signalwege, die z.B. Proliferation, Differenzierung, Zellform und Migration sowie differentielle Genexpressionen beeinflussen, ein (Abb. 4). Die komplexen Signaltransduktionswege der Integrine sind vergleichbar mit denen der G-gekoppelten Rezeptoren und anderer Kinaserezeptoren. Tatsächlich sind viele zelluläre Antworten auf Wachstumsfaktoren, z.B. Epidermal growth factor (EGF), Plateletderived growth factor (PDGF), Lysophosphatidic acid (LPA) oder Thrombin, abhängig von einer Integrin-vermittelten Zelladhärenz. In normalen Zellen blockieren Integrin-übertragene Signale die Apoptose durch Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und PKB/Akt, stimulieren hingegen den Zellzyklus über Extracellular signal-related kinase (ERK) und Cyclin D1 sowie Transkriptionsfaktoren, z.B. c-Jun oder Activator protein 1 (AP-1), die während der Proliferation von Bedeutung sind. In Krebszellen jedoch können verknüpfungsabhängige Signalmechanismen durch Onkogene oder Mangel an Tumorsuppressorgenen verändert werden und bedingen ein verknüpfungsunabhängiges Wachstum (Hynes 2002).

Wie einleitend bereits erwähnt, leiten aktivierte Integrine über ihre zytoplasmatischen Domänen beider Untereinheiten Signale an unterschiedliche intrazelluläre Proteinkinasen, z.B. FAK, MAPK oder ILK weiter. Hierbei spielt der FAK-Signalweg, der hinsichtlich seiner Aktivierung noch ziemlich ungeklärt ist, eine besondere Rolle. Diese Proteinkinase kann an entstehende fokale Adhäsionspunkte rekrutiert werden, da sie entweder direkt oder durch die Zytoskelettproteine Talin und Paxillin mit zytoplasmatischen Domänen der ß-Integrin-Untereinheiten interagiert. Eine Aktivierung von FAK verursacht die Autophosphorylierung eines Tyrosinrestes, wodurch Bindungsstellen, z.B. für Avian sarcoma virus protein (Src)-Kinasen oder Adaptorproteine, wie Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2), entstehen. Hier werden fokale Adhäsionskomponenten aktiviert, die u.a. in das Zellüberleben und die Apoptose involviert sind. Des Weiteren stimuliert FAK direkt oder indirekt über Src, die PI3K und MAPK, die sowohl positiv als auch negativ mittels Tyrosinphosphatasen reguliert werden können. So bedingt das Fehlen des Tumorsuppressors Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome tEN (PTEN) die Tumorgenese, weil PI3K und Integrine verstärkt an der Signalweiterleitung beteiligt sind (Giancotti 2003, Giancotti and Tarone 2003, Schwartz and Ginsberg 2002, Watt 2002).



Abb. 4. Integrin-abhängige Signaltransduktionskaskaden. Aufgrund der Integrin-Interaktionen mit anderen Zelloberflächenrezeptoren und der EZM nehmen sie Einfluss auf Proliferation, Migration,

Zellüberleben, Apoptose und Differenzierung. Neben der veränderten Affinität der Integrine gegenüber EZM-Liganden durch Konformationsänderungen ihrer extrazellulären Domäne (inside-out signaling) lösen Integrine verschiedenste intrazelluläre Signalkaskaden, z.B. FAK-Signalkaskade, über ihre zytoplasmatische Domäne nach Aktivierung durch EZM-Liganden aus (outside-in signaling). Dabei sind Integrin-induzierte Signalweiterleitungen eng mit dem Aufbau des Zytoskeletts verbunden. Gemeinsam mit RTK wirken Integrine synergistisch auf die Initiation der abgebildeten Signalwege ein (verändert nach Arndt et al. 2005).

Effekte Kapitel aufgezählten Integrin-vermittelten der im vorangegangenen Signaltransduktionsprozesse betreffen Veränderungen im zellulären Genexpressionsprofil. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen dem Integrin avß3 und seinem EZM-Liganden VN in humanen Ovarialkarzinomzellen analysiert. Mittels cDNA Expression Microarray-Analysen wird der Einfluss des Integrins avß3 auf die Genexpression humaner Ovarialkarzinomzellen, die das Integrin avß3 überexprimieren, in Gegenwart von VN bestimmt und mit dem Integrin avß3-Muster von Wildtypzellen verglichen. Nach Normalisierung der erhaltenen Hybridisierungssignale für 588 Gene aus verschiedenen zellulären Funktionsbereichen gegen das house keeping gene Glyzerinaldehydphosphat-Dehvdrogenase (GAPDH) wird neben anderen Kandidatengenen der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) und die ILK als differentiell reguliertes Gen in Abhängigkeit von der Expression des Integrins avß3 identifiziert. In den nächsten Kapiteln (1.5. und 1.6.) wird das Zusammenspiel des EGF-R und der ILK mit Integrinen sowie die Verknüpfung ihrer Signalkaskaden erläutert. Deshalb sollen im Folgenden diese beiden Proteine beschrieben werden.

1.5. Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R)

Der EGF-R ist die erste, vor fast 30 Jahren entdeckte Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK). Anhand von biochemischen Reaktionen in einem zellfreien System wurde auch der Wachstumsfaktor EGF, der einen Komplex mit Membranrezeptoren bildet, charakterisiert (Carpenter et al. 1978). Der EGF-R (HER, ErbB1) gehört neben drei weiteren Mitgliedern, ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4), der Erb-Familie an und ist der am besten untersuchte Rezeptor dieser Familie. Die Aktivierung der Tyrosinkinase kann über eine Reihe von Signalwegen, die sich untereinander kreuzen und überlappen, physiologische Vorgänge steuern, die die Genexpression, Zellteilung, Proliferation, Differenzierung sowie Zellbeweglichkeit und Apoptose regulieren. Die EGF-R-Expression wird transkriptionell mittels Genamplifikation sowie (post)-translationale Dysregulation erhöht. Die Steigerung der EGF-R-Expression kann pathophysiologische Ereignisse, wie Proliferation, Invasion und

Metastasierung von Tumorzellen, fördern (Blume-Jensen and Hunter 2001, Citri and Yarden 2006, Mendelsohn and Baselga 2000). Überdies korreliert die EGF-R-Expression mit der Tumorprogression, verminderter Sensitivität gegenüber Östrogenen, Resistenz gegenüber zytotoxischen Reagenzien und einem schlechten Patientenüberleben (Grandis and Sok 2004). Darüber hinaus exprimieren die meisten soliden Tumoren auch verstärkt die anderen Mitglieder der Erb-Familie.

1.5.1. Die Rolle des EGF-R im humanen Ovarialkarzinom

Der EGF-R ist in ungefähr einem Drittel der epithelialen Krebserkrankungen überexprimiert, so auch in Ovarialkarzinomen (Grandis and Sok 2004, Mendelsohn 2001). Die Überexprimierung des EGF-R in humanen Ovarialkarzinomzellen resultiert in einer phänotypischen Veränderung und verstärkt die zelluläre Invasion (Alper et al. 2001). Die Expression des EGF-R kann in 50 - 70 % der Ovarialkarzinome nachgewiesen werden und mit einer ungünstigen Prognose hinsichtlich einer dauerhaften Heilung assoziiert; die prognostische Bedeutung wird jedoch kontrovers diskutiert (Daud et al. 2001). Die Hemmung der Aktivität dieser RTK wurde bislang mit vielversprechenden, selektiven, oralen Antagonisten, wie ZD-1839 und OSI-774 (Gefitinib, Erlotinib), geprüft (Chinnaiyan and Harari 2006, Ranson et al. 2002). So inhibiert OSI-774 spezifisch die Phosphorylierung der RTK, infolgedessen wird der Zellzyklus gehemmt und die Apoptose induziert. In einer Phase-II-Studie wird bei intensiv vorbehandelten Patienten mit EGF-R-positiven Tumoren und erhöhten CA 125-Werten eine stable disease-Rate von 44 % durch monotherapeutische Behandlung mit OSI-774 erreicht. Allerdings ist die Bedeutung der EGF-R-Expression bezüglich des Therapieansprechens noch unklar (Gordon et al. 2005). Der EGF-R wird u.a. auch in der Epidermis exprimiert; nach Behandlung mit OSI-774 können 30 - 50 % pharmakodynamische Effekte, die die Wirkung eines Inhibitors definieren, in Hautgeweben von Patienten verglichen mit Normalgewebe gemessen werden. Zusätzlich wird eine signifikante Abnahme des phosphorylierten (aktivierten) EGF-R dosisunabhängig erreicht (Malik et al. 2003).

1.5.2. Die Struktur und Aktivierung des EGF-R

Der 180 kDa umfassende Membran-integrale Oberflächenrezeptor EGF-R besteht aus drei Domänen und in seiner monomeren Form aus einer einzelnen Polypeptidkette mit 1186 aa sowie einem hohen Anteil an Oligosacchariden. Die extrazelluläre Domäne ist aus 621 aa, mehreren Oligosaccharidketten und zwei cysteinreichen Sequenzen, zwischen denen sich die eigentliche Liganden-Bindungsdomäne befindet, zusammengesetzt. Die transmembrane Region ist aus 23 vorwiegend hydrophoben aa aufgebaut. Die zytoplasmatische Domäne besteht aus 542 aa und ist für die Aktivität der Tyrosinkinase verantwortlich (Abb. 5 A) Die Aktivierung des EGF-R erfolgt normalerweise, wenn einer seiner spezifischen Liganden, z.B. EGF, Transforming growth factor- α (TGF- α) oder Amphiregulin, an die extrazelluläre Domäne des EGF-R bindet. Danach ist EGF-R in der Lage, Homodimere oder mit einem anderen Mitglied der Erb-Familie Heterodimere zu bilden, was die intrinsische Aktivität der Proteinkinase induziert. Im Anschluß erfolgt eine Auto- und Transphosphorylierung der Dömane des EGF-R, eine Konformationsänderung sowie die zytoplasmatischen Bereitstellung von Phosphotyrosinen (Abb. 5 B). Dabei werden zytoplasmatische Bindungsstellen für Signaltransduktionsmoleküle, z.B. Src, Shc, Grb2 und Nck geschaffen, die den Signalweg des aktivierten EGF-R mit nachfolgenden Signalkaskaden verknüpfen. Über verschiedene Signalpfade können dann Signale vom Zytoplasma in den Zellkern übertragen werden. Die Signalweiterleitung mittels RTK unterliegt in gesunden Zellen einer strikten Kontrolle und Regulierung, kann jedoch durch Störungen zur Tumorbildung führen (Jorissen et al. 2003, Mendelsohn 2001, Schlessinger 2002).



Abb. 5. Die Struktur und Aktivierung des EGF-R. A. Die Struktur des EGF-R. Der transmembrane EGF-R ist aus drei Domänen zusammengesetzt: einer externen cysteinreichen Domäne, die für Liganden-Bindungen verantwortlich ist, einer kurzen transmembranen Domäne sowie einer zytoplasmatischen Domäne, die die Aktivität der Tyrosinkinase beinhaltet. **B. Die Aktivierung des EGF-R.** Durch Bindung extrazellulärer Liganden, z.B. EGF, TGF-α oder Amphiregulin, wird die

Aktivierung des Rezeptors ausgelöst. Infolgedessen dimerisiert der Rezeptor, was Änderungen seiner Konformation und schließlich die Aktivierung der Tyrosinkinasefunktion hervorruft. Nachfolgend wird die zytoplasmatische Domäne auto- und transphosphoryliert, wodurch neue zytoplasmatische Bindungsstellen für Signaltransduktionsmoleküle geschaffen werden.

1.5.3. Die genomische Struktur und der Promotor des humanen EGF-R Gens

In einigen Tumoren wird die Überexpression des EGF-R transkriptionell kontrolliert und ist nur zum Teil durch Genamplifikationen oder post-transkriptionelle Mechanismen bedingt (Citri and Yarden 2006). Deshalb ist es wahrscheinlich, dass trans-aktivierende Faktoren die transkriptionelle Aktivierung des EGF-R Gens hervorrufen (Kageyama et al. 1988b). Das EGF-R Gen wurde vor fast 20 Jahren zum ersten Mal zusammen mit Sequenzen, die dessen Transkription regulieren, beschrieben und liegt auf dem Chromosomenabschnitt 7p12.1 -12.3. Das Protoonkogen enthält 26 Exons und hat eine Größe von ca. 110 kb. Die Regulierung des EGF-R Gens ist noch nicht vollständig verstanden (Liu et al. 2005). Der EGF-R-Promotor besitzt keine TATA- und CAAT-Boxen, enthält aber verschiedene GC-Boxen und Initiationsstellen für die Transkription (Haley et al. 1987). Mehrere DNA-Bindungsfaktoren wurden identifiziert, die mit dem EGF-R-Promotor interagieren, z.B. AP-1, Activator protein 2 (AP-2), Specificity protein 1 (Sp-1), p53 und Nuclear factor-kappaB (NFκB) (Nishi et al. 2003). Des Weiteren sind Bindungsstellen für ETF (EGF-R Transkriptionsfaktor), ERDP-1 (EGF-responsive DNA binding protein) und ETR (EGF-R transkriptioneller Repressor) in der Sequenz des EGF-R-Promotors vorhanden (Hou et al. 1994, Hudson et al. 1990, Kageyama et al. 1988a). Die Aktivität des EGF-R-Promotors wird durch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) sowie die beiden Repressoren ETR und den GC-Faktor vermindert (Gardner and Shimizu 1990). Hingegen verstärken EGF, cAMP, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und p53 die Aktivität des EGF-R-Promotors (Hudson et al. 1990, Johnson 1996, Sheikh et al. 1997).

1.5.4. Die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden durch den EGF-R

Die durch die Auto- und Transphosphorylierung bereitgestellten Phosphotyrosine bilden wichtige Bindungsstellen für unterschiedliche Signal- und Adaptorproteine, die der intrazellulären Signalweiterleitung dienen. Infolgedessen werden u.a. das G-Protein Ras, die MAPK-Signalkaskade sowie die PI3K aktiviert. Die Aktivierung des MAPK-Signalweges durch den EGF-R resultiert in einer vermehrten Zellproliferation, Differenzierung, Hemmung der Apoptose sowie Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren, z.B. c-myc, ETS1, ETS2,

AP-1, wodurch die Transkription vielfältiger Zielgene beeinflusst wird. Dabei handelt es sich um Gene, deren Proteine den Zellzyklus beeinflussen, z.B. Cyclin D1. Das G-Protein Ras vermittelt nicht nur die Aktivierung von der MAPK, sondern auch der PI3K, die die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) katalysiert. Ein bedeutendes PI3K-Substrat ist PKB/Akt, eine zelluläre Serin/Threonin-Proteinkinase, die zum einem, einen Proliferations-aktivierenden, zum anderen, einen Apoptose-inhibierenden Signaltransduktionsweg kontrollieren kann. Die Tyrosinreste der zytoplasmatischen Domäne des EGF-R können im phosphorylierten Zustand u.a. mit Phospholipase C- γ (PLC- γ) interagieren, die PIP2 hydrolysiert und somit in die PI3K-Signalkaskade eingreift (Citri and Yarden 2006).

1.5.5. Die Interaktionen zwischen dem EGF-R und Integrinen

Inzwischen konnte demonstriert werden, dass die Signalwege des EGF-R und der Integrine sehr eng miteinander verbunden sind. Beide Oberflächenrezeptoren aktivieren sowohl gemeinsam als auch unabhängig voneinander Signalmoleküle, wodurch sie Proliferation, Differenzierung, Zellüberleben sowie Apoptose beeinflussen können. Eine physikalische Verknüpfung des EGF-R mit Integrinen ist durch intrazelluläre Adaptormoleküle, wie z.B. durch ILK, Particularly interesting new Cys-His protein (PINCH) und Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2 (Nck2), gegeben (Abb. 6). Die Verflechtung der Signalwege des EGF-R und der Integrine bedingt die Regulierung der Integrinaktivierung und der Signalweiterleitung während der Tumorprogression (Li et al. 1999b, Moro et al. 2002, 1998). Die komplexe Beziehung zwischen beiden Klassen der Moro et al. Zelloberflächenrezeptoren ist hinsichtlich der synergistischen Kooperation und Konvergenz ihrer Signalkaskaden noch immer nicht vollkommen verstanden (Jorissen et al. 2003). Über eine Integrin-induzierte Regulierung der Expression und Aktivität des EGF-R ist nur wenig bekannt. Einerseits können physikalische Verknüpfungen der EGF-R-Signalkaskade mit denen der Integrine biologische Prozesse, z.B. Zellüberleben, Proliferation und Migration, extrazellulärer in Abwesenheit Liganden auslösen. Andererseits ist die sogar Signalweiterleitung der Integrine in Zusammenarbeit mit RTK deutlich effizienter und sogar essentiell für die Signalübermittlung der RTK, um transkriptionelle Ereignisse sowie den Zellzyklus zu beeinflussen. Die Dysregulierung der Integrin-RTK-Interaktionen fördert bestimmte Entwicklungsvorgänge sowie eine Reihe pathologischer Ereignisse (Cabodi et al. 2004).



Abb. 6. Physikalische Verknüpfung des EGF-R mit Integrinen. Die beiden integralen Zelloberflächenrezeptoren, EGF-R und Integrine, sind an fokalen Anhaftungspunkten ko-lokalisiert. Durch Verknüpfung ihrer Signalwege potenzieren sie verschiedene Signale und üben einen synergistischen Effekt auf die intrazelluläre Signalweiterleitung aus. Nach Liganden-Bindung wird der EGF-R autophosphoryliert und ist anschließend selbst in der Lage, andere endogene Signalproteine zu phosphorylieren. Durch Verknüpfung mit den zytoplasmatischen β-Integrin-Untereinheiten wird eine Auto- und Transphosphorylierung der RTK sogar in Abwesenheit extrazellulärer Liganden ermöglicht. Dabei nehmen die Adaptormoleküle ILK, PINCH und Nck2 eine zentrale Stellung in der Verbindung der EGF-R- und Integrin-Signalkaskaden ein (verändert nach Brakebusch and Fässler 2003).

Neben dem EGF-R wurde in der vorliegenden Arbeit die ILK als differentiell reguliertes Gen in Abhängigkeit von der Expression des Integrins avß3 in cDNA *Expression Microarray*-Analysen identifiziert.

1.6. Die Integrin-linked Kinase (ILK)

Die ILK stellt ein entscheidendes Adaptormolekül hinsichtlich der physikalischen Verknüpfung der EGF-R- und Integrin-Signalwege dar, dass unter der Vielzahl der intrazellulären Proteine, die im direkten Kontakt mit den intrazellulären Domänen der Integrine stehen und dadurch unterschiedliche Signalwege regulieren können, von besonderer Bedeutung. Die 59 kDa Serin/Threonin-Proteinkinase ist mit den zytoplasmatischen Domänen der ß1-, ß2- und ß3-Integrin-Subtypen assoziiert und ermöglicht so eine Integrin-vermittelte

Signaltransduktion. Die ILK ist ein Bestandteil der fokalen Anhaftungsstellen, an denen Zellen in direkten Kontakt mit der EZM treten und dadurch eine bidirektionale Signalübertragung zwischen EZM und dem intrazellulären Netzwerk erleichtern. Die ILK wurde vor 10 Jahren zuerst in einem *Two-hybrid* System in Hefe als Integrin-bindendes Protein identifiziert. Anhand von Ko-Immunopräzipitationsanalysen konnte die Interaktion mit den intrazellulären Domänen der ß-Integrin-Untereinheiten bestätigt werden (Hannigan et al. 1996). Durch Mutationsanalysen der hoch konservierten Threoninreste der zytoplasmatischen Domänen der ß1- und ß3-Integrin-Subtypen wurde die Spezifität der Signalübermittlung zwischen ILK und den ß-Integrin-Untereinheiten nachgewiesen (Wennerberg et al. 1998). Die intrazelluläre Kinase weist eine niedrige basale Aktivität auf und ist in Geweben der Säugetiere zu finden, wobei Herz- und Skelettmuskeln die höchsten Expressionsraten aufweisen. Eine erhöhte Kinaseaktivität konnte in Krebszellen detektiert werden (Dedhar 2000, Persad et al. 2000).

1.6.1. Die Funktionen der ILK

Im Zusammenspiel mit den ß1-, ß2- und ß3-Integrin-Subtypen reguliert die ILK die Integrinvermittelte Zelladhäsion, die Expression von E-Cadherin sowie das perizelluläre Fibronektin Matrix *Assembly* (Dedhar 2000, Wu et al. 1998). Die Proteinkinase kontrolliert eine Vielzahl ihr nachgeschalteter Signalmoleküle und wirkt sich entscheidend auf Prozesse der Apoptose, Angiogenese, Invasion, Metastasierung und Proliferation aus, die im Krebsgeschehen von Bedeutung sind. ILK fungiert als Effektormolekül im PI3K-Signalweg und reguliert die Aktivitäten der PKB/Akt positiv und die der Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) negativ (Troussard et al. 1999).

Eine erhöhte ILK-Aktivität in Tumorzellen steht mit dem Mangel des Tumorsuppressorgens PTEN im Zusammenhang. In 60 % aller soliden Tumore ist PTEN inaktiviert, was zur verstärkten Phosphorylierung von Thr (Threonin)-308 und Ser (Serin)-473 der PKB/Akt führt und somit deren konstitutive Aktivierung hervorruft. In PTEN-defekten Zellen kann eine Inhibierung der ILK die PKB/Akt-Phosphorylierung unterdrücken (Leung-Hagesteijn et al. 2001, Persad et al. 2000, Persad et al. 2001). Eine erhöhte PKB/Akt-Aktivität steht ebenfalls im Zusammenhang mit Karzinomen der Brust, Prostata und Ovarien (Sun et al. 2001). Deshalb stellt ILK eine Zielstruktur der Krebstherapie in PTEN-defekten Tumorerkrankungen dar (Yoganathan et al. 2002, Yoganathan et al. 2000). Genomische Veränderungen bedingen ebenfalls die Dysregulierung der ILK. So ist ein allelischer Verlust (*Loss of heterozygosity*,

LOH) auf Chromosom 11 stark mit der Tumorgenese assoziiert (Janji et al. 1999). Die ILK-Expression steigt mit Tumorgrad und Progression von Prostatakrebs an und korreliert umgekehrt mit der Überlebensrate der Patienten. Sie wird daher als Prognosefaktor für das Therapieansprechen verwendet (Graff et al. 2001).

Eine Überexprimierung oder konstitutive Aktivierung der ILK führt zu pathologischen Veränderungen, die in einer malignen Ausbreitung der Krebserkrankung, z.B. in Brust, Prostata, Gehirn und Darm, sowie präkanzerogenen Stadien resultieren. Dadurch werden ein vermehrtes Zellwachstum, die Progression durch den Zellzyklus sowie eine konstitutiv erhöhte Expression von Cyclinen hervorgerufen (Radeva et al. 1997). Die anomale ILK-Aktivität in epithelialen Zellen unterdrückt die Anoikis, eine Sonderform der Apoptose aufgrund des Verlustes der Zelladhäsion, und fördert so die Tumorgenese und die Tumorinvasivität (Attwell et al. 2000, Dedhar 2000, Wu et al. 1998). Des Weiteren führt die ILK-Überexpression in Epithelzellen zur Tumorentstehung in Nacktmäusen und geht mit der Bösartigkeit der Tumorerkrankung einher. Darm- und Brustepithelzellen, die ILK überexprimieren, entwickeln einen hoch invasiven Phänotyp, der schließlich zur Tumorbildung führt und bezeichnend für die protoonkogene Wirkung der ILK ist (Wu et al. 1998, Yoganathan et al. 2002).

Überdies wird die Transkription der MMP-9 durch ILK reguliert und verursacht einen invasiven Phänotyp. Eine erhöhte MMP-9-Expression, die durch die GSK-3-abhängige Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 ausgelöst wird, lässt sich mit der Rolle der ILK hinsichtlich Invasion von Tumorzellen und Angiogenese in Einklang bringen (Troussard et al. 2000).

Deshalb wurden verschiedene selektive ILK-Inhibitoren entwickelt und hinsichtlich ihrer Wirksamkeit in verschiedenen Zell- und Tiermodellen ausgetestet. So kann das invasive Verhalten von humanen Gehirntumorzellen unter Einwirkung der ILK-Inhibitoren signifikant und dosisabhängig reduziert werden (Persad et al. 2001, Troussard et al. 2000). Ebenfalls dämmen ILK-Inhibitoren im Xenograft-Mausmodell sowie in SCID-Mäusen das Tumorwachstum von Darmkrebszellen ein, da sie die Phosphorylierung von PKB/Akt und GSK-3 verhindern und die E-Cadherin Expression erhöhen (Tan et al. 2001).

1.6.2. Die Rolle der ILK im humanen Ovarialkarzinom

Um den Zusammenhang zwischen ILK-Expression und Tumorgrad beim Ovarialkarzinom zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen von Borderline-Tumoren sowie *low*

grade- mit high grade-Ovarialtumoren miteinander verglichen. Hierbei konnte eine signifikant erhöhte ILK-Expression in high grade-Tumoren detektiert werden. Hingegen zeigten die meisten *low grade*-Tumore eine schwache bis moderate ILK-Expression. Darüber hinaus konnte ein erhöhter ILK-Gehalt im Aszites von Patienten mit Ovarialkarzinom festgestellt werden (Ahmed et al. 2003). Um die Diagnostik des Ovarialkarzinoms besonders im frühen Stadium zu verbessern, werden derzeit neue Biomarker, z.B. MMP-9, hk5, hK8 getestet. Die 5-Jahre-Überlebensrate der Patientinnen mit einem Tumor im frühen Stadium beträgt bis zu 90 %, aber nur 40 % der Patientinnen im fortgeschrittenen Tumorstadium überleben. Trotz beträchtlicher Anstrengung, den Tumor sehr frühzeitig zu erfassen, erhalten gegenwärtig 75 % der Frauen die Krebsdiagnose erst im fortgeschrittenen Stadium. Momentan ist CA 125 der am besten charakterisierte Serummarker hinsichtlich des fortgeschrittenen Stadiums des Ovarialkarzinoms, ist aber zur Früherkennung von Ovarialkarzinomen ungeeignet.

Zur Detektion von Ovarialtumoren im Frühstadium wird gegenwärtig zellfreie ILK, die im Serum von Patientinnen mit Ovarialtumoren vorhanden ist, als möglicher Serummarker diskutiert. Zellfreie und immunoreaktive ILK ist im Serum von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom signifikant erhöht und im peritonealen Fluid nachweisbar. Nach chemotherapeutischer Behandlung kann die ILK-Expression deutlich verringert werden. Überdies korreliert die zirkulierende ILK mit den CA 125-Werten vor und nach Chemotherapie und kann daher als ein möglicher neuer Biomarker für das *Screening* und *Monitoring* des Therapieansprechens beim Ovarialkarzinom eingesetzt werden. Außerdem ist zellfreie ILK zur Unterscheidung zwischen gutartigen und Borderline-Tumoren geeignet besser als CA 125 (Ahmed et al. 2004).

1.6.3. Die Struktur des ILK-Proteins

Die ILK umfasst drei strukturell und funktionell verschiedene Domänen (Abb. 7). Am N-Terminus befinden sich vier *ankyrin repeats* (ANK), die Protein-Protein-Interaktionen zwischen ILK und Integrinen mit anderen Signalwegen oder zytoskelettalen Komponenten gewährleisten. Daran anschließend ist eine *Pleckstrin homology* (PH)-ähnliche Domäne lokalisiert, die an der Kontrolle der endogenen Kinaseaktivität beteiligt ist, da sich hier eine PIP3-Bindungsstelle befindet. Die C-terminale Domäne ist stark homolog zu katalytischen Domänen anderer Proteinkinasen und enthält Bindungsstellen der zytoplasmatischen Domänen der ß1- und ß3-Integrin-Subtypen (Hannigan et al. 1996). Die ILK ist evolutionär betrachtet hoch konserviert und ihre Homologe wurden im Menschen, in der Maus und Ratte, in Drosophila sowie in *C. elegans* nachgewiesen (Hannigan et al. 1997). Außerdem konnten in den letzten Jahren mehrere Isoformen der ILK (ILK-1, ILK-2) identifiziert werden (Chung et al. 1996, Janji et al. 2000, Xie et al. 1998).



Abb. 7. Die Primärstruktur der ILK. Die ILK ist aus drei verschiedenen funktionellen Domänen aufgebaut. Vier N-terminale ankyrin repeats (blau) sowie die C-terminale katalytische Domäne begrenzen die pleckstrin homology (PH)-ähnliche Domäne (gelb), die die Bindungsmotive für Phosphatidylinositol-Lipide enthält. Alle drei Domänen sind zwischen Mensch, Maus, Drosophila sowie C. elegans hoch konserviert. Die für die PIP3-Bindung erforderlichen konservierten aa sind ebenfalls markiert (verändert nach Persad and Dedhar 2003).

1.6.4. Die genomische Struktur und der Promotor des humanen ILK Gens

Das humane *ILK-1* Gen ist am distalen Ende auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 im Abschnitt 11p15.5 - p15.4 lokalisiert und umfasst 9 kb (Hannigan et al. 1997, Hannigan et al. 1996). Es besteht aus 13 Exons, von denen das letzte Exon die 3'UTR (*untranslated region*) enthält. Der transkriptionelle Initiationspunkt befindet sich 138 bp oberhalb des ersten Exons. Der ILK-Promotor weist typische Merkmale eines *housekeeping gene*-Promotors auf: einen hohen GC-Gehalt, Vorhandensein von *CpG-islands*, Mangel an TATA- und CAAT-Boxen und mehrere transkriptionelle Startpunkte. Darüber hinaus besitzt der ILK-Promotor zahlreiche Bindungsstellen für *cis*-aktivierende Transkriptionsfaktoren, z.B. Sp1 und NF- κ B (Melchior et al. 2002).

1.6.5. Die Aktivierung und Signaltransduktionskaskaden der ILK

Die ILK stellt eine physikalische Verknüpfung der Integrin- und RTK-vermittelten Signalkaskaden her (Abb. 8), indem sie an zytoplasmatische Domänen der ß1- und ß3- Integrin-Subtypen bindet und mittels Adaptormolekülen, wie PINCH und Nck2, über ihre carboxyterminale Domäne mit RTK, z.B. EGF-R oder PDGF-R, interagiert (Hehlgans et al. 2007). Als Folge der ILK-Aktivierung durch Integrine wird ein Multiproteinkomplex gebildet (Persad and Dedhar 2003). Daran sind N-terminal die Adaptorproteine PINCH und *ILK-associated phosphatase* (ILK-AP) beteiligt (Leung-Hagesteijn et al. 2001, Li et al. 1999a, Tu et al. 1999); C-terminal spielen zytoskelettale Komponenten, wie *calponin homology domain-containing ILK-binding protein* (CH-ILKBP) und Paxillin, eine Rolle (Brown et al. 1996, Nikolopoulos and Turner 2001, Tu et al. 1999, Yamaji et al. 2001). Paxillin verbindet die ILK mit der FAK-Signalkaskade, wodurch die Integrin-induzierte Zelladhäsion und -migration reguliert werden kann (Hanks and Polte 1997, Sieg et al. 2000).

Als wichtiger Effektor des PI3K-Signalweges, erfordert die maximale ILK-Aktivierung sowohl die Phosphorylierung von Ser-473 als auch Thr-308 von PKB und wirkt sich auf die Homeostase der Zelle, Zellüberleben, Apoptose, Proliferation und Stoffwechsel aus. Der intrazelluläre Rezeptor PI3K ist ILK nachgeschaltet und wird durch verschiedene Stimuli, z.B. Wachstumsfaktoren, beeinflusst (Friedrich et al. 2004). Die Aktivierung der PKB/Akt durch RTK erfolgt PI3K-abhängig in mehreren Schritten und erfordert die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3. Die Phosphatase PTEN wirkt diesem Mechanismus entgegen, indem sie PIP3 inaktiviert.

Auftretende Mutationen in einzelnen Abschnitten der PKB/Akt-Aktivierung können die Ausbildung von Tumoren verursachen. Das Tumorsuppressorgen PTEN kann durch Mutationen des ersten Allels, gefolgt von einer Deletion des zweiten Allels, inaktiviert und als allelischer Verlust detektiert werden. Tumorzellen mit einem Verlust der Heterozygotie in PTEN und einer daraus resultierenden erhöhten PKB-Aktivität sind proliferative Tumore und weisen häufig Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika auf. Die durch Mutationen verursachte Hemmung von PTEN führt zur verstärkten ILK-Expression, die die Dysregulierung des Zellzyklus sowie die Apoptose einleiten (Persad et al. 2000).

Eine Überexpression der ILK resultiert in der Translokation von β-Catenin in den Zellkern, wo ein Komplex mit Transkriptionsfaktoren, z.B. E2F, NF-κB, AP-1 und Sp-1, gebildet und die Transkription von Promotoren verstärkt werden kann (Novak et al. 1998, Troussard et al. 1999). Hingegen resultiert die Inhibierung der ILK in einer verminderten Cyclin D1Expression sowie reduzierten ß-Catenin-Expression. Außerdem bewirkt die Hemmung der ILK eine verringerte Phosphorylierung der GSK-3, was den Abbau von ß-Catenin beschleunigt (Tan et al. 2001).



Abb. 8. Die Aktivierung und Signaltransduktionskaskaden der ILK. Die Kinaseaktivität ist PI3Kabhängig und erfordert die Bindung von PIP3. In Tumorzellen phosphoryliert ILK die PKB/Akt an Ser-473 und inhibiert gleichzeitig GSK-3ß durch Phosphoylierung von Ser-9. Die ILK-Aktivität wird negativ durch PTEN und ILK-AP reguliert. Die ILK beeinflusst Zellüberleben, Proliferation, Differenzierung und Apoptose anhand der Vernetzung der Signalwege, die durch RTK, z.B. EGF-R sowie Integrine vermittelt werden. Die ILK ist mit den ß-Integrin-Untereinheiten physikalisch verknüpft. Über die Adaptorproteine PINCH und Nck2 verbindet ILK die Integrine mit RTK, die den MAPK-Signalweg induzieren; über Parvin die EZM mit dem Zytoskelett. Paxillin verbindet die ILK mit der FAK-Signalkaskade, wodurch die Zellmigration reguliert werden kann (verändert nach Hehlgans et al. 2007).

2. ZIELSETZUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die differentielle Genregulierung in humanen Ovarialkarzinomzellen in Abhängigkeit des Integrins avß3 analysiert. Hierzu wurden die Expression und Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R) sowie die Expression der Integrin-linked Kinase (ILK) in Vektor- und Integrin avß3transfizierten OV-MZ-6-Zellen auf der Protein- und Promotor-Ebene untersucht. Zum anderen wurden aufgrund der tumorbiologischen Relevanz des Integrins avß3 RGD-basierte Integrin-Antagonisten hinsichtlich ihrer Bindungsselektivität und -spezifität in in vitro-Zelladhäsionstests sowie in einem zellfreien Liganden-Bindungstest, an gereinigten Membran-inkorporierten Integrinen mittels Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPS) charakterisiert. Die Integrin/Ligand-Interaktionen wurden mit Hilfe der Erweiterung, der (SPFS), plasmonenverstärkten Fluoreszenzspektroskopie die gemessen, um Bindungseigenschaften kleiner zyklischer mono- und oligomerer RGD-basierter Peptide an Integrin-funktionalisierten Phospholipiddoppelschichten zu bestimmen.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Werden die Expression und Aktivität des EGF-R sowie die Expression der ILK als Funktion des Integrins αvβ3 induziert?
- Werden der EGF-R und die ILK in Abhängigkeit des Integrins αvβ3 transkriptionell reguliert?
- Welche Effekte haben Promotormutanten auf die Aktivität des EGF-R- bzw. ILK-Promotors in Abhängigkeit von der Integrin αvβ3-Expressionshöhe?
- Wie selektiv sind Bindungen spezifischer Integrin-Antagonisten an Membraninkorporierte Integrine, die mittels SPS/SPFS gemessen werden können?
- Welchen Einfluss üben synthetische RGD-basierte Integrin-Antagonisten auf das Adhäsionsverhalten humaner Ovarialkarzinomzellen *in vitro* aus?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Reagenzien und Materialien

3.1.1. Materialien für zellbiologische und proteinbiochemische Methoden

Alle Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Schubert & Weiss Laborbedarf, München verwendet. Alle Chemikalien wurden, sofern nicht im Folgenden aufgelistet, in p.a. Qualität von der Firma Merck, Darmstadt benutzt.

Zellkultur, Zelllyse

- DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), FCS (fötales Kälberserum), HEPES (2-[4-(Hydroxyethyl)-1-Piperazin]ethansulfonsäure), Geneticin (G418), Gentamycin, PBS (*phosphate buffered solution*) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Arginin, Asparagin, Triton X-100, p-Nitrophenol-N-Acetyl-B-D-Glucosamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Protease Inhibitor Cocktail (*Complete*, EDTA-frei) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

Transfektion, Analyse der Promotoraktivität

- Lipofektin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- MATra-Reagenz, Magnetplatte (IBA BioTAGnology, St. Louis, MO, USA)
- Dual-Luciferase Reportergen-Assay System, *Renilla*-Luziferase-Reportergen-Vektor pRL-SV40 (Promega, Madison, WI, USA)
- *Epidermal growth factor* (EGF) (Chemicon, Temecula, CA, USA)
- Zellkulturplatten mit 6 bzw. 24 Vertiefungen, Polystyrol-Röhrchen (runder Boden, 5ml, mit Deckel) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)

Proteinbestimmung, SDS-Gelelektrophorese, Western Blot-Analyse

- Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Ammoniumpersulfat (APS) (Amresco, Solon, USA)
- Benchmark Pre-Stained Proteinmarker, SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard, Magic Mark XP Western Protein Standard, NuPAGE Novex 3 - 8 % Tris-Acetat-Gele, NuPAGE Novex 4 - 12 % Bis-Tris-Gele (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Tween-20, Ponceau S Staining Solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V (MP Biomedicals Corporate, Irvine, CA, USA)
- Optitran Supported Nitrozellulose Membran (Porengröße 0,45 μm), Gel Blotting Papier (Schleicher & Schuell Bioscience, Keene, NH, USA)
- ECL Western Blotting Detection Reagent, Hyperfilm 5 x 7 inches (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)

- Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrat, CL-XPosure Film 5 x 7 inches, BCA Protein Assay Kit inklusive BSA (Pierce, Rockford, IL, USA)
- Nunc-Immuno-F96 Maxisorp (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland)

Durchflusszytometrie

- FACS Flow Sheath Fluid, Polystyrol-Röhrchen (runder Boden, 5ml), (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Polystyrol-Röhrchen (konischer Boden, 4,5ml) (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)

Markierung von EZM-Proteinen und synthetischen Integrin-Liganden

- Cy5 mono-reactive Dye (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)
- FluoReporter Fluoresceinisothiocyanat (FITC) Protein Labeling Kit, Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Biotin-X-NHS (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- NICK Spin Columns (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Schweden)

Mikrotiter-Liganden-Bindungstests

- TMB Microwell Peroxidase Substrate System (KPL, Gaithersburg, MD, USA)
- OptiPlate-96F, ProxiPlate-96F (Perkin Elmer, Bosten, MA, USA)
- Polystyrol-Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
- Costar Universal-BIND (Corning Incorporated, Corning, NY, USA)

Integrine

- humanes Integrin αvβ3, humanes Integrin αvβ5 (Chemicon, Temecula, CA, USA)
- Plättchenintegrin αIIbß3 (Prof. Dr. M. Tanaka, Institut für Physikalische Chemie, Universität Heidelberg); (Kouns et al. 1992)

EZM-Proteine

- Kollagen Typ I (Kol I), Fibrinogen (FG), Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Fibronektin (FN) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Vitronektin (VN) (Promega, Madison, WI, USA)

Antikörper

- polyklonaler Antikörper (pAk) Ziege-anti-human β-Aktin IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)
- Ziege IgG HRP (*horseradish peroxidase*)-konjugiert (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- monoklonaler Antikörper (mAk) Maus-anti-human EGF-R IgG, mAk Maus-antihuman p-EGF-R IgG (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)
- mAk Maus-anti-human αvβ3-Integrin IgG Klon LM 609, mAk Maus-anti-human αvβ5-Integrin IgG Klon P1F6 (Chemicon, Temecula, CA, USA)
- mAk Maus-anti-human αIIβ-Integrin IgG Klon P2 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland)

- mAk Maus IgG HRP-konjugiert, mAk Kaninchen IgG HRP-konjugiert, pAk Ziegeanti-Maus IgG Alexa488-konjugiert (JacksonImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA)
- pAk Kaninchen-anti-human ILK IgG, mAk Maus-anti-human ILK IgG Klon 65.1.9 (Upstate, Lake Placid, NY, USA)
- pAk Kaninchen-anti-Maus IgG Alexa488-konjugiert (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

3.1.2. Geräte und Software für zellbiologische und proteinbiochemische Methoden

Zellkultur, Transfektion

- Sicherheitswerkbank Hera Safe (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Inkubator Heraeus Function Line Serie 7000, CO₂-Inkubator HERA Cell (Kendro, Langenselbold, Deutschland)
- Mikroskop Axiovert 25, Zeiss Axiovert 35 Konfokales Laser Scanning Mikroskop mit Laserscan-Detektionseinheit von Leica (Zeiss, Jena, Deutschland)
- Lumat LB 9501-Luminometer (Berthold Technologies Bad Wildbad, Deutschland)

Proteinbestimmung, SDS-Gelelektrophorese, Western Blot-Analyse

- Mini-PROTEAN 3 Cell, Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, GelAir Dryer Model 583 (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Semi Dry Blot Apparatur Fast Blot (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- XCell SureLock Mini-Cell mit XCell II Blot Module (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Thermomixer 5436, Zentrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Blue Power 500, 3000 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Wallac 1420 VICTOR 3 multilabel counter (Perkin Elmer, Boston, MA, USA)
- SLT Spectra Elisa Reader, Software easy WIN fitting E 5.0 a (SLT, Crailsheim, Deutschland)
- Software Scion Image Beta 4.0.2 (NIH Image by Wayne Rasband, USA)

Durchflusszytometrie

• FACS Calibur Sort Cytofluorometer mit Software CellQuest (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)

3.1.3. Materialien und Geräte für Oberflächenplasmonenspektroskopie

Reagenzien und Materialien

- Lamininpeptid P19 (CSRARKQAASIKVAVSADR), N-Ethyl-N-Dimethylaminopropyl-Carbodiimid (EDC), N-Hydroxy-Succinimid (NHS), Phosphatidylcholin (PC, aus Sojabohnen), Dimyristoyl-Phosphatidyl-Ethanolamin (DMPE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Triton X-100 (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Gold (99,99 %) (Unaxis, München, Deutschland)
- Immersionsöl (Cargille Laboratories, Cedar Grove, NJ, USA)
- Glasküvette (MPI für Polymerforschung, Mainz, Deutschland)
- Hellmanex-Reinigungslösung (Hellma, Müllheim, Deutschland)

Geräte und Software

- LaSFN9-Glasträger, Prisma, Glan-Thompson Polarisatoren (Berliner Glas, Berlin, Deutschland)
- Helium-Neon Laser (JDS Uniphase Corp., San Jose, CA, USA)
- Zweikreis-Goniometer (Huber Diffraktionstechnik GmbH& Co KG, Rimsting, Deutschland
- Photomultiplier (Hamamatsu, Perkin Elmer, Wiesbaden, Deutschland)
- Vesikelextruder LiposoFast (Avestin, Ottawa, Kanada)
- Kanülen (Omnifix, Braun, Melsungen, Deutschland)
- Aufdampfanlage (Pfeiffer Vakuum C250, Wessel, Deutschland)
- Software WasPlas 2.19, WaspView 3.34, Origin 6.1

3.1.4. Materialien und Geräte für molekularbiologische Methoden

Reagenzien und Materialien

- Quick Change *site-directed* Mutagenese kit, PfuTurbo DNA Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
- NucleoSpin Plasmid kit für Plasmid-DNA-Reinigung, NucleoBond AX-DNA zur DNA-Isolierung (Macherey-Nagel Inc., Easton, PA, USA)
- QIAGEN Large-Construct kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland)
- peqGOLG Agarose, peqGOLD 100 bp-DNA-Marker und 1 kb-DNA-Marker, Restriktionsendonukleasen (peqlab Biotechlologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
- BenchTop 100bp DNA-Marker (Promega, Madison, WI, USA)
- Dpn I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- Bactotryptone, Hefeextrakt, Agar, Petrischalne ten-twenty-nine (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Ampicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Polystyrol-Röhrchen (runder Boden, 14ml, mit Belüftungsstopfen) (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)

Geräte und Software

- Mini Cycler PTC-150HB (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA)
- Agarose-Gelapparatur GNA-100 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
- Blue Power 500 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Thermomixer 5436, BioPhotometer, Thermodrucker DPU 414 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Beckmann Avanti 30 Zentrifuge (Beckmann Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
- Heraeus Biofuge fresco (Kendro, Langenselbold, Deutschland)
- Inkubationsschüttelmaschine RFI-100 (INFORS AG, Bottmingen, Schweiz)
- Savant Speed Vac SVC 100 (Thermo Quest, Egelsbach, Deutschland)
- Biometra TI 1 UV-Schirm, UVsolo (Biometra GmbH i.L., Göttingen, Deutschland)
3.2. Zellbiologische Methoden

3.2.1. Zelllinien

Die humane Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 wurde ursprünglich aus einem fortgeschrittenen (FIGO IV) serös-papillärem Zystadenokarzinom einer 70jährigen Patientin etabliert und uns zu Untersuchungszwecken zur Verfügung gestellt (Möbus et al. 1992). Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurde die subklonierte Variante OV-MZ-6 #8 eingesetzt (Fischer et al. 1998). Als Grundlage der vorliegenden Arbeit wurden Vektor- und Integrin αvβ3-überexprimierende OV-MZ-6-Zellen verwendet, die in der Arbeitsgruppe bereits hergestellt wurden und vorhanden waren (Hapke 2000).

3.2.2. Zellkultur humaner Ovarialkarzinomzellen

Zur Kultivierung der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 wurde ein Komplettmedium und für die Vektor- und Integrin avß3-transfizierten OV-MZ-6-Zellen ein Selektionsmedium durch die Zugabe von Geneticin (G418), da die stabil transfizierten Zellen ein Resistenzgen für dieses Antibiotikum enthalten, benutzt. Adhärente Zellen wurden bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ für 3 - 4 Tage in Abhängigkeit von der Zelllinie im Inkubator kultiviert und bei einer Zellkonfluenz von ca. 80 % mit einer 0,05 %igen (v/v) EDTA/PBS-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Dazu wurde die PBS/EDTA-Lösung für 5 - 10 min. bei 37 °C zugegeben bis sich die nun runden Zellen vom Boden der Zellkulturflasche lösten. Danach wurde mit PBS gewaschen und die Zellsuspension für 3 min. bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Werden die Zellen nicht mehr in Kultur gebraucht, so besteht die Möglichkeit, diese zur Langzeitlagerung einzufrieren. Dafür wurde ein Pellet aus ca. 2 - 5 x 10^6 Zellen in 0,5 - 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert, sofort auf Eis gestellt, anschließend bei -80 °C über Nacht gelagert und in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen der Zellpellets wurden diese auf Eis gestellt und nach einigen Minuten in 10 ml kaltem Medium aufgenommen, zentrifugiert, in 37 °C warmem Medium resuspendiert und in einer sterilen Zellkulturflasche kultiviert. Nach ca. 4 - 5 Std. erfolgte ein Mediumwechsel.

GAM (growth arrest medium):	500 ml 10 mM 0,550 mM 0,272 mM 20 μg/ml	DMEM HEPES Arginin Asparagin Gentamycin
Komplettmedium:	GAM + 10 % (v/v)	FCS
Selektionsmedium:	Komplettmediu + 10 mg/ml	ım Geneticin
Einfriermedium:	90 % (v/v) 10 % (v/v)	FCS DMSO

3.2.3. Beschichtung von Zellkulturgefäßen mit EZM-Proteinen

Zum Beschichten von Zellkulturgefäßen wurden verschiedene EZM-Proteine in PBS resuspendiert. Beschichtungen erfolgten für 2 Std. bei RT oder bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellkulturgefäße mit sterilem PBS gewaschen und vor der Zellaussaat freie Bindungsstellen mit 2 % (w/v) BSA/PBS in PBS für 1 - 2 Std. bei RT blockiert.

VN	5 μg/ml
FN	5 µg/ml
Kol I	$10 \mu g/ml$
Poly-L-Lysin	0,01 % (v/v)

3.2.4. Zelllyse humaner Ovarialkarzinomzellen

Vektor- und Integrin $\alpha v\beta$ 3-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden auf EZM-beschichteten und mit 2 % (w/v) BSA/PBS geblockten Zellkulturplatten kultiviert, nach festgelegten Zeitpunkten (0,5; 1; 2; 4; 9; 24 Std.) geerntet, auf Eis in 150 µl Puffer lysiert und für 20 min. bei 21000 x g bei 4 °C zentrifugiert.

50 mM	HEPES, pH 7,5
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
10 % (v/v)	Glycerol
1 % (v/v)	Triton X-100
10 mM	Sodiumpyrophosphat
0,1 % (w/v)	Protease Inhibitor Cocktail
	50 mM 150 mM 1 mM 10 % (v/v) 1 % (v/v) 10 mM 0,1 % (w/v)

3.2.5. Nachweis der Integrin αvβ3-Expression in stabilen humanen Ovarialkarzinomzelltransfektanten mittels Immuncytochemie (ICC) und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

den Einfluss des Integrins avß3 auf die Genexpression in der humanen Um Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 zu charakterisieren, wurde das Integrin avß3 überexprimiert. Dazu wurden stabile Transfektionen der Wildtypzelllinie OV-MZ-6 mit Hilfe des Transfektionsreagenz Lipofektin durchgeführt. Wildtypzellen wurden dafür am Vortag entsprechend kultiviert bis eine Zellkonfluenz von 70 % erreicht wurde. Nach einem Waschschritt mit PBS wurden jeweils 5 µg DNA mit 400 µl GAM verdünnt, mit jeweils 15 µl Lipofectin in 400 µl GAM vermischt und auf die gewaschenen Zellen gegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte nach einer Inkubationszeit von 6 Std. bei 37 °C. Transfizierte Zellen wurden in 10 cm-Petrischalen weiter kultiviert und nach 7 Tagen mit Geneticin (G418) in einer Konzentration von 1 µg/ml als Selektionsantibiotikum versetzt, um resistente Zellklone zu generieren. Überlebende Zellklone enthielten das Resistenzgen für das Gentamycinverwandte Aminoglykosid G418, das auf den erfolgreich transfizierten Plasmiden lokalisiert war. Um klonale Zelllinien zu erhalten, wurden einzelne Klone in Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen überführt und bei einer Zellkonfluenz von 70 % in Glasobjektträger mit mehreren kleinen Zellkammern (micro chamber slides) überführt, um die Höhe der Integrin avß3-Expression mittels ICC und CLSM zu bestimmen. Nach immuncytochemischer Anfärbung, unter Verwendung eines mAk Maus-anti-human avß3-Integrin und Detektion mittels eines sekundären Alexa488-konjugierten pAk Ziege-anti-Maus IgG konnten Zellklone mit unterschiedlich hoher Integrin avß3-Expression mittels CLSM selektiert werden. Als Kontrolle dienten OV-MZ-6-Zellen, die mit einem Leervektor transfiziert wurden und das Integrin avß3-Expressionsmuster der Wildtypzelllinie aufwiesen. Zellklone, die eine hohe Integrin avß3-Expression besaßen, wurden erneut auf 10 cm-Petrischalen vereinzelt. Um klonale Zelllinien zu generieren, wurde der Selektionsprozess viermal wiederholt. Die Etablierung der stabilen Transfektanten der OV-MZ-6-Zellen sowie deren Selektion mittels CLSM sind Bestandteile der Dissertation von Sandra Hapke und bereits publiziert (Hapke 2000, Hapke et al. 2001b, Hapke et al. 2003).

3.2.6. Nachweis der EGF-R- und ILK-Expression in humanen Ovarialkarzinomzellen mittels ICC und CLSM

Die Expression des EGF-R bzw. der ILK in humanen Ovarialkarzinomzellen konnte mittels Immunfluoreszenzfärbungen und Auswertung am CLSM analysiert werden. Vektor- und Integrin avß3-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden auf un- bzw. VN-beschichteten (5 µg/ml) Glasobjektträgern mit mehreren kleinen Zellkammern (micro chamber slides) kultiviert, mit 2 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) für 20 min. bei RT fixiert, einmal mit PBS gewaschen und mit 2 % (w/v) BSA/PBS für 1,5 Std. bei RT geblockt. Anschließend wurde die EGF-R-Expression mittels eines mAk in einer Konzentration von 5 µg/ml in 1 % (w/v) BSA/PBS für 2 Std. bei RT festgehalten. Die Expression der phosphorylierten (aktivierten) Form des EGF-R wurde mittels eines mAk in einer Konzentration von 5 μ g/ml in 1 % (w/v) BSA/PBS für 2 Std. bei RT bestimmt. Zum Nachweis der ILK-Expression wurde ein pAk in einer Konzentration von 2,3 µg/ml in 1 % (w/v) BSA/PBS für 2 Std. bei RT inkubiert. Nach einem Waschschritt mit PBS folgte jeweils ein sekundärer Alexa488-konjugierter pAk anti-Maus IgG in einer Konzentration von 1 µg/ml für 45 min. bei RT. Nach einem erneuten Waschvorgang mit PBS wurden die Glasobjektträger mit Deckgläsern versehen und die Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 488 nm mittels CLSM beurteilt. Die Autofluoreszenz Vektor- und Integrin avß3-transfizierter OV-MZ-6-Zellen wurde in Abwesenheit jeglicher Antikörper (Ak) gemessen. Eine Anfärbung nur mit dem sekundären Alexa488-konjugierten pAk anti-Maus IgG diente als Kontrolle. Die Fluoreszenzstärke wurde mit Hilfe einer entsprechenden CLSM-Software und durch eine look-up table glowOv/Un LUT, der die Farbintensitäten in Pseudofarben umwandelt, visualisiert. Ein schwaches Fluoreszenzsignal wurde durch eine rote Färbung wiedergegeben, eine mittlere Fluoreszenz entsprach einer Gelbfärbung und eine starke Fluoreszenzintensität wurde durch weiße Farben dargestellt.

3.2.7. Nachweis transienter Transfektionen in humanen Ovarialkarzinomzellen mittels dualer Luziferase-Reportergen-Assays

Um Veränderungen in der Genexpression in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 nachzuweisen, wurden Reportergen-Assays durchgeführt, bei denen der EGF-R- bzw. ILK-Promotor mit Reportergenen, die *Firefly*-Luziferasen kodieren, verknüpft sind und mittels Lumineszenz detektiert werden können. Die jeweiligen Reportergene sind in speziell konstruierten Plasmidvektoren eingebaut, der EGF-R-Promotor im pUV102-Vektor und der ILK-Promotor im pGL2-basic-Vektor. Nach transienten Transfektionen und Zelllyse wurde ein für die jeweilige Luziferase spezifisches Substrat zugegeben, wodurch die Photonenemission als Maß für die Luziferase aktiviert und damit das Ausmaß der Promotoraktivierung detektiert werden konnte. Anhand der Messung emittierter Lichtquanten konnte die Aktivität der Luziferase und somit die Aktivität des EGF-R- bzw. ILK-Promotors nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde der *Renilla*-Luziferase-Reportergen-Vektor pRL-SV40 zur Normalisierung der Transfektionseffizienz ko-transfiziert und mit Hilfe eines dualen *Firefly/Renilla*-Luziferase-Reportergen-Assays gemessen. Die detektierten Aktivitäten des EGF-R- bzw. ILK-Promotors konnten anhand des Quotienten aus den gemessenen Werten der *Firefly* und *Renilla*-Luziferase ausgedrückt werden.

Transiente Transfektionen Vektor- und Integrin avß3-transfizierter OV-MZ-6-Zellen mit EGF-R- bzw. ILK-Promotor-Reportergen-Konstrukten wurden entweder unter Verwendung von Lipofektin (Hapke et al. 2001a, Hapke et al. 2001b) oder magnetisch wirksamer Partikel auf einer Magnetplatte mittels Magnetotransfektion durchgeführt. Vektor- und Integrin avß3transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen 48 - 72 Std. bis zu einer Zellkonfluenz von 30 - 60 % in Komplett- bzw. Selektionsmedium kultiviert, mit PBS gewaschen und 500 µl GAM-Medium zugegeben. In Transfektionsröhrchen wurde 100 µl GAM-Medium vorgelegt, 5 µl Lipofektin zugegeben, gemischt und 45 min. bei RT inkubiert. Plasmid-DNA des EGF-R- bzw. ILK-Promotors wurde in einer Konzentration von 0,5 µg/Vertiefung in 100 µl GAM-Medium verdünnt, 50 ng/Vertiefung des Renilla-Luziferase-Reportergen-Vektors dazugegeben, gemischt und 15 min. bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das GAM-Medium der Zellkulturplatte durch 300 µl frisches GAM-Medium ersetzt. Anschließend wurde die DNA-Suspension mit der vorgelegten Lipofektin-Suspension vereinigt und in die entsprechenden Vertiefungen der Zellkulturplatten gegeben. Nach einer Inkubationszeit des Transfektionsansatzes von 5 - 6 Std. bei 37 °C wurde das GAM-Medium durch Komplett- bzw. Selektionsmedium ersetzt, die OV-MZ-6-Zellen für 24 - 48 Std. weiter kultiviert und in 120 - 150 µl 1x PLB-Puffer lysiert.

Zur Durchführung von Magnetotransfektionen wurden ebenfalls Vektor- und Integrin α v β 3transfizierte OV-MZ-6-Zellen in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen 48 - 72 Std. bis zu einer Zellkonfluenz von 30 - 60 % in Komplett- bzw. Selektionsmedium kultiviert, mit PBS gewaschen und 500 µl GAM-Medium zugegeben. Der Transfektionsansatz setzte sich aus 100 µl GAM-Medium, 0,55 µg/Vertiefung Magnetpartikel, 0,5 µg/Vertiefung Plasmid-DNA sowie 50 ng/Vertiefung *Renilla*-Luziferase-Reportergen-Vektor zusammen. Nach einer Inkubationszeit von 20 min. bei RT wurde die jeweilige DNA-Suspension in die entsprechenden Vertiefungen der Zellkulturplatten gegeben und auf einer Magnetplatte 15 min. bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß war kein Mediumwechsel erforderlich. Zur weiteren Kultivierung der OV-MZ-6-Zellen wurden 10 % (v/v) FCS zugegeben und nach 24 - 48 Std. in 120 - 150 μ l 1x PLB-Puffer lysiert.

3.2.8. Nachweis der Adhäsionskapazität humaner Ovarialkarzinomzellen mittels *in vitro* Zelladhäsionstests

Die adhäsiven Eigenschaften der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 unter Anwendung eines chromogenen Zelladhäsionstests waren bereits vor Beginn der vorgelegten Arbeit charakterisiert worden (Hapke et al. 2001a, Hapke et al. 2001b, Hapke et al. 2003). Die Adhäsion von OV-MZ-6-Zellen an das EZM-Protein VN wurde durch Interaktion mit dem Integrin avß3 ermöglicht. Die Ermittlung der Anzahl adhärenter Zellen erfolgte mittels eines chromogenen Testsystems durch Zugabe eines Hexoaminidase-Reagenz. Nur in lebenden Zellen setzt N-acetyl-B-D-Hexosaminidase in den Lysosomen das Substrat p-Nitrophenol-N-Acetyl-ß-D-Glucosamid um, indem es den Abbau von glykosylierten Zellbestandteilen katalysiert. Da dessen Aktivität sich proportional zur Zellzahl verhält, wurde durch Zugabe einer Stopp-Lösung eine proportional zur Zellmenge intensive Färbung sichtbar. Die Integrin $\alpha v\beta 3/VN$ -Interaktion wurde durch Integrin $\alpha v\beta 3$ -selektive Peptide aufgehoben und mittels *in* vitro Zell/EZM-Adhäsionstests nachgewiesen, die in der vorliegenden Arbeit mit einigen Modifikationen durchgeführt wurden. Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen wurden 2 Std. bei RT mit VN oder Kol I in einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS beschichtet. Nach 2 Waschschritten mit PBS wurden die Zellkulturplatten für 1 Std. bei RT mit 2 % (w/v) BSA in PBS geblockt und noch einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 2,5 x 10⁴ OV-MZ-6-Zellen zusammen mit verschiedenen synthetischen Integrin-Liganden in EZMbeschichteten Zellkulturplatten in Adhäsionsmedium inkubiert. Die Integrin avß3-selektiven mono- und multimeren RGD-Peptide sowie ein Integrin avß3-selektives RGD-Mimetikum sind mit Ahx-Spacern verknüpft und wurden in einer Konzentrationsreihe von 0,625 - 40 µM zugegeben. Als Negativkontrolle wurde ein nicht-Integrin-bindendes RAD-Peptid gemessen. Eine Verdünnungsreihe ausgehend von der verwendeten Zellzahl (2,5 x 10⁴; 2,0 x 10⁴; 1,5 x 10^4 ; 1,0 x 10^4 ; 0,5 x 10^4 ; 0,25 x 10^4 ; 0,125 x 10^4 ; 0,0625 x 10^4 ; 0,03125 x 10^4) diente zur Ermittlung der Anzahl adhärenter Zellen an VN. Nach einer Adhäsionszeit von 90 min. bei 37 °C konnten nicht-adhärente Zellen durch Waschen mit PBS eliminiert werden. Daraufhin wurde das chromogene Substrat p-Nitrophenol-N-Acetyl- β -D-Glucosamid zugegeben, um die Aktivität der N-Acetyl- β -D-Hexoaminidase zu bestimmen. Die Enzym-Substrat-Reaktion wurde nach 90 min. gestoppt und die OD₄₅₀ der Abbauprodukte als Maß für die adhärente Zellzahl gemessen (Hapke et al. 2001a, Hapke et al. 2001b, Hapke et al. 2003, Landegren 1984).

Adhäsionsmedium:	GAM-Medium 0,5 % (w/v) 20 mM	BSA HEPES
Hexoaminidase-Reagenz:	10 mM 100 mM 0,5 % (v/v)	p-Nitrophenol-N-Acetyl-ß-D-Glucosamid Sodiumcitrat, pH 5,0 Triton X-100
Stopp-Puffer:	0,2 M 5 mM	NaOH EDTA

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Quantifizierung der Proteinkonzentration

Konzentrationsbestimmungen von Proteinen erfolgten in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen mittels eines kommerziell erhältlichen BCA (Bicinchinonsäure)-Tests und wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Grundlage der Proteinbestimmung wurde die Eigenschaft der Proteine ausgenutzt, in alkalischen Lösungen mit zweiwertigen Kupferionen einen Komplex zu bilden (Biuret-Reaktion), wodurch zweiwertige Kupferionen zu einwertigen Kupferionen reduziert werden. Nach Zugabe von BCA bedingte die Reaktion mit einwertigen Kupferionen einen violetten Farbumschlag. Nach einer Inkubationszeit von 1 Std. bei 37 °C oder alternativ von 5 - 6 Std. bei RT konnte die Absorption des Farbkomplexes bei OD₅₆₀ im ELISA-Reader gemessen werden. Eine BSA-Standardreihe wurde in den Konzentrationen von 20 - 400 μ g/ml eingesetzt und diente als Eichgerade für die Konzentrationsbestimmung der Proteine.

3.3.2. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteingemische wurden entweder unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE in 10 %igen (w/v) diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen in einer Minigelapparatur aufgetrennt. Zuvor wurden gleiche Mengen an OV-MZ-6-Zellkulturextrakten mit 3 x Laemmli-Puffer versetzt (Laemmli 1970) und vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel entweder 5 - 10 min. bei 95 °C (reduzierend) oder 10 min. bei 37 °C (nicht-reduzierend) inkubiert. Nach Auftragen der denaturierten Proteine wurde eine Spannung von 90 V angelegt bis die Lauffront das 10 %ige Trenngel erreicht hatte. Danach wurde die Spannung auf 120 - 150 V erhöht, bis die entsprechenden Proteine nach ihrer Größe, die durch den Molekulargewichtsstandard angezeigt wurde, aufgetrennt waren.

nicht-reduzierender			
Probenauftragspuffer:	150 mM	Tris-HCl, pH 6,8	
	15 % (W/V) 45 % (W/V)	SDS Cluzorin	
	45 % (w/v) 0,01 % (w/v)	Bromphenolblau	
reduzierender			
Probenauftragspuffer:	nicht-reduzier + $17 \% (v/v)$	ender Probenauftragspuffer ß-Mercaptoethanol	
4 %iges Sammelgel:	0,5 M 10 % (w/v)	Tris-HCl, pH 6,8 SDS	2,5 ml 100 μl
	40% (v/v)	Acrylamid/Bisacrylamid	1 ml
	10 /0 (w/v)	TEMED	100 µ1
		H ₂ O bidest.	6,3 ml
10 %iges Trenngel:	1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8	5 ml
	10 % (w/v)	SDS	200 µl
	40%(v/v)	Acrylamid/Bisacrylamid	5 ml
	10 % (W/V)	AF5 TEMED	10 μl
		H_2O bidest.	9,6 ml
Elektrophoresepuffer:	1,6 M	Glycin	
	250 mM	Tris	
	1 %0 (W/V)	202	

3.3.3. Färbung der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine

Coomassiefärbung

Nach Elektrophorese wurden SDS-Gele für mindestens 1 Std. bei RT in einer Coomassie-Lösung inkubiert, mehrmals mit H₂O bidest. und dann mit 10 %iger Essigsäure gewaschen, bis der Gel-Hintergrund farblos und Proteinbanden deutlich erkennbar blau gefärbt waren.

Coomassie-Lösung:	0,1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue
-	in 10 %iger (v/v)	Essigsäure

Silberfärbung

Nach Elektrophorese wurden SDS-Gele 20 min. oder auch über Nacht bei RT in einer Fixierlösung inkubiert, dreimal 5 min. mit H₂O bidest. gewaschen und 5 min. in einer *Farmer's Reducer*-Lösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 20 min. mit H₂O bidest. folgte eine Inkubation von 30 min. in einer 0,1 % (w/v) Silbernitratlösung. Im Anschluß wurden die SDS-Gele kurz in H₂O bidest. gewaschen und in einer Entwickler-Lösung solange geschwenkt, bis Proteinbanden sichtbar wurden. Die Reaktion konnte durch Zugabe 10 %iger (v/v) Essigsäure gestoppt werden.

Fixierlösung:	5:5:1 (v/v/v)	Ethanol : H ₂ O bidest. : Essigsäure
Farmer's Reducer-Lösung:	16 g 10 g	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O K ₃ (Fe(CN) ₆)
Entwickler-Lösung:	2,5 % (w/v) 37 % (v/v) 100 µl Formale	Na2CO3-Lösung Formaldehydlösung: dehydlösung/100 ml Na2CO3-Lösung

3.3.4. Nachweis der EGF-R- und ILK-Expression in humanen Ovarialkarzinomzellen mittels Western Blot-Analyse

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden im Western Blot im elektrischen Feld auf eine polymere Nitrozellulosemembran mit bestimmter Porengröße (0,45 µm) übertragen. Western Blot-Analysen wurden in einer *Semi Dry*-Blot-Apparatur oder in zwei unterschiedlichen *Wet Blotting*-Geräten (*Mini Trans-Blot*[®] *Electrophoretic Transfer Cell*, Biorad bzw. *NuPAGE Transfer System*, Invitrogen) durchgeführt. Proteine wurden in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße auf eine Nitrozellulosemembran, die vorher kurz mit Methanol inkubiert wurde, in Richtung Kathode transferiert, wobei durch Zugabe von 20 % (v/v) Methanol in den Transferpuffer die Effizienz der Übertragung erhöht werden konnte. Mittels Coomassie-Färbung konnten nicht übertragene Proteine nach Western Blot-Analysen auf dem SDS-Gel sichtbar gemacht werden, mittels Ponceau-Färbung wurden Proteine auf der Nitrozellulosemembran rot sichtbar.

Unter Benutzung der *Semi Dry*-Blot-Apparatur wurden Nitrozellulosemembranen kurz in Methanol und Filterpapiere in *Semi Dry*-Blotting Puffer inkubiert. Zwischen die Elektroden der *Semi Dry*-Blot-Apparatur wurden zwischen sechs Filterpapieren SDS-Gel und Nitrozellulosemembran geschichtet. Bei einer Stromstärke von 180 mA (5 mA/cm² Nitrozellulosemembran) wurden Proteine für ca. 3 Std. bei RT vom SDS-Gel auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Unter Verwendung der erwähnten *Wet Blotting*-Geräte wurden Nitrozellulosemembranen wiederum kurz in Methanol und bereitgestellte Schwämmchen in *Wet Blotting*-Transferpuffer inkubiert. Im Anschluß wurden SDS-Gel und Nitrozellulosemembran zwischen zwei Schwämmchen in die *Sandwich*-Kammer geschichtet. Bei einer Stromstärke von 350 mA wurden Proteine für 1 - 1,5 Std. z.T. auf Eis oder im Kühlraum vom SDS-Gel auf die Nitrozellulosemembran übertragen.

Semi Dry-Blotting Puffer:	50 mM 30 mM 4 % (w/v) 20 % (v/v)	Tris Glycin SDS Methanol
Wet Blotting-Transferpuffer:	25 mM 192 mM 20 % (v/v)	Tris Glycin Methanol

Nitrozellulosemembranen wurden für mindestens 1 - 2 Std. bei RT oder über Nacht bei 4 °C geblockt und mit 1x TBST-Puffer gewaschen. Ein mAk, der gegen den EGF-R gerichtet ist, wurde in einer Konzentration von 0,1 µg/ml über Nacht bei 4 °C inkubiert, gefolgt von einem HRP-konjugierten Kaninchen-anti-Maus IgG in einer Konzentration von 0,4 µg/ml für 2 Std. bei RT. Reaktive Proteine konnten mit einem chemilumineszenten Substrat nach Angaben des Herstellers auf einem Film sichtbar gemacht werden. Bestehende Antigen-Antikörper-Reaktionen auf den Nitrozellulosemembranen wurden durch einen *Stripping*-Puffer unterbrochen und die Nitrozellulosemembran vor Wiederverwendung erneut geblockt. Dann konnte ein mAk, der nur die phosphorylierte (aktivierte) Form des EGF-R (p-EGF-R) erkennt,

in einer Konzentration von 0,5 µg/ml über Nacht bei 4 °C inkubiert werden, gefolgt von einem HRP-konjugierten Kaninchen-anti-Maus IgG in einer Konzentration von 0,4 µg/ml für 2 Std. bei RT. ILK-Proteine wurden anhand eines pAk in einer Konzentration von 0,067 µg/ml über Nacht bei 4 °C erfaßt, gefolgt von einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen IgG in einer Konzentration von 0,08 µg/ml für 2 Std. bei RT. Zur Normalisierung der EGF-R-, p-EGF-R- bzw. ILK-Proteine wurde das Zytoskelettprotein β-Aktin verwendet und mittels eines pAk anti-β-Aktin in einer Konzentration von 0,25 µg/ml für 2 Std. bei RT festgehalten, gefolgt von einem HRP-konjugierten Kaninchen-anti-Ziege IgG in einer Verdünnung von 1:8000 für 2 Std. bei RT. Die erhaltenen Signalintensitäten auf den Filmen wurden gescannt und mittels einer Software (Scion Image Beta 4.0.2) densitometrisch ausgewertet. Um die aufgetragenen Proteinkonzentrationen und die jeweiligen Unterschiede zwischen den einzelnen Western Blot-Analysen ausgleichen zu können, wurden die Signalintensitäten normalisiert und der Quotient aus den Werten für die Signalintensitäten des (p-)EGF-R bzw. ILK und β-Aktin gebildet.

1x TBST-Puffer:	150 mM 50 mM 0,1 % (v/v)	NaCl Tris-HCl, pH 8,0 Tween-20
Blocking-Puffer:	2,5 % (w/v) 0,5 % (w/v) in 1x TBST-Pu	Milchpulver BSA ffer
Stripping-Puffer:	160 mM 0,1 % (w/v) 1 % (v/v) pH 2,2	Glycin SDS Tween-20

3.3.5. Nachweis der EGF-R-Proteinexpression in humanen Ovarialkarzinomzellen mittels EGF-R-ELISA

Ein spezifischer ELISA (*enzyme-linked immunosorbent-assay*) wurde zur Bestimmung des EGF-R-Proteins in Anlehnung an die Beschreibung des Herstellers durchgeführt (DakoCytomation, Dänemark). Vektor- bzw. Integrin $\alpha v\beta 3$ -transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden in DMEM mit 1 % (v/v) FCS in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen kultiviert, die mit VN bzw. Kol I beschichtet und 2 % (w/v) BSA/PBS geblockt waren. Nach bestimmten Zeitpunkten (0,5; 1; 2; 4; 9; 24 Std.) erfolgte die Zellernte und -lyse auf Eis in 150 µl Zelllysis-Puffer und Zentrifugation für 20 min. bei 21000 x g bei 4 °C. Im Anschluß wurden

die Zelllysate im bereitgestellten Probenverdünnungspuffer verdünnt und neben einer Standardreihe, die einen Konzentrationsbereich von 0 - 300 ng/ml EGF-R-Protein umfasste, auf eine ELISA-Mikrotiterplatte inkubiert. Nach Zugabe eines Stopp-Puffers konnte die OD_{620} gemessen werden.

3.3.6. Nachweis der Integrin αvβ3-Expression in humanen Ovarialkarzinomzellen mittels Durchflusscytofluorometrie (FACS)

Um das Expressionsniveau des Integrins avß3 in humanen Ovarialkarzinomzellen zu bestimmen, wurden zelloberflächenassoziierte FACS-Analysen durchgeführt. Vektor- und Integrin $\alpha v\beta$ 3-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden bei einer Dichte von 5 x 10⁵ Zellen/Vertiefung auf Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen in DMEM mit 10 % (v/v) FCS kultiviert. Nach 8 Std. Zelladhäsion wurde die FCS-Konzentration auf 1 % (v/v) reduziert. Innerhalb von definierten Zeitintervallen wurden OV-MZ-6-Zellen geerntet und die Expression beider Integrin-Untereinheiten, av und ß3, durchflusszytometrisch bestimmt. Dafür wurden OV-MZ-6-Zellen in 2 % (w/v) BSA/PBS geblockt, zweimal mit PBS gewaschen und ein mAk, der entweder die Integrin av- oder ß3-Untereinheit erkennt, in einer Konzentration 100 ng/100 µl/1 x 10⁵ Zellen in 1 % (w/v) BSA/PBS für 2 Std. bei RT zugegeben. Ein sekundärer Alexa488-konjugierter pAk Kaninchen-anti-Maus IgG wurde in einer Endkonzentration von 4 µg/ml in 1 % (w/v) BSA/PBS nach 2 Waschschritten mit PBS für 30 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und FACS-Messungen durchgeführt. Um den Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Integrin avß3-Expression zu untersuchen, wurde EGF nach 8 Std. Zelladhäsion in einer Endkonzentration von 20 ng/ml den OV-MZ-6-Zellen in DMEM mit 1 % (v/v) FCS zugefügt und OV-MZ-6-Zellen nach definierten Zeitintervallen geerntet und die Integrin avß3-Expression durchflusszytometrisch detektiert. Die Autofluoreszenz Vektor- und Integrin avß3-transfizierter OV-MZ-6-Zellen wurde in Abwesenheit jeglicher Ak gemessen. Die Anfärbung mit dem sekundären Alexa488-konjugierten pAk anti-Maus IgG alleine diente als Kontrolle. Die Vitalität der OV-MZ-6-Zellen konnte durch Zugabe von Propidiumjodid (8 µg/ml) bestimmt werden. Nur in toten Zellen dringt der Farbstoff in die Zellen ein und interkaliert in die DNA, lebende Zellen werden nicht angefärbt und können zur Versuchsauswertung herangezogen werden.

3.3.7. Synthetische Integrin-Liganden

Durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Horst Kessler (Institut für Organische Chemie und Biochemie der TU München in Garching) insbesondere durch Dr. Georgette Thumshirn und Dr. Claudia Dahmen wurden unterschiedliche RGD-Peptide synthetisiert und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Dabei wurde die Festphasensynthese (solid phase peptide synthesis, SPPS) nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie angewendet (Fields and Noble 1990). Synthetische RGD-basierte Integrin-Liganden wurden entwickelt, um an die Integrine avß3 und avß5 selektiv zu binden, um so deren Anbindung an EZM-Proteine und die daraus resultierenden pathophysiologischen Funktionen zu unterbinden. Im EZM-Protein FN wurde 1984 die Peptidsequenz RGD als minimales Fragment zur Stimulierung der Zelladhäsion identifiziert und als Integrin-Bindungsstelle beschrieben (Pierschbacher and Ruoslahti 1984). Ausgehend von der natürlichen RGD-Bindungssequenz konnten eine Reihe peptidischer und nicht-peptidischer Integrin-Liganden synthetisiert werden, die sich in Affinität und Selektivität gegenüber spezifischen Integrinen voneinander unterscheiden. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Horst Kessler resultierte der Einbau von D-Aminosäuren in konformationell eingeschränkte zyklische Peptide zum ersten synthetischen, metabolisch stabilen und Integrin avß3-selektiven Liganden cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) (Aumailley et al. 1991, Gurrath et al. 1992, Haubner et al. 1997, Pfaff et al. 1994). Die Zyklisierung wurde nach Abspaltung der Restgruppe erreicht und führte zum zyklischen Pentapeptid c(-RGDfV-) (Aumailley et al. 1991, Gurrath et al. 1992, Haubner et al. 1996, Kretschmann 1971b). Da Valin innerhalb des zyklischen Pentapeptids c(-RGDfV-) die Interaktion mit Integrinen nicht behindert (Aumailley et al. 1991), konnte es durch verschiedene Aminosäuren ohne Verlust der Integrinaffinität und -selektivität ersetzt werden (Haubner et al. 1996).

Multivalente Liganden, die zwei oder mehrere RGD-Bindungsepitope beinhalten, versprechen eine erhöhte Avidität und Bindungsspezifität gegenüber Integrinen. Das größere Molekulargewicht der multimeren Moleküle bewirkte gleichzeitig eine Veränderung der pharmakokinetischen Eigenschaften. Die in der vorgelegten Arbeit eingesetzten di- und tetrameren RGD-Peptide enthielten das zyklische Pentapeptid cyclo(-ArgGlyAsp-D-PheGlu-) (c(-RGDfE-), die monomeren RGD-Peptide basierten auf dem RGD-Peptid cyclo(-ArgGlyAsp-D-PheLys-) (c(-RGDfK-) (Auernheimer et al. 2005b, Haubner et al. 1996). Peptide können an unterschiedlich lange *Spacer* gekoppelt werden, um eine definierte Distanz zur Bindungsregion zu ermöglichen. Einerseits wurde die eher unpolare ε-Aminohexansäure (Ahx), deren einfache Ahx-Einheit einer Länge von 7,6 Å entspricht, als *Spacer* verwendet. Andererseits wurde die gut wasserlösliche Heptaethylenglykolaminosäure (Hegas), deren Länge 24,3 Å entspricht, als *Spacer* eingesetzt. Beide nicht toxischen und nicht reaktiven *Spacer* sorgen für einen ausreichenden Abstand zu den einzelnen Bindungsregionen.

Da peptidische Integrin-Liganden ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen, wurde ab Mitte der 90er Jahre der Schwerpunkt auf die Synthese von peptidähnlichen (peptidomimetischen) bzw. nicht-peptidischen Verbindungen als potentielle, oral verfügbare Tumortherapeutika gelegt. Ein RGD-basiertes Peptidomimetikum wurde auf der Basis nicht-peptidischer $\alpha v\beta 3$ -selektiver Integrin-Liganden entwickelt und synthetisiert, um die Bioverfügbarkeit sowie Biodistribution hinsichtlich einer therapeutischen Applikation zu verbessern. Überdies musste die hohe Integrin $\alpha v\beta 3$ -affinität und -selektivität erhalten werden (Dahmen et al. 2004, Duggan et al. 2000). Die Strukturformeln der verschiedenen mono- und multimeren Peptide sowie des Peptidomimetikums sind in Abb. 9 dargestellt. Als Kontrollpeptid dienten nicht-Integrin-bindende RAD-basierte Peptide und ein RAD-Peptidomimetikum (Thumshirn 2003).



Abb. 9. RGD-basierte synthetische Integrin-Liganden. Die Struktur mono- und multimerer peptidischer Integrin avß3- und avß5-Liganden und des Peptidomimetikums, die in der vorgelegten

Arbeit verwendet wurden, setzt sich aus den zyklischen RGD-Peptiden c(-RGDfE-) bzw. c(-RGDfK-), einem *Spacer*, der eine, zwei oder drei Ahx-Einheiten umfasst, einer Verzweigungseinheit und einer funktionellen Gruppe zusammen. Monomere sind mit verschieden langen Ahx-*Spacern* (Ahx, (Ahx)₂, (Ahx)₃) versehen und auf Grundlage der funktionalen Integrin-bindenden Gruppe c(-RGDfK-) synthetisiert. Di- und tetramere RGD-Peptide enthalten das Pentapeptid c(-RGDfE-) und sind mit einem Ahx-*Spacer* verknüpft. Das RDG-basierte Peptidomimetikum ist an einen Ahx-*Spacer* gekoppelt und wurde auf Basis nicht-peptidischer Integrin αvβ3-selektiver Liganden entwickelt (Duggan et al. 2000, Kouns et al. 1992). Um eine Bindungsstelle für eine Fluoreszenzmarkierung (ein Fluorophor pro Molekül) zu generieren, wurden chemoselektive Oximligationen durchgeführt, damit die funktionellen Gruppen mit fluoreszierenden Markermolekülen, wie Cy5, chemisch verknüpft werden konnten.

3.3.8. Markierung von EZM-Proteinen und synthetischen Integrin-Liganden

Natürliche bzw. synthetische Integrin-Liganden wurden hinsichtlich einer fluoreszenten Detektion sowohl in zell-freien als auch zell-basierten Bindungssystemen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy5 (*cyanine dye*), FITC (Fluoresceinisothiocyanat) oder Alexa488 sowie Biotin markiert. Verschiedene EZM-Proteine wurden bezüglich eines Streptavidin-Biotin-Nachweises biotinyliert.

Cy5-Fluoreszenzmarkierung von synthetischen Integrin-Liganden, VN, FG und Integrin-spezifischen Antikörpern. Hinsichtlich Fluoreszenzmarkierungen synthetischer Integrin-Liganden wurden chemoselektive Oximligationen durchgeführt, um die funktionellen Gruppen mit Fluorophoren chemisch verknüpfen zu können. Die Methode der Oximligation, eine chemoselektive Reaktion zwischen einer Aminooxy- und einer Aldehyd-Komponente (Wahl and Mutter 1996), ist ein eleganter Ansatz, um ungeschützte Aminooxyfunktionalisierte Peptidfragmente mit verschiedenartigen Markermolekülen zu verbinden (Kretschmann 1971b). Die Amino-funktionalisierten Peptide und das Peptidomimetikum wurden mit dem mono-funktionellen Fluoreszenzfarbstoff Cy5 (Extinktion bei 649 nm, Emission bei 670 nm) in einer finalen Konzentration von 30 nmol nach Angaben des Herstellers markiert. Die EZM-Proteine VN und FG wurden in einer Endkonzentration von 0,3 mg/ml und die mAk, die gegen die Integrine avß3, avß5 oder aIIbß3 gerichtet sind, in einer Konzentration von 0,1 mg/ml mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert. Dazu wurden Integrin-Liganden in einer Konzentration von 10 µg/µl in PBS gelöst, zum lyophilisierten Fluoreszenzfarbstoff Cy5 in einem Endvolumen von 100 µl gegeben, falls nötig mit Natriumbicarbonat bis zum Erreichen des Endvolumens aufgefüllt, und nach Angaben des Herstellers für mindestens 1 Std. bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen mit 2 µl 1 M Ethanolamin-HCl, pH 8,5 gestoppt und die Cy5-markierten Integrin-Liganden sowie mAk bei -20 °C bis zur Benutzung aufbewahrt.

FITC/Alexa488-Fluoreszenzmarkierung von VN, FN und FG. Die EZM-Proteine VN, FN und FG wurden unter Benutzung eines FITC Protein Labeling Kits nach Angaben des Herstellers mit dem Fluorophor FITC markiert. Dafür wurden 450 μg VN, FN bzw. FG in 225 μl PBS gelöst und zusammen mit 20 μl 1 M NaHCO3, pH 9,0 und die nach dem jeweiligen Molekulargewicht berechnete Menge einer FITC/DMSO-Lösung für 1 Std. bei RT im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das FITC-Protein-Gemisch mittels Gelfiltration für 5 min. bei 2250 x g bei RT zentrifugiert, um freie FITC-Fluorophore von FITC-markiertem VN, FN bzw. FG abzutrennen. Konzentrationen der FITC-markierten EZM-Proteine wurden mittels BCA Protein Assay bestimmt. Des Weiteren wurde FN unter Verwendung eines Alexa488 Protein Labeling Kits nach dem Protokoll des Herstellers mit dem Fluorophor Alexa488 markiert. Dazu wurden 200 μg FN zusammen mit 50 μl 1 M NaHCO3, pH 9,0 für für 2 Std. bei RT im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden freie Alexa488-Fluorophore mittels Gelfiltration von Alexa488-markiertem FN separiert. Fraktionen, die Alexa488-markiertes FN enthielten, konnten mittels SDS-Gelelektrophorese und Coomassiefärbung ermittelt werden.

Biotinylierung von VN und FN. Biotin wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in DMSO gelöst. Zu je 100 μ g VN bzw. FN wurden 100 μ l 1 M NaHCO₃ gegeben und mit der Biotin/DMSO-Lösung in unterschiedlichen Mengen für 2 Std. bei RT inkubiert. Je nach Erfolg der Biotinylierung wurde eine Konzentration von 37,5 - 100 μ g Biotin pro 1 mg EZM-Protein erreicht. Freies Biotin wurde mittels Gelfiltration abgetrennt und Konzentrationen des biotinylierten VN bzw. FN mittels BCA Protein Assay bestimmt.

3.3.9. Ermittlung von Integrin/Ligand-Wechselwirkungen mittels Oberflächenplasmonenspektroskopie (*Surface Plasmon Resonance Spectroscopy*, SPS)

Die Oberflächenplasmonenspektroskopie (*Surface Plasmon Spectroscopy*, SPS) ist eine etablierte Methode zur Charakterisierung ultradünner Schichten auf metallischen Oberflächen (Knoll 1998). Durch p-polarisiertes, monochromatisches Licht wird Elektronengas der metallischen Oberfläche in Schwingung versetzt und ein Plasmon erzeugt. Der apparative Aufbau ist in Abb. 10 dargestellt und erfolgt unter Verwendung der Kretschmann Konfiguration, in der anregendes Laserlicht über ein Glasprisma an eine Goldschicht gekoppelt wird (Kretschmann 1971a, Kretschmann and Raether 1968). Oberflächenplasmone entspringen elektromagnetischen Anregungen von Elektronen und Photonen, die sich entlang der Grenzfläche zwischen einem Metall und einem Dielektrium ausbreiten (Raether 1988). So

erzeugen Oberflächenplasmone ein evaneszentes Feld, dessen Intensität senkrecht zur Grenzfläche exponentiell abnimmt, jedoch an der Grenzfläche gegenüber der einfallenden Lichtintensität um ein Vielfaches, in Abhängigkeit vom verwendeten Metall, zunimmt. In Ausbreitungsrichtung, parallel zur Oberfläche, verhält sich ein Oberflächenplasmon wie eine Lichtwelle, mit einem sinusförmigen Verlauf des elektromagnetischen Feldes.



Abb. 10. Apparativer Aufbau der Messküvette für SPS-Messungen. Auf der Metalloberfläche ist eine Plasmonenanregung gezeigt, die sich entlang der Grenzfläche zwischen einer Goldschicht und einem Dielektrium, dem Bindungspuffer, ausbreitet. Binden fluoreszenzmarkierte Moleküle an die Oberfläche, wird ihre Fluoreszenzemission verstärkt (verändert nach Sinner 2003).

Die Intensität des reflektierten Lichtes wird in Abhängigkeit vom Einfallswinkel des Anregungslichtes gemessen und als Plasmonenkurve dargestellt (Abb. 11 A). Die Winkelposition des Intensitätsminimums in einer Plasmonenkurve ist charakteristisch für das verwendete optische Medium, das an die Goldschicht angrenzt. Adsorbieren Moleküle an die Goldoberfläche, verschiebt sich die Winkelposition des Intensitätsminimums (Knoll 1998). Die Verschiebung kann zeitabhängig gemessen werden, woraus sich die Kinetik des Adsorptionsvorganges ergibt (Abb. 11 B). Dieser Effekt bietet die Möglichkeit, den Brechungsindex bzw. die Schichtdicke von Adsorptionschichten im nanomolaren Bereich zu bestimmen.



Abb. 11. Chemisorption von Molekülen an Goldoberflächen. Durch Adsorbtion fluoreszierender Moleküle an der Goldoberfläche verschiebt sich die Winkelposition des Intensitätsminimums und eine Bindungskurve kann aufgezeichnet werden (A). Adsorptionskinetiken können jeweils vor und nach Zugabe von Molekülen gemessen werden (B). Plasmonenkurven sind schwarz und Fluoreszenzkurven rot abgebildet; Signale vor Zugabe von Molekülen, die an die Oberfläche gebunden werden, sind durch durchgezogene Linien dargestellt; Veränderungen nach Adsorption von Molekülen werden durch gepunktete Linien bezeichnet (Sinner 2003).

3.3.9.1. Plasmonenverstärkte Fluoreszenzspektroskopie (*Surface Plasmon-Enhanced Fluorescence Spectroscopy*, SPFS)

Eine Möglichkeit, die Empfindlichkeit der Oberflächenplasmonenspektroskopie noch weiter zu erhöhen, ist die plasmonenverstärkte Fluoreszenzspektroskopie (Surface Plasmon-Enhanced Fluorescence Spectroscopy, SPFS). Die Emission fluoreszierender Moleküle wird durch Anregung eines Oberflächenplasmons und der damit verbundenen Vergrößerung des elektromagnetischen Feldes verstärkt (Liebermann and Knoll 2000). Fluorophore außerhalb des Oberflächenplasmons erfahren keine Anregung und somit keine Fluoreszenzverstärkung (Neumann et al. 2002). Mittels SPFS können um Größenordnungen höhere Empfindlichkeiten für Bindungsvorgänge an Membranoberflächen im Vergleich zur SPS gemessen werden. Werden Plasmonenund Fluoreszenzkurven gleichzeitig betrachtet, so wird die Winkelabhängigkeit des Fluoreszenzsignals deutlich, wodurch eine Unterscheidung zwischen fluoreszierenden gebundenen und ungebundenen Molekülen möglich ist. Die oberflächengebundene Fluoreszenzemission erreicht ihr Maximum im Minimum der Plasmonenkurve (Abb. 11 A). Der Aufbau der ultradünnen artifiziellen Membranen sowie Bindungsvorgänge an der Membranoberfläche können, basierend auf der Anregung von Oberflächenplasmonen, nahezu in Echtzeit betrachtet werden.

Die Methode der Oberflächenplasmonenspektroskopie und ihre Erweiterung, SPFS, sind für Studien spezifischer Bindungsvorgänge an biologischen Schichtsystemen besonders geeignet (Schmidt et al. 1998). Dabei kann z.B. auch der Aufbau ultradünner Schichten wie Peptidunterstützter Phospholipiddoppelschichten mittels SPS überprüft werden. Spezifische Bindungsvorgänge von Molekülen an Oberflächen können mittels SPFS an in künstliche Membranen inkorporierte Proteine wie Integrine analysiert werden (Saccà et al. 2002). Diese stabile Inkorporation von Rezeptoren in Peptid-unterstützte Phospholipiddoppelschichten kann ebenfalls mittels SPS-Messungen zeitaufgelöst verfolgt werden. Parallel dazu kann die Reproduzierbarkeit des Schichtaufbaus kontrolliert sowie Bindungsphänomene von fluoreszierenden Liganden an artifiziellen Membranen beobachtet werden (Naumann et al. 1999, Saccà et al. 2002, Schmidt et al. 1998). Der Vorteil von SPFS-Messungen besteht darin, dass Bindungseigenschaften besonders kleiner Liganden an Integrin-funktionalisierte Phospholipiddoppelschichten bestimmt werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mittels SPFS spezifische Integrin-Interaktionen mit fluoreszierenden, synthetischen mono- und oligomeren sowie natürlichen Integrin-Liganden sowie Antikörpern an Integrin-funktionalisierte Phospholipiddoppelschichten evaluiert.

3.3.9.2. Messanordnung für SPFS-Messungen

SPFS-Messungen wurden am MPI für Biochemie in Martinsried unter der Leitung von Dr. Eva-Kathrin Sinner durchgeführt. Der Aufbau der SPS-Messapparatur ist schematisch in Abb. 12 dargestellt. Oberflächenplasmone werden durch einen Helium-Neon-Laser bei einer Wellenlänge von 633 nm angeregt. Der Laserstrahl durchläuft zwei Glan-Thompson Polarisatoren, wovon der erste die Intensität des Laserstrahls regelt, währenddessen der zweite das Licht p-polarisiert. Im Anschluß trifft der Laserstrahl in einem bestimmten Einfallswinkel auf das Glasprisma, welches auf einem Zweikreis-Goniometer montiert ist. Über das Goniometer kann der Einfallswinkel eingestellt werden. Die LaSFN9-Glassubstrate werden mit Hilfe einer Aufdampfanlage mit 99,99 % Gold beschichtet. Dazu wird Gold unter Elektronenbeschuss bei mindestens 1 x 10⁻⁶ mbar verdampft. Das goldbeschichtete LaSFN9-Glassubstrat wird unter Verwendung eines Immersionsöls mit einem bestimmten Brechungsindex von 1,68 optisch an das Prisma gekoppelt. Die Goldschicht auf dem Glassubstrat sowie ein Objektträger begrenzen die Glasküvette, an deren Unterseite artifizielle Membranen aufgebaut werden können (Abb. 12). Zur Detektion des reflektierten Strahls wird das Licht durch eine Bikonvexlinse mit einer Brennweite von 100 mm auf eine Si-Photodiode fokussiert. Um das Hintergrundlicht zu minimieren, wird die Intensität des Laserstrahls zunächst mit Hilfe eines Frequenzmodulators (Chopper) mit einer Frequenz von 1193 Hz moduliert. Das daraus resultierende, modulierte Detektorsignal wird mit einem Lock-In-Verstärker (EG&G, 5210) gemessen und anschließend mittels entsprechender Software (WasPlas 2.19) aufgezeichnet. Die aus der Messküvette emittierte Fluoreszenz wird von einem Interferenzfilter (LOT 670 nm, 10 nm FWHM) selektiert, mit einem Photomultiplier gemessen und gleichzeitig mit dem reflektierten Licht aufgezeichnet (Krupka 2005).



Abb. 12. Schematische Darstellung der verwendeten Messanordnung für SPFS-Messungen. Ein Laserstrahl wird durch zwei Polarisatoren und einem Frequenzmodulator auf das Glasprisma direkt auf die Goldschicht geleitet und an der Gold-Wasser-Grenzfläche reflektiert. Die Intensität des reflektierten Lichts wird von einer Photodiode registriert. Gleichzeitig misst ein Photomultiplier die aus der Glasküvette emittierte Fluoreszenz (verändert nach Liebermann and Knoll 2000).

3.3.9.3. Aufbau Peptid-unterstützter Phospholipiddoppelschichten mit inkorporierten Integrinen

SPS/SPFS Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Eva-Kathrin Sinner mittels einer konstruierten Messapparatur durchgeführt (Sinner and Knoll 2001, Sinner et al. 2004). Der gesamte Aufbau Peptid-unterstützter Phospholipiddoppelschichten auf der Goldoberfläche konnte durch die Zunahme der Schichtdicke mittels SPS verfolgt werden (Abb. 13). Die Präparation und Verteilung der Integrin-funktionalisierten Vesikel in Peptidunterstützten Phospholipiddoppelschichten sowie der Schichtaufbau auf goldbedampften Glassubstraten bei RT ist bereits durch Sinner et al. beschrieben (Knoll et al. 2000, Schmidt et Zum Aufbau einer Peptid-unterstützten Phospholipiddoppelschicht wurden 0,5 µg gelöstes Lamininpeptid P19, ein Derivat der α-Laminin-Untereinheit, in 500 µl sterilem Wasser für 40 - 60 min. an eine Goldoberfläche auf dem Biosensor chemisorbiert. Ungebundenes Lamininpeptid wurde mit 1 ml sterilem Wasser entfernt. Terminale Carboxygruppen des Lamininpeptids konnten durch Zugabe gleicher Volumina einer EDC/NHS (N-Ethyl-N-Dimethylaminopropyl-Carbodiimid/N-Hydroxy-Succinimid)-Lösung (400 mM EDC bzw. 100 mM NHS gelöst in sterilem Wasser) für 10 min. aktiviert werden. An die aktivierte Lamininpeptidschicht wurde innerhalb von 40 min. eine Lipidschicht durch Zugabe einer DMPE (Dimyristoyl-Phosphatidyl-Ethanolamin)-Lösung (0,3 mg/ml gelöst in 0,003 % (v/v) Triton X-100/PBS) angekoppelt. Ungebundenes DMPE wurde mit 1 ml Bindungspuffer (BP) abgespült. Die einfache Lipidschicht konnte unter Zugabe von Liposomen mit inkorporierten gereinigten Integrinen durch Spreitung der Vesikel zu einer Phospholipiddoppelschicht vervollständigt werden.

Die Herstellung von Liposomen erfolgte in einem 5 ml-Glaskolben, in den 50 µl Phosphatidylcholin (PC)-Lösung gegeben und das Lösungsmittel Chloroform durch gasförmigen Stickstoff evaporiert wurde, so dass ein dünner Phospholipidfilm entstand. Die Protein-Lipid-Emulsion wurde bei gleichzeitiger Zugabe von 2,5 ml BP und jeweils 12,5 µg (2,5 µg/Membran) Integrin avß3 bzw. avß5 (gelöst in 10 mM n-Octyl-ß-d-Glucopyranosid) oder aIIbB3 (gelöst in 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 0,02 % (w/v) NaN₃) kräftig vermischt. Hierbei erfolgte die Ausbildung Integrin-funktionalisierter Lipidvesikel. Die spontane multilamellaren Lipidvesikel wurden durch gleichmäßiges Pressen durch Polycarbonatfilter mit einem Porendurchmesser von 100 nm gedrückt, um unilamellare Lipidvesikel zu generieren, die dann sofort auf die Thiopeptid-Lipid-Schicht des Biosensors aufgetragen wurden. Die Zugabe Integrin-funktionalisierter Lipidvesikel führte durch Interaktion der hydrophoben Acylreste der DMPE-Schicht während einer Inkubationszeit von mindestens 2 Std. spontan zur Formierung einer Phospholipiddoppelschicht mit inkorporierten Integrinen (Bunjes et al. 1997, Sinner et al. 2004). Ungebundene Lipidvesikel konnten durch Spülen mit 1 ml BP entfernt werden.



Abb. 13. Plasmonenspektroskopische Messung des Aufbaus einer Integrin-inkorporierten Phospholipiddoppelschicht. Zuerst wurde ein Thiopeptid kovalent an eine Goldoberfläche gebunden, um ausreichend Raum für die zytoplasmatischen Domänen der Integrine zu schaffen. Durch Zugabe einer EDC/NHS-Lösung wurde das gebundene Thiopeptid chemisch aktiviert und das Phospholipid DMPE über Aminogruppen gekoppelt, so dass eine einfache Lipidschicht entstand. Nach einem Spülvorgang mit Bindungspuffer wurden Lipidvesikel mit inkorporierten Integrinen zugefügt und es bildete sich spontan eine Phospholipiddoppelschicht aus, in die inkorporierte Integrine zufällig angeordnet und mit ihrer EZM-Bindungsdomäne in die wässrige Phase der Biosensor-Oberfläche orientiert waren.

Die beidseitig polierten LaSFN9-Glasträger waren mehrfach wiederverwendbar und wurden deshalb vor jeder neuen Membrankonstruktion gereinigt, indem die Goldschicht entfernt und das Glassubstrat mit einer Hellmanex-Reinigungslösung behandelt wurde (Schmidt et al. 1998). Die Goldschicht der benutzten Glasträger wurde mit einer oxidierenden Lösung aus 2 % (w/v) Jod und 8 % (w/v) Kaliumjodid für 10 min. im Ultraschallbad gelöst und anschließend mit sterilem Wasser gespült. Der Reinigungvorgang erfolgte durch vorsichtiges Abreiben der Glasträger mit einer in 2 %igen (v/v) Hellmanex-Detergenzlösung und Spülen mit sterilem Wasser. Danach wurden die Glasträger zum Trocknen mit Ethanol benetzt, der mit gefilterter Druckluft evaporiert wurde. Diesem Reinigungsprotokoll folgend wurden auch Glasprisma und -küvette gesäubert. Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der SPS/SPFS-Messungen ist die Reinheit der verwendeten optischen Gläser von entscheidender Bedeutung, da Unreinheiten zu Artefakten in der Fluoreszenzdetektion führen können.

Bindungspuffer (BP):

 50 mM
 Tris-HCl, pH 7,4

 150 mM
 NaCl

 2 mM
 MgCl₂ x 6 H₂O

 1 mM
 MnCl₂ x 2 H₂O

3.3.9.4. Durchführung von Integrin/Ligand-Bindungsstudien mittels SPS/SPFS

Integrin/Ligand-Bindungsstudien an Thiopeptid-unterstützten artifiziellen Membranen wurden mit einem Mindestvolumen von 500 µl Flüssigkeit in einer Messküvette durchgeführt, da der Kontakt mit Luft die rekonstruierte Membran beschädigen und für die weitere Messung unbrauchbar machen würde. Alle Spülvorgänge erfolgten daher im Durchfluss mit Hilfe von zwei Kanülen an Spritzen mit einem Volumen von 1 ml.

Nachdem eine Integrin-funktionalisierte Phospholipiddoppelschicht vollständig aufgebaut war, wurde eine Plasmonenmessung durchgeführt, um die optischen Eigenschaften des Goldträgers, die endgültige Schichtdicke der Phospholipiddoppelschicht und schließlich den Membranhintergrund zu bestimmen. Für Integrin/Ligand-Bindungsstudien wurden Cy5markierte RGD-Peptide und ein Cy5-markiertes Peptidomimetikum in einer finalen Konzentration von 30 nmol, Cy5-markiertes VN bzw. FG in einer Endkonzentration von 0,2 nmol und Integrin-spezifische mAk in einer Endkonzentration von 15 nmol auf Integrinfunktionalisierte Phospholipiddoppelschichten gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min. im Dunkeln bei RT konnten ungebundene Liganden durch Spülen mit 10 ml BP entfernt und Liganden-Bindungen an Integrine in artifiziellen Membranen durch SPFS-Messungen detektiert werden. Das Fluoreszenzsignal, das der Winkelposition entspricht, an der die maximale Intensität des Oberflächenplasmons erreicht wurde, wurde gemessen und repräsentiert eine Oberflächen-spezifische Bindung. Auftretende Interferenz-Phänomene, die in unspezifischen Fluoreszenzsignalen resultieren, entspringen nicht dem Intensitätsminimum der Plasmonenkurve und stellten kein spezifisches Bindungssignal dar (Liebermann and Knoll 2000).

Um die Spezifität der Bindung und Affinität synthetischer Integrin-Liganden gegenüber Membran-inkorporierten Integrin avß3 zu überprüfen, wurde diese Bindung durch den natürlichen EZM-Liganden des Integrins avß3, VN, kompetiert bzw. *vice versa*. Das Bindungssignal eines fluoreszenzmarkierten RGD-Peptids an Membran-inkorporiertes Integrin avß3 wurde mittels SPFS-Messung ermittelt und anschließend unmarkiertes VN für 30 min. inkubiert. Nachdem dissoziiertes fluoreszenzmarkiertes RGD-Peptid durch Waschen mit BP entfernt wurde, erfolgte eine erneute SPFS-Messung. Die Kompetition wurde ebenfalls umgekehrt durchgeführt, indem zuerst fluoreszenzmarkiertes VN mit Integrin avß3 inkubiert und anschließend ein unmarkiertes RGD-Peptid zugegeben wurde. Nach 30 min. wurde dissoziiertes fluoreszenzmarkiertes VN durch Waschen mit BP entfernt und eine SPFS-Messung durchgeführt. Um Bindungseigenschaften von mehreren fluoreszenzmarkierten Liganden hintereinander auf einer Integrin-funktionalisierten Phospholipidoppelschicht bestimmen zu können, wurden gebundene Liganden durch Zugabe von 0,5 M EDTA, pH 8,0 von der Membranoberfläche dissoziiert. Aufgrund der Einwirkung von EDTA für mindestens 30 min. wurden die zur Integrin-Bindung essentiellen Metallionen komplexiert (Arnaout et al. 2005, Hynes 1992, Plow et al. 2000). Bevor eine erneute Bindungsstudie durchgeführt werden konnte, wurde die Membranoberfläche mit BP gewaschen, um den Ausgangszustand der Integrinfunktionalisierten Phospholipidoppelschicht sowie die dielektrischen Eigenschaften des Biosensors wiederherzustellen.

Integrin-funktionalisierte Phospholipiddoppelschichten wurden außerdem mit Proteinase K behandelt, um spezifische Integrin/Ligand-Bindungen zu unterbrechen. Nach Bindung eines fluoreszenzmarkierten Liganden an Membran-inkorporierte Integrine erfolgte eine SPFS-Messung. Danach wurde Proteinase K in einer finalen Konzentration von 0,4 µg/µl Proteinase K-Puffer für 40 min. bei RT inkubiert. Die artifizielle Membran wurde mit PBS und BP gewaschen und derselbe fluoreszenzmarkierte Ligand nochmals zugegeben und eine SPFS-Messung durchgeführt.

Proteinase K-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 8,5
	5 mM	EDTA
	0,5 % (w/v)	SDS

3.3.10. Entwicklung eines Mikrotiter-Liganden-Bindungstests

Parallel zu Integrin/Ligand-Bindungsstudien, die mittels SPS/SPFS detektiert wurden, wurde angestrebt, einen Mikrotiter-Liganden-Bindungstest zu entwickeln. Gereinigte Integrine wurden dafür an Plastikoberflächen von Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen in einer Konzentration von 1 µg/ml in Beschichtungspuffer immobilisiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden die Mikrotiterplatten einmal mit BP gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit 3 % (w/v) BSA in BP für 2 Std. bei RT blockiert. Nach erneutem Waschen mit BP wurden 10 mM RGD-Peptid (50 µl/Vertiefung) zusammen mit 1 µg/ml eines biotinylierten EZM-Liganden (50 µl/Vertiefung) für 3 Std. bei RT auf die beschichteten Mikrotiterplatten gegeben. Außerdem wurden Reversibilitätstests durchgeführt, bei denen zuerst RGD-Peptide (100 µl/Vertiefung) für 2 Std. bei RT inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit BP biotinylierte EZM-Liganden (100 µl/Vertiefung) für 3 Std. bei RT zugegeben wurden (Diefenbach 1995). Bei beiden Testreihen wurde nach den jeweiligen Inkubationszeiten ungebundenes Material durch dreimaliges Waschen mit BP entfernt und HRP-konjugiertes Streptavidin in einer Verdünnung von 1:1000 in BP für 1 Std. bei RT inkubiert, mit 1x TBST-Puffer gewaschen und ein Peroxidase-Substrat zugegeben. Nach 20 min. auf dem Schüttler wurde die Enzym-Substrat-Reaktionen mit 1 M Schwefelsäure gestoppt und es konnten Farbänderungen nach Substratspaltung bei OD₄₅₀ gemessen werden. Als Kontrolle dienten Mikrotiterplatten, die mit BSA beschichtet waren sowie RAD-Peptide, die nicht an Integrine zu binden vermögen. Durch Bindung von Integrin-spezifischen mAk, die die EZM-Bindungsregion der Integrine erkennen, konnte die Aktivität der immobilisierten Integrine überprüft werden.

Beschichtungspuffer:	1 mM 1 mM 0,01 mM 150 mM 20 mM	CaCl ₂ MgCl ₂ MnCl ₂ NaCl Tris-HCl, pH 7,4
BP:	1 mM 1 mM 0,01 mM 0,1 % (w/v) in TBS, pH 7,4	CaCl ₂ MgCl ₂ MnCl ₂ BSA
1x TBS-Puffer:	150 mM 50 mM	NaCl Tris-HCl, pH 8,0

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1. Kultivierung von E.coli und Transformation von Plasmid-DNA

E.coli-Bakterien wurden in LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) bei 37 °C unter Schütteln oder auf LB-Agarplatten kultiviert. Zur Selektion wurde dem LB-Medium in Abhängigkeit vom Plasmid ein Antibiotikum, bezüglich des EGF-R- bzw. ILK-Promotor-Plasmids 100 μ g/ml Ampicillin, zugesetzt. Zu 100 μ l XL1-*Blue*-Bakterien wurden 10 μ l des PCR-Produktes nach DpN I-Restriktion gegeben, gemischt und für 20 min. auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock erfolgte für 45 sec. bei 42 °C. Danach wurde der Transformationsansatz sofort für mindestens 2 min. (maximal 5 min.) auf Eis gestellt bevor die Regenerationsphase in 1 ml LB-Medium für 1 Std. bei 37 °C eingeleitet wurde. Im Anschluß wurde der Transformationsansatz für 5 min. bei 5000 x g bei RT zentrifugiert und resuspendierte Pellets auf LB-Agarplatten über Nacht für mindestens 16 Std. kultiviert. Am nächsten Tag wurden verschiedene Bakterienklone gepickt und in 1 ml LB-Flüssigmedium mit 100 μ g/ml Ampicillin über Nacht unter Schütteln kultiviert bis die Bakteriensuspension eine OD₆₀₀ = 3 - 6 erreicht hatte. Am darauf folgenden Tag konnten DNA-Präparationen durchgeführt werden. Dauerkulturen von *E.coli*-Bakterien wurden bei -80 °C zur Langzeitlagerung in einer Glycerollösung aufbewahrt.

LB-Medium:	1 % (w/v) 0,5 % (w/v) 0,5 % (w/v)	Bactotrypton Hefeextrakt NaCl
LB-Agar:	1,5 % (w/v)	Agar in LB-Medium
Glycerol-Einfrierlösung:	65 % (v/v) 0,1 M 25 mM	Glycerol MgSO₄ Tris-HCl, pH 8

3.4.2. Herstellung kompetenter E.coli-Bakterien

Kompetente *E.coli*-Bakterien sind in der Lage, in Lösung befindliche, fremde DNA nach Transformation aufzunehmen. Dafür wurde 1 ml einer über Nacht-*E.coli*-Bakterienkultur zu 100 ml 2 x TY-Medium gegeben und bei 37 °C unter Schütteln kultiviert bis die Bakteriensuspension eine $OD_{550} = 0,5$ erreicht hatte. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 5 min. bei 4000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml kaltem Tbf I-Puffer resuspendiert, 30 min. auf Eis inkubiert und 5 min. bei 1000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das

Pellet wurde dann in 1 ml Tfb II-Puffer auf Eis resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2 x TY-Medium:	1,6 % (w/v) 1 % (w/v) 0,5 % (w/v)	Bactotrypton Hefeextrakt NaCl
Tbf I-Puffer:	30 mM 50 mM 100 mM 10 mM 15 % (v/v)	Kaliumacetat, pH 5,8 (Essigsäure) MnCl ₂ KCl CaCl ₂ Glycerol
Tbf II-Puffer:	10 mM 75 mM 10 mM 15 %	MOPS, pH 7,0 (NaOH) CaCl ₂ KCl (v/v) Glycerol

3.4.3. Expressionsvektoren

Die verschieden langen EGF-R-Promotor-Fragmente im Plasmid pUV102 wurden durch Prof. Dr. Esther Gonzalez (Division of Nephrology, Saint Louis Universität School of Medicine, St. Louis, MO, USA) zur Verfügung gestellt. Das längste Promotorkonstrukt des EGF-R entspricht 1104 bp, die 5'-verkürzten Fragmente des EGF-R-Promotors haben eine Größe von 729 bp (Pst I - Sac I), 479 bp (Bsu 36I - Sac I) sowie 246 bp (Aat II - Sac I). Die verschieden langen ILK-Promotor-Fragmente im Plasmid pGL2-basic wurden durch Prof. Dr. Nelly Kieffer (Laboratoire Franco-Luxembourgeois de Recherche Biomédicale, Luxembourg) zur Verfügung gestellt. Das längste Promotorkonstrukt der ILK entspricht 1006 bp, die nächsten vom 5'-verkürzten Fragmente des ILK-Promotors haben eine Größe von 464 bp (BamH I -BamH I) und 353 bp (Apa I - Apa I). Der *Renilla*-Luziferase-Reportergen-Vektor pRL-SV40 war kommerziell erhältlich und diente nach Ko-Transfektion der Bestimmung der Transfektionseffizienz.

3.4.4. site-directed in vitro DNA-Mutagenese

Synthetische Oligonukleotide, die die gewünschten Mutationen enthielten, dienen als Primer für eine gerichtete *in vitro* Neusynthese der DNA-Matrize. Nach Anlagerung der Oligonukleotid-Primer an den komplementären Strang der DNA-Matrize erzeugte eine DNA-Polymerase eine Kopie, die sich nur in der Primersequenz von der DNA-Matrize unterscheidet. Ausgehend von der DNA-Matrize des 1104 bp-Fragments des EGF-R-Promotors wurden Punktmutationen in der Sequenz des EGF-R-Promotors in mehreren Schritten, die im Anschluß erläutert werden, mit Hilfe eines *QuickChange[®] site-directed mutagenesis kit* nach Angaben des Herstellers erzeugt (Stratagene, USA).

3.4.4.1. Design von Oligonukleotid-Primern für die DNA-Mutagenese

Um die DNA-Konsensusmotife für die Transkriptionsfaktoren p53, ETR, c-rel, p50 sowie ETF im 1104 bp-Fragments des EGF-R-Promotors zu mutagenisieren, so dass eine Erkennung und Bindung an die entsprechende DNA-Konsensussequenz nicht mehr möglich war, wurden die in Tab. 1 aufgelisteten degenerierten Primer verwendet (Bindungsstellen der jeweiligen Transkriptionsfaktoren sind unterstrichen). Die veränderten Konsensusmotife wurden so erzeugt, dass gleichzeitig Schnittstellen für Restriktionsenzyme, die der Kontrolle einer erfolgreichen DNA-Mutagenese dienten, entstanden.

Name des Primers	Sequenz des Primers
p53 mut sense	5'-GTTTCCC <u>CTGCAGTTCG</u> CCTGCGGGAGCTACAGGGG-3'
p53 mut antisense	5'-CCCCTGTA <u>GCTCCCGCAG</u> GCGAACTGCAGGGGAAAC-3'
ETR mut sense	5'-GTGCCCTCATTTCAGATGAT <u>TGCTAGCG</u> TGCTTGACAAGATCTG-3'
ETR mut antisense	5'-CAGATCTTGTCAAGCACGCTA <u>GCAATCAT</u> CTGAAATGAGGGCAC-3'
c-rel mut sense	5'-CCAGAGGGGCAGTGCTG <u>TGAATTCCAC</u> TCTCGGAAATTAACTCC-3'
c-rel mut antisense	5'-GGAGTTAATTTCCGAGAG <u>TGGAATTCAC</u> AGCACTGCCCCTCTGG-3'
p50 mut sense	5'-GCTAGACGTCC <u>CTGCAGCCTC</u> CGGCGCAGCGCG-3'
p50 mut antisense	5'-CGCGCTGCGC <u>CGGAGGCTGC</u> AGGGACGTCTAGC-3'
ETF mut sense	5'-CTAGACGAGGCC <u>TCATCCCACGTCGCGG</u> CGCGGCCGCAGC-3'
ETF mut antisense	5'-GCTGCGGCCG <u>CGCCGCGACGTGGGAT</u> GAGGCCTCGTCTAG-3'

Tab. 1: Auflistung der Namen und Sequenzen der Oligonukleotid-Primer des EGF-R-Promotors

Innerhalb der Promotorsequenz des 1006 bp-Fragments des ILK-Promotors wurden die DNA-Konsensusmotife für die Transkriptionsfaktoren c-rel, AP-1, p53 und Ets anhand der in der Tab. 2 aufgeführten degenerierten Primer mutiert (Bindungsstellen der jeweiligen Transkriptionsfaktoren sind unterstrichen). Die veränderten Konsensusmotife wurden so erzeugt, dass gleichzeitig Schnittstellen für Restriktionsenzyme, die der Kontrolle einer erfolgreichen DNA-Mutagenese dienten, entstanden.

Name des Primers	Sequenz des Primers
c-rel mut sense	5'-GGGCGCGGCCGGA <u>AGCTTGTTCAC</u> CGGAGAAGGATCC-3
c-rel mut antisense	5'-GGATCCTTCTCCGG <u>TGAACAAGCTT</u> CCGGCCGCGCCC-3'
AP-1 mut sense	5'-CCACTTGTGTT <u>TGCTAGCCTGA</u> CAGAACATGC-3'
AP-1 mut antisense	5'-GCATGTTCTG <u>TCAGGCTAGCA</u> AACACAAGTGG-3'
p53 mut sense	5'-GGAGCGCTC <u>AGGCCTTCCA</u> GAACCGACCCG-3'
p53 mut antisense	5'-CGGGTCGGT <u>TCTGGAAGGC</u> CTGAGCGCTCC-3'
1.Ets mut sense	5'-GGGCCCTTGTACGTACTGTTGCATGCCTGAAGAACCTCTTCG-3'
1.Ets mut antisense	5'-CGAAGAGGTTCTTCA <u>GGCATGCAACAGT</u> ACGTACAAGGGCCC-3'
2.Ets mut sense	5'-GCGCT <u>CCTCTGCAGGCCG</u> GAGCGCTCAGACC-3'
2.Ets mut antisense	5'-GGTCT <u>GAGCGCTCCGGCC</u> TGCAGAGGAGCGC-3'

Tab. 2: Auflistung der Namen und Sequenzen der Oligonukleotid-Primer des ILK-Promotors

3.4.4.2. in vitro Mutagenese-PCR-Reaktion

Das PCR-Protokoll der *in vitro* Mutagenese-PCR-Reaktion setzte sich aus den aufgelisteten Reagenzien und PCR-Zyklen zusammen. Die PCR-Produkte wurden mit 0,5 µl der Endonuklease DpN I (20 U/µl) für 1 Std. bei 37 °C behandelt, um methylierte Plasmid-DNA, die der elterlichen bzw. ursprünglichen DNA-Matrize entsprach, zu spalten, um somit mutierte Plasmid-DNA selektieren zu können.

Mutagenese-PCR-Reaktion:	5 μl 2 μl 10 % (v/v) 50 ng 125 ng	10x Reaktionspuffer (PfU-Puffer) 2,5 mM dNTP DMSO Plasmid-DNA jeweiliges komplementäres Primer-Paar	
	auf 50 μ l mit H ₂ O bidest. auffüllen		
PCR-Zyklen:	1.	2 min. 95 °C	
	2.	1 min. 95 °C	
	3.	1 min. 65 °C (1 min./kb) 🏲 18 Zyklen	
	4.	8 min. 68 °C	
	5.	5 min. 68 °C	
	6.	Kühlung bei 4 °C	

Reinigung von Plasmid-DNA und Sequenzierung von EGF-R/ILK-Promotormutanten

Nach Behandlung der PCR-Produkte mit Endonuklease DpN I und Transformation der Plasmid-DNA in XL1-*Blue*-Bakterien wurden Plasmid-DNA-Präparationen mit Hilfe eines *plasmid kit for plasmid DNA purification* (Macherey-Nagel, USA) gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers durchgeführt. Außerdem erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA in größeren Mengen mit Hilfe eines *large-construct kit* (QIAGEN, Deutschland). Erfolgreiche DNA-Mutagenesen wurden mittels Restriktionsanalysen sowie Sequenzierung überprüft. Als Beispiel ist die EGF-R-Promotor-Mutagenese der c-rel-Sequenz abgebildet (Abb. 14).



Abb. 14. Nachweis der EGF-R-Promotor-Mutagenese der c-rel-Sequenz. Der pUV102-Vektor, der die Sequenz des Wildtyp-EGF-R-Promotors (1104 bp) zwischen den Restriktionsschnittstellen Hind III und SpeI enthält, hat eine Größe von 5806 bp. An die Sequenz des Wildtyp-EGF-R-Promotors sind klonierungsbedingt 24 bp angehängt, woraus sich eine Gesamtgröße des Plasmids von 6934 bp ergibt. Im aufgeführten Beispiel ist die EGF-R-Promotor-Mutagenese der c-rel-Sequenz erläutert, die 4 Abweichungen (*mismatchs*) zum c-rel-Konsensusmotif enthält sowie 4 Basenaustausche, durch die eine EcoR I-Restriktionsschnittstelle in der mutagenisierten Sequenz des EGF-R-Promotors entsteht. Nach Restriktionsanalyse kann eine erfolgreiche *in vitro* DNA-Mutagenese anhand der Plasmid-Fragmente der mutierten c-rel-Sequenz (3955, 1203, 660, 606, 504 bp) von der Wildtyp-c-rel-Sequenz (3919, 1203, 1164, 642) elektrophoretisch anhand eines 2,5 %igen Agarose-Gels nachgewiesen werden.

3.4.5. DNA-Gelelektrophorese

DNA-Gelelektrophoresen dienten der Auftrennung von DNA-Fragmenten und erfolgten anhand von 1,0 - 2,5 %igen (w/v) Agarose-Gelen (Abb. 13). Dazu wurde die zu überprüfende DNA mit dem entsprechenden Auftragspuffer vermischt und elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (1 μ g/ml 1x TAE-Puffer) wurden DNA-Fragmente im UV-Licht sichtbar gemacht. Zur Archivierung wurden die Agarose-Gele auf einem UV-Tisch mit der entsprechenden Software und Kamera (UVsolo) fotografiert und elektronisch archiviert.

DNA-Auftragspuffer:	0,1 M	EDTA
	50 % (w/v)	Saccharose
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,1 % (v/v)	Xylencyanol FF
	in H ₂ O, pH 8,0	
50 x TAE-Puffer:	2 M	Tris-HCl, pH 7,9
	0,5 M	Natriumacetat
	2 mM	EDTA

3.4.6. Nachweis der differentiellen Genexpression in humanen Ovarialkarzinomzellen mittels cDNA *Expression Microarray*-Analyse

Human Atlas™ cDNA Expression Microarray-Analysen sind von Hapke et al. ausgeführt und beschrieben worden, um den Einfluss der Integrin avß3-spezifischen intrazelluären Signaltransduktionen auf die differentielle Genexpressionen in humanen Ovarialkarzinomzellen zu bestimmen (Hapke et al. 2003). Dafür wurden cDNA-Filter eingesetzt, die cDNA von 588 Genen aus verschiedensten Zellfunktionsbereichen enthielten. Gesamt-RNA wurde aus Vektor- und Integrin avß3-überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen, die auf un- und VN-beschichteten Zelkulturplatten kultiviert wurden, isoliert und in cDNA umgeschrieben. Human Atlas™ cDNA Expression Microarray-Analysen sind nach Angaben des Herstellers in leicht abgewandelter Form durchgeführt worden (Hapke 2000). Die mittels Phosphorimager-Analyse erhaltenen Signale wurden anhand des Quotienten mit dem Signal für das house keeping gene GAPDH (Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase) normalisiert.

4. ERGEBNISSE

4.1. Charakterisierung der Integrin αvß3-abhängigen Expression des EGF-R

4.1.1. Untersuchungen des EGF-R auf der mRNA-Ebene mittels cDNA *Expression Microarray*-Analyse

Die Etablierung stabiler Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 sowie die anschließende cDNA Expression Microarray-Analyse sollen hier erwähnt werden, da sie die Basis für die nachfolgend beschriebenen Studien der vorliegenden Arbeit bildeten (Hapke 2000, Hapke et al. 2003). Der Einfluss des Integrins $\alpha v\beta 3$ auf die Genexpression wurde in OV-MZ-6-Zellen charakterisiert, die das Integrin avß3 nach stabiler Transfektion überexprimierten. Als Kontrolle dienten OV-MZ-6-Zellen, die mit einem Leervektor transfiziert waren, demzufolge eine den Wildtypzellen vergleichbare Integrin avß3-Expression aufwiesen (Abb. 15 A). Hierzu wurden cDNA Expression Microarray-Analysen in Abhängigkeit von der Integrin avß3-Expression und An- bzw. Abwesenheit des Integrin αvβ3-Liganden VN durchgeführt. Nach Normalisierung der erhaltenen Hybridisierungssignale für die 588 Gene aus unterschiedlichen zellulären Funktionsbereichen gegen das house keeping gene GAPDH (Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase) wurde neben anderen Kandidatengenen der EGF-R als differentiell reguliertes Gen als Funktion des Integrins avß3 identifiziert (Abb. 15 B).



Abb. 15. A. Nachweis der Überexpression des Integrins αvβ3 nach stabiler Transfektion humaner Ovarialkarzinomzellen. Anhand von immuncytochemischen Untersuchungen wurden

stabile Integrin $\alpha\nu\beta3$ -überexprimierende sowie mit dem Leervektor-transfizierte OV-MZ-6-Zellen mit Hilfe der CLSM ausgewählt. Ein bis zu 8-facher Anstieg der Expression des Integrins $\alpha\nu\beta3$ wurde in den $\alpha\nu\beta3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen im Vergleich zu den Leervektor-Transfektanten gemessen. **B. Untersuchung der Integrin \alpha\nu\beta3-abhängigen differentiellen Genexpression in humanen Ovarialkarzinomzellen.** Stabil Integrin $\alpha\nu\beta3$ - und Vektor-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden mittels cDNA *Expression Microarray* hinsichtlich ihrer Genexpressionsmuster in Abhängigkeit von der Integrin $\alpha\nu\beta3$ -Expression analysiert. Aus den Zellklonen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, um den cDNA *Expression Microarray* durchzuführen. Die verwendeten cDNA-Filter enthielten 588 Gene aus unterschiedlichen zellulären Funktionsbereichen. Mit Hilfe eines Phosphorimagers konnten die Signalstärken der verschiedenen Hybridisierungsbanden auf den cDNA-Filtern ermittelt werden. Dabei fiel nach Normalisierung mit den erhaltenen Signalen für das *house keeping gene* GAPDH auf, dass u.a. der EGF-R als Funktion des Integrins $\alpha\nu\beta3$ differentiell reguliert ist.

4.1.2. Untersuchungen zur Integrin αvβ3-abhängigen Expression des EGF-R mittels ICC

Der Einfluss des Integrins avß3 auf die Expression des EGF-R-Proteins in humanen Ovarialkarzinomzellen wurde zunächst mittels Immunfluoreszenzfärbungen und Auswertung am CLSM analysiert. Dafür wurden sowohl Integrin avß3- als auch Vektor-transfizierte Zellen auf un- bzw. VN-beschichteten Glasobjektträgern ausgesät und die Expression des EGF-R mit einem mAk, der gegen den EGF-R gerichtet ist, nachgewiesen. Dabei zeigten Vektor-transfizierte Zellen mit niedrigen Integrin avß3-Spiegeln eine moderate EGF-R-Expression, die unabhängig von der zugrunde liegenden Matrix war. In OV-MZ-6-Zellen, die eine bis zu 8-fach gesteigerte Integrin avß3-Expression aufwiesen, war die EGF-R-Expression drastisch erhöht. Nach Zelladhäsion an VN und Aktivierung des Integrins avß3 war die Expression des EGF-R noch weiter markant verstärkt (Abb. 16 A). Um gleichzeitig den Aktivierungsstatus des EGF-R als Funktion des Integrins avß3 zu bestimmen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit einem mAk durchgeführt, der nur die phosphorylierte und somit aktivierte Form des EGF-R erkennt. Die Überexprimierung des Integrins avß3 in OV-MZ-6-Zellen führte zu einer vermehrten Phosphorylierung des EGF-R im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen. Dabei war die Aktivität des EGF-R in den Integrin avß3transfizierten Zellen, die an VN adhäriert hatten, zusätzlich erhöht (Abb. 16 B).



Abb. 16. Detektion der Expression des EGF-R als Funktion des Integrins avß3 in humanen Ovarialkarzinomzellen mittels ICC und Auswertung am CLSM. Integrin avß3- bzw. Vektortransfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden auf un- bzw. VN-beschichteten Glasobjektträgern kultiviert und die Expression des EGF-R (A) und seiner phosphorylierten Form (B) immuncytochemisch mit einem mAk, der entweder den EGF-R oder ausschließlich die phosphorylierte (aktivierte) Form des EGF-R erkennt, nachgewiesen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm mittels CLSM beurteilt und jeweils als repräsentatives Transmissionsbild zusammen mit dem dazugehörigen Fluoreszenzbild dargestellt. Die Fluoreszenzstärke konnte mit Hilfe einer entsprechenden CLSM Software und durch eine look-up table, die die Farbintensitäten in Pseudofarben umwandelt, visualisiert werden. Ein schwaches Fluoreszenzsignal wurde durch eine rote Färbung wiedergegeben, eine mittlere Fluoreszenz entsprach einer Gelbfärbung und ein starkes Fluoreszenzsignal wurde durch die weiße Farbe verdeutlicht. Die EGF-R-Expression war in Integrin avß3-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen drastisch erhöht. Nach Adhäsion an VN und dadurch Aktivierung des Integrins αvβ3 war eine weitere Zunahme der EGF-R-Expression in den Integrin $\alpha\nu\beta3$ -überexprimierenden Zellen sichtbar (A). Unter Verwendung eines mAk, der nur die phosphorylierte (aktivierte) Form des EGF-R detektiert, war ein prominenter Anstieg der Phosphorylierung als Funktion der Integrin avß3-Expression messbar, der nach Adhäsion an VN weiter erhöht war (B).

4.1.3. Untersuchungen zur Integrin αvß3-abhängigen Expression des EGF-R mittels Western Blot-Analyse

Zur Durchführung von Western-Blot-Analysen wurden Vektor- und Integrin avß3transfizierte OV-MZ-6-Zellen auf VN-, FN oder Kol I-beschichteten Zellkulturplatten kultiviert, nach verschiedenen Adhäsionszeiten (0.5; 1; 2; 4; 9; 24 Std.) lysiert und die Expression des EGF-R durch einen anti-EGF-R mAk detektiert. In Integrin avß3überexprimierenden Zellen war im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen eine 2-fache Zunahme der EGF-R-Proteinexpression nachweisbar (Abb. 17 A). Durch die Gegenwart des Integrin avß3-Liganden VN war die Expression des EGF-R in Integrin avß3überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen bereits nach 2 bis 4 Std. 4,5-fach erhöht und nach 24 Std. nicht weiter induzierbar (Abb. 17 B). Nachdem das EGF-R-Protein durch einen mAk nachgewiesen wurde, wurde die Antigen-Antikörper-Reaktion aufgehoben und ein mAk, der nur das phosphorylierte EGF-R-Protein erkennt, auf derselben Membran inkubiert, um den Aktivierungsstatus des EGF-R zu bestimmen. Außerdem wurde der Gehalt des Zytoskelettproteins ß-Aktin durch einen anti-ß-Aktin pAk ermittelt. Eine 2-fache Induzierung der Expression der phosphorylierten EGF-R-Form war in Integrin avß3-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen detektierbar, die durch Anwesenheit des Integrin avß3-Liganden VN in Integrin avß3transfizierten Zellen nach 4 bis 6 Std. nicht zusätzlich erhöht war (Abb. 18). Überdies wurden Vektor- und Integrin avß3-transfizierte OV-MZ-6-Zellen neben VN auch auf Kol I- oder FNbeschichteten Zellkulturplatten kultiviert, was jedoch ohne Auswirkung auf die Proteinexpression des (aktivierten) EGF-R blieb (nicht abgebildet).





Abb. 17. Nachweis des EGF-R in humanen Ovarialkarzinomzellen als Funktion der Integrin avß3-Expression mittels Western Blot-Analyse. Die Proteinexpression des EGF-R wurde in Western Blot-Analysen aus Zelllysaten von OV-MZ-6-Zellen untersucht. Vektor- und Integrin avß3transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden auf un-, VN-, FN oder Kol I-beschichteten Zellkulturplatten kultiviert, nach bestimmten Adhäsionszeiten (0,5; 1; 2; 4; 9; 24 Std.) lysiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und das EGF-R-Protein mittels eines mAk, der gegen den EGF-R gerichtet ist, nachgewiesen. Zur Normalisierung von Schwankungen in der Proteinkonzentration sowie Blottingeffizienz wurde parallel der ß-Aktin-Gehalt bestimmt (A, B). Die Signalintensitäten der Banden für EGF-R und ß-Aktin wurden densitometrisch ausgewertet und Ouotienten aus den Werten des EGF-R und B-Aktin gebildet. Der ermittelte Ouotient nach einer Adhäsionszeit von 0,5 Std. wurde als Ausgangswert herangezogen, um die n-fache Induzierung der EGF-R-Expression angeben zu können. Die dargestellten Daten beziehen sich auf Mittelwerte aus bis zu fünf verschiedenen Western Blot-Analysen für Vektor- (A) und Integrin αvβ3-transfizierte (B) Zellen auf un- (n = 4, \pm SD) bzw. VN-beschichteten (n = 5, \pm SD) Zellkulturplatten. Die Proteinexpression des EGF-R war durch die Integrin avß3-Expressionshöhe 2-fach erhöht. Nach Integrin avß3/VN-Interaktion war die EGF-R-Expression zusätzlich induzierbar und 4,5-fach gesteigert. In Vektor-transfizierten Zellen hatte die Adhäsion an VN keinen verstärkenden Effekt auf die EGF-R-Expression (A, B).




Abb. 18. Nachweis des phosphorylierten EGF-R in humanen Ovarialkarzinomzellen als Funktion der Integrin avß3-Expression mittels Western Blot-Analyse. Die Proteinexpression des phosphorylierten EGF-R wurde in Western Blot-Analysen aus Zelllysaten von OV-MZ-6-Zellen untersucht. Vektor- und Integrin avß3-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden auf un-, VN-, FN oder Kol I-beschichteten Zellkulturplatten kultiviert, nach bestimmten Adhäsionszeiten (0,5; 1; 2; 4; 9; 24 Std.) lysiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und das phosphorylierte EGF-R-Protein mittels eines mAk, der die aktivierte EGF-R-Form erkennt, nachgewiesen. Zur Normalisierung von Schwankungen in der Proteinkonzentration sowie Blottingeffizienz wurde parallel der ß-Aktin-Gehalt bestimmt (A, B). Die Signalintensitäten der Banden für EGF-R und ß-Aktin wurden densitometrisch ausgewertet und Quotienten aus den Werten des phosphorylierten EGF-R und ß-Aktin gebildet. Der ermittelte Quotient nach einer Adhäsionszeit von 0,5 Std. wurde als Ausgangswert herangezogen, um die n-fache Induzierung der Expression der phosphorylierten EGF-R-Form angeben zu können. Die dargestellten Daten beziehen sich auf Mittelwerte aus vier verschiedenen Western Blot-Analysen für die Vektor- (A) und Integrin avß3transfizierte (B) Zellen auf un- bzw. VN-beschichteten ($n = 4, \pm SD$) Zellkulturplatten. Die Phosphorylierung des EGF-R war durch die Integrin avß3-Expressionshöhe erhöht. Die phosphorylierte EGF-R-Form war nach Integrin avß3/VN-Interaktion 2-fach induzierbar. In Vektortransfizierten Zellen hatte die Adhäsion an VN keinen verstärkenden Effekt auf die Expression der phosphorylierten EGF-R-Form (A, B).

4.1.4. Untersuchungen zur Integrin αvβ3-abhängigen Modulierung der EGF-R-Expression mittels ELISA

Vektor- und Integrin $\alpha\nu\beta$ 3-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden auf VN- oder Kol Ibeschichteten Zellkulturplatten kultiviert, nach verschiedenen Adhäsionszeiten (0,5; 1; 2; 4; 9; 24 Std.) lysiert und der EGF-R-Gehalt mittels ELISA bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass der Gehalt des EGF-R-Proteins in Abhängigkeit von der Integrin $\alpha\nu\beta$ 3/VN-Interaktion zunahm. Ein 3-facher Anstieg der EGF-R-Expression konnte durch Wechselwirkung zwischen dem Integrin $\alpha\nu\beta$ 3 und den EZM-Liganden VN sowie Kol I gemessen werden (Abb. 19). Die



Ergebnisse der ELISA-Bestimmungen stimmten mit den Daten aus den Western-Blot-Analysen überein.

Abb. 19. Detektion der EGF-R-Expression in humanen Ovarialkarzinomzellen als Funktion des Integrins $\alpha\nu\beta3$ mittels ELISA. Die Proteinexpression des EGF-R wurde in Zelllysaten von OV-MZ-6-Zellen mittels eines spezifischen EGF-R-ELISA gemessen. Vektor- und Integrin $\alpha\nu\beta3$ -transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden auf VN- (A) und Kol I-beschichteten (B) Zellkulturplatten kultiviert und nach verschiedenen Adhäsionszeiten (0,5; 1; 2; 4; 9; 24 Std.) lysiert. Die Proteinkonzentration des EGF-R konnte anhand einer Standardkurve ermittelt werden. Die Adhäsionszeit von 0,5 Std. wurde als Ausgangswert herangezogen, um die n-fache Induktion der Proteinexpression des EGF-R angeben zu können. Ein 3-facher Anstieg des EGF-R-Proteins war durch Adhärenz an VN und Kol I in Abhängigkeit von der Integrin $\alpha\nu\beta3$ -Expressionshöhe messbar.

4.1.5. Untersuchungen der EGF-R-Promotoraktivität als Funktion des Integrins avß3

Für Studien zur Analyse der EGF-R-Promotoraktivität standen Reportergen-Konstrukte des EGF-R-Promotors zur Verfügung, die durch Prof. Dr. Esther Gonzalez (Division of Nephrology, Saint Louis Universität School of Medicine, St. Louis, MO, USA) bereitgestellt wurden (Haley et al. 1987). Die Aktivität des längsten Promotorkonstrukts des EGF-R, das 1104 bp umfasst, wurde unter Verwendung eines dualen Luziferase-Reportergen-Assays als Funktion des Integrins $\alpha v\beta 3$ in humanen Ovarialkarzinomzellen bestimmt. Wildtyp- sowie Vektor- und Integrin $\alpha v\beta 3$ -transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden bis zu einer Zellkonfluenz von 30 - 60 % kultiviert und anschließend Magnetotransfektionen durchgeführt. Die auf der Proteinebene beobachtete Induzierung des EGF-R in Abhängigkeit von der Integrin $\alpha v\beta 3$ -Expressionshöhe konnte durch Reportergen-Analysen bis auf die Ebene der EGF-R-Promotoraktivität zurückverfolgt werden. Die Aktivität des EGF-R-Promotors war durch Überexprimierung des Integrins $\alpha v\beta 3$ 3,3-fach (n= 5, SD ± 0,5) im Vergleich zu Wildtyp- und

Vektor-transfizierten OV-MZ-6-Zellen erhöht. Um Integrin avß3-konzentrationsabhängige Effekte auf die EGF-R-Promotoraktivität zu überprüfen, wurden verschiedene Zelltransfektanten, die graduell ansteigende Integrin avß3-Spiegel aufwiesen, mit dem EGF-R-Promotor-Reportergen-Konstrukt transfiziert. Die Aktivität des EGF-R-Promotors korrelierte mit der Integrin avß3-Expressionshöhe (Abb. 20 A). Im Gegensatz zur Beobachtung auf der EGF-R-Proteinebene wurde auf der transkriptionellen Ebene keine Induzierung der EGF-R-Promotoraktivität nach Aktivierung des Integrins avß3 durch VN sichtbar. Auch nach Zelladhäsion an Kol I wurde, wie erwartet, keine weitere Veränderung der Integrin avß3-induzierbaren EGF-R-Promotoraktivität gemessen (Abb. 20 B).



Abb. 20. A. Nachweis der EGF-R-Promotoraktivität in humanen Ovarialkarzinomzellen als Funktion des Integrins avß3. Die transkriptionelle Kontrolle des EGF-R-Gens durch das Integrin avß3 wurde durch Bestimmung der Promotoraktivität des EGF-R mittels dualer Luziferase-Reportergen-Assays überprüft. Wildtyp- sowie Vektor- und Integrin avß3-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden kultiviert und transiente Transfektionen, wie unter Material & Methoden beschrieben, mittels Magnetotransfektion durchgeführt. Die aufgeführten Daten sind jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen des Quotienten aus Firefly und Renilla Luziferase (± SD). Die Erhöhung des Proteinspiegels des EGF-R in Abhängigkeit der Integrin αvβ3-Expression war auf das Niveau der Promotoraktivität des EGF-R zurückverfolgbar. Die Gentranskription des EGF-R war durch das Integrin $\alpha v\beta 3$ 3,3-fach (n= 5, SD ± 0,5) induzierbar. **B. Bestimmung der EGF-R-Promotoraktivität** als Funktion des Integrins avß3 in Anwesenheit verschiedener EZM-Liganden. Vektor- und Integrin avß3-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden auf un-, VN- oder Kol I-beschichteten Zellkulturplatten kultiviert und transiente Transfektionen, wie unter Material & Methoden beschrieben, mittels Magnetotransfektion durchgeführt. Die abgebildeten Daten sind jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen des Quotienten aus der Firefly und Renilla Luziferase (exemplarisch für n = 3, \pm SD). Die Integrin $\alpha\nu\beta3$ -abhängige Promotoraktivität des EGF-R war durch Zelladhäsion an VN (SD \pm 0,024) und Kol I (SD \pm 0,089) im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle (SD ± 0,64) nicht zusätzlich induzierbar. In Vektor-transfizierten OV-MZ-6-Zellen war kein Effekt durch VN- oder Kol I-Beschichtung messbar.

4.1.6. Untersuchungen zur Integrin αvβ3-vermittelten EGF-R-Promotoraktivität in Abhängigkeit von der Promotorlänge

Zur Eingrenzung der Integrin avß3-vermittelten Induzierung der EGF-R-Promotoraktivität auf bestimmte EGF-R-Promotorabschnitte und daran gekoppelter Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren wurden 5'-verkürzte EGF-R-Promotorkonstrukte mittels Reportergen-Analysen untersucht. Das längste Promotorkonstrukt des EGF-R entspricht 1104 bp, die nächsten 5'-verkürzten Fragmente des EGF-R-Promotors haben folgende Größen: 729 bp (Pst I - Sac I), 479 bp (Bsu 36I - Sac I) und 246 bp (Aat II - Sac I) (Abb. 21 A). Das 729 bp-Promotorkonstrukt des EGF-R zeigte in Vektor- und Integrin avß3-transfizierten Zellen die höchste Aktivität, gefolgt von den 1104 bp-, 479 bp- und 246 bp-Promotorkonstrukten. Interessanterweise befindet sich das DNA-Bindungsmotiv des EGF-R transkriptionellen Repressors ETR außerhalb der Sequenz des 729 bp-Fragments. Die Aktivitäten aller Konstrukte des EGF-R-Promotors, außer denen des kürzesten EGF-R-Konstrukts, wurden in abhängig von der Integrin avß3-Expression gesteigert. Das Ausmaß der Integrin avß3vermittelten Induzierung der EGF-R-Promotoraktivität im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen war im längsten Promotorkonstrukt am stärksten. Die Integrin avß3-induzierte EGF-R-Promotoraktivität des 729 bp-Fragments lag nur geringfügig über der Integrin avß3induzierten EGF-R-Promotoraktivität des längsten Promotorkonstrukts. Die Integrin avß3abhängige Aktivität des 479 bp-Fragments des EGF-R-Promotors war vergleichbar mit der EGF-R-Promotoraktivität des längsten Konstrukts in Vektor-transfizierten Zellen. Das kürzeste Promotorkonstrukt des EGF-R zeigte keine Integrin avß3-Induzierbarkeit mehr (Abb. 21 B).



Abb. 21. A. Schema der EGF-R-Promotorkonstrukte. Die schrittweise Verkürzung des EGF-R-Promotors resultierte in vier unterschiedlich langen Promotorkonstrukten: 1104 bp, 729 bp, 479 bp sowie 246 bp (verändert nach Haley et al. 1987). **B. Bestimmung der EGF-R-Promotoraktivität in Abhängigkeit verschieden langer Promotorkonstrukte als Funktion des Integrins αvß3.** Vektor-

und Integrin $\alpha\nu\beta3$ -transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden kultiviert und transiente Transfektionen, wie unter Material & Methoden beschrieben, mittels Magnetotransfektion durchgeführt. Die aufgeführten Daten sind jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen des Quotienten aus *Firefly* und *Renilla* Luziferase aus verschiedenen Reportergen-Analysen (n = 3, ± SD). Die EGF-R-Promotoraktivität des 1104 bp-Promotorkonstrukts in Vektor-transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Die größte EGF-R-Promotoraktivität zeigte das 729 bp-Promotorkonstrukt, gefolgt von den 1104 bp-, 479 bpund 246 bp-Promotorkonstrukten des EGF-R in Vektor- und Integrin $\alpha\nu\beta3$ -transfizierten Zellen. Die Abhängigkeit der EGF-R-Promotoraktivität von der Integrin $\alpha\nu\beta3$ -Expressionshöhe war im 1104 bp-Promotorkonstrukt am stärksten, gefolgt von den 729 bp- und 479 bp- Promotorkonstrukten und ging mit dem 246 bp-Promotorkonstrukt verloren. Das kürzeste EGF-R-Promotorkonstrukt zeigte in Vektor- und Integrin $\alpha\nu\beta3$ -transfizierten Zellen keine Aktivität mehr.

4.1.7. Untersuchungen der Effekte des Integrins avß3 auf EGF-R-Promotormutanten

Um den Einfluss des Integrins $\alpha v\beta 3$ auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren im EGF-R-Promotor näher zu charakterisieren, wurden verschiedene DNA-Konsensusmotive für p53, crel, p50, ETF und ETR innerhalb der Sequenz des EGF-R-Promotors durch mehrere Basenaustausche mutiert und mittels Reportergen-Studien analysiert. Da die Integrin $\alpha v\beta 3$ vermittelte Induzierung des Proteinspiegels des EGF-R auf die Ebene der Promotoraktivität des EGF-R zurückgeführt werden konnte, sollten mögliche DNA-Elemente, die für die Abhängigkeit der EGF-R-Promotoraktivität von der Integrin $\alpha v\beta 3$ -Expressionshöhe verantwortlich sind, identifiziert werden. Deshalb wurden gezielte Basenaustausche innerhalb der DNA-Bindungssequenzen der Transkriptionsfaktoren p53, c-rel, p50, ETF und ETR mittels *site-directed in vitro* Mutagenese durchgeführt, um deren Effekte auf die Aktivität des EGF-Promotors in Abhängigkeit der Integrin $\alpha v\beta 3$ -Expressionshöhe zu bestimmen (Abb. 22 A).

Die Aktivität der p50-Mutante war vergleichbar mit der Aktivität des Wildtyp-EGF-R-Promotors in Vektor- und Integrin avß3-transfizierten Zellen. Anhand der c-rel-Mutante wurde die Aktivität des EGF-R-Promotors nahezu vollständig um ca. 80 % sowohl in Vektorals auch Integrin avß3-transfizierten Zellen reduziert. Die Aktivität der p53-Mutante, die eine um 35 % niedrigere Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-EGF-R-Promotor in Vektortransfizierten Zellen aufwies, war durch das Integrin avß3 induzierbar. Da in der Sequenz des EGF-R-Promotors die benachbarten DNA-Bindungsmotive von p50 bzw. ETF teilweise überlappen, wurde mittels *site-directed in vitro* Mutagenese des ETF-Konsensusmotivs gleichzeitig die p50-Konsensussequenz zerstört und folglich eine ETF/p50-Doppelmutante zur Aktivität des Wildtyp-EGF-R-Promotors. Die detektierte Verringerung der Aktivität der ETF/p50-Doppelmutante resultierte aus dem mutierten ETF-Konsensusmotiv, da die p50Mutante die EGF-R-Promotoraktivität nicht beeinflusste. Überdies war die Aktivität der ETF/p50-Doppelmutante in Integrin $\alpha\nu\beta3$ -transfizierten Zellen immer noch induzierbar. Die Mutation des ETR-Konsensusmotivs führte wie erwartet zu einer Erhöhung der EGF-R-Promotoraktivität in den Vektor-transfizierten Zellen, die in den Integrin $\alpha\nu\beta3$ -transfizierten Zellen zusätzlich gesteigert wurde und vergleichbar mit der Aktivität des Wildtyp-EGF-R-Promotors war (Abb. 22 B). Des Weiteren wurde eine p50/c-rel-Doppelmutante mittels *site-directed in vitro* Mutagenese ausgehend von der p50-DNA-Matrize unter Verwendung der c-rel-Oligonukleotid-Primer generiert. Die Aktivität der p50/c-rel-Doppelmutante war vergleichbar mit der Aktivität in Integrin $\alpha\nu\beta3$ -transfizierten Zellen, was wahrscheinlich dem mutierten c-rel-Konsensusmotiv zuzuordnen war (Daten nicht abgebildet)

A

1059

Hind III p53
$\underline{aagctt} ccgcgagtttccc \underline{tggcatttct} cctgcgggagctacaggggcagtgggacacttagcctctctaaaagcacctccacggctgtttgtgtcaagcctttatt$
$ccaagagcttcacttttgcgaagtaatgtgcttcaacattggcttcaaagtacccatggctggttgcaataaacattaaggaggcctgtctctgcacccggagttggg\\ {\tt ETR}$
tgccetcattteagatgat <u>ttegaggg</u> tgettgacaagatetgaaggaeceteggaetttagageaeceteggaegeetggeaeceteggegegegegegegegegegegegegegegegege
$cgacctcctcagctgccaggccagcctctgatccccgcgagggtcccgtagtg \underline{ctgcag}ggaggtggggacccgaataaaggagcagtttccccgtcggtgccgaggtggggacccgaataaaggagcagtttccccgtcggtgccgaggtggggaggtggggacccgaataaaggagcagtttccccgtcggtgccgaggtggggaggtggggacccgaataaaggagcagtttccccgtcggtgccgaggtggggaggtggggacccgaataaaggagcagtttccccgtcggtgccgaggtggggaggtggggacccgaataaaggagcagtttccccgtcggtgccgaggtggggaggtggggaggtggggaggtggggacccgaataaaggagcagtttccccgtcggtgccgaggtggggaggtggggaggtggggaggtggggaggtggggaggggaggtggggagggggaggggaggtggggaggggaggggagga$
cattatccgacgctggctctaaggctcggccagtctgtct
$atttggctcgacctggacataggctgggcctgcaagtccgcggggaccgggtccagaggggcagtgctgggaacgcccccctctcggaaattaact \underline{cctcagg}gaccggggccggggcagtgctgggaacgccccccctctcggaaattaact \underline{cctcagg}gaccggggcagtgctgggaacgcgcccccccctccggaaattaact \underline{cctcagg}gaccggggcagtgctgggaccggggcagtgctgggaacgcccccccc$
cacceget ceccet cecatgegecgeccecatteegecggagactaggtcccgeggggggccaccgetgtccaccgectccggcggccgctggccttgggtccccgetggggggccaccgetgtecaccgetggecgetggccttgggtccccgetgggggggggg
getgetggtteteeteeteeteeteeteeteeteeteete
cccgcgcgagctagacgtccgggcggcgcggcggcgcgcgc
ggagtcccgagctagccccggcggccgccgccgccgagacggacg
Sac I EcoR I Pst I Sma I BamH I Spe I
accaccgcgcacggccccctgactccgtccagtattgatcgggagagccggagcgagc



Abb. 22. A. Bindungsstellen der DNA-Konsensusmotive der Transkriptionsfaktoren innerhalb der EGF-R-Promotorsequenz. Da der EGF-R-Promotor mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagieren und dessen Aktivität durch DNA-Elemente beeinflusst werden kann, wurden Mutationen innerhalb der DNA-Konsensusmotife des 1104 bp-EGF-R-Promotorkonstrukts mittels site-directed in vitro Mutagenesen generiert. Durch einzelne Basenaustausche wurden DNA-Konsensusmotife der Transkriptionsfaktoren p53, ETR, c-rel, p50 und ETF so verändert, dass eine Erkennung und Bindung an die entsprechende DNA-Sequenz innerhalb der EGF-R-Promotors nicht mehr möglich war. Außerdem sind die Restriktionsschnittstellen des Reportergen-Vektors pUV102 Hind III (1059) und Spe I (1065), zwischen denen der EGF-R-Promotor eingefügt wurde, sowie der verkürzten EGF-Promotorkonstrukte Pst I, Bsu36 I und Aat II abgebildet. B. Nachweis der Aktivität verschiedener EGF-R-Promotormutanten in Abhängigkeit des Integrins avß3. Vektor- und Integrin avß3transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden kultiviert und transiente Transfektionen, wie unter Material & Methoden beschrieben, mittels Magnetotransfektion durchgeführt. Die aufgeführten Daten sind jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen des Quotienten aus Firefly und Renilla Luziferase aus verschiedenen Reportergen-Analysen (n = $3, \pm$ SD). Eine Reduzierung der Promotoraktivität des EGF-R wurde durch c-rel- und p53-Mutanten sowie die ETF/p50-Doppelmutate in Vektor-transfizierten Zellen erreicht. Eine Integrin avß3-abhängige Induzierung der Promotoraktivität des EGF-R zeigten die p53-, ETR- und p50-Mutanten sowie die ETF/p50-Doppelmutante. Durch die c-rel-Mutante war die Aktivität des EGF-R-Promotors fast vollständig in Vektor- und Integrin avß3-transfizierten Zellen herabgesetzt.

4.2. Charakterisierung der Integrin avß3-abhängigen Expression der ILK

4.2.1. Untersuchungen der ILK auf der mRNA-Ebene mittels cDNA *Expression Microarray*-Analyse

Die Etablierung stabiler Transfektanten der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 sowie die Durchführung der cDNA *Expression Microarray*-Analyse wurden bereits im Kapitel 4.1.1. beschrieben. Anhand der cDNA *Expression Microarray*-Analyse wurde neben anderen Kandidatengenen und dem EGF-R die ILK als differentiell reguliertes Gen als Funktion des Integrins αvß3 identifiziert (Abb. 23).



Abb. 23. A. Nachweis der Überexpression des Integrins $\alpha v\beta 3$ nach stabiler Transfektion humaner Ovarialkarzinomzellen. Anhand von immuncytochemischen Untersuchungen wurden stabile Integrin $\alpha v\beta 3$ -überexprimierende sowie mit dem Leervektor-transfizierte OV-MZ-6-Zellen mit Hilfe der CLSM ausgewählt. Ein bis zu 8-facher Anstieg der Expression des Integrins $\alpha v\beta 3$ wurde in den $\alpha v\beta 3$ -überexprimierenden OV-MZ-6-Zellen im Vergleich zu den Leervektor-Transfektanten gemessen. B. Untersuchung der Integrin $\alpha v\beta 3$ -abhängigen differentiellen Genexpression in humanen Ovarialkarzinomzellen. Stabil Integrin $\alpha v\beta 3$ - und Vektor-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden mittels cDNA *Expression Microarray* hinsichtlich ihrer Genexpressionsmuster in Abhängigkeit von der Integrin $\alpha v\beta 3$ -Expression analysiert. Aus den Zellklonen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, um den cDNA *Expression Microarray* durchzuführen. Die verwendeten cDNA-Filter enthielten 588 Gene aus unterschiedlichen zellulären Funktionsbereichen. Mit Hilfe eines Phosphorimagers konnten die Signalstärken der verschiedenen Hybridisierungsbanden auf den cDNA-Filtern ermittelt werden. Dabei fiel nach Normalisierung mit den erhaltenen Signalen für das *house keeping gene* GAPDH auf, dass u.a. die ILK als Funktion des Integrins $\alpha v\beta 3$ differentiell reguliert ist.

4.2.2. Untersuchungen zur Integrin avß3-abhängigen Expression der ILK mittels ICC

Der Einfluss des Integrins $\alpha\nu\beta3$ auf die Expression des ILK-Proteins in humanen Ovarialkarzinomzellen wurde zunächst mittels Immunfluoreszenzfärbungen und Auswertung am CLSM analysiert. Hierzu wurden sowohl Integrin $\alpha\nu\beta3$ - als auch Vektor-transfizierte Zellen auf un- bzw. VN-beschichteten Glasobjektträgern ausgesät und die Expression der ILK mit einem pAk, der gegen die ILK gerichtet ist, nachgewiesen. Dabei zeigten Vektortransfizierte Zellen mit niedrigen Integrin $\alpha\nu\beta3$ -Spiegeln eine schwache ILK-Expression unabhängig vom Adhäsionssubstrat. In OV-MZ-6-Zellen, die eine bis zu 8-fach gesteigerte Integrin $\alpha\nu\beta3$ -Expression aufwiesen, war die ILK-Expression deutlich erhöht. Nach Zelladhäsion an VN und Aktivierung des Integrins $\alpha\nu\beta3$ war die Expression der ILK zusätzlich gesteigert (Abb. 24).



Abb. 24. Detektion der Expression der ILK als Funktion des Integrins $\alpha v\beta 3$ in humanen Ovarialkarzinomzellen mittels ICC und Auswertung am CLSM. Integrin $\alpha v\beta 3$ - bzw. Vektortransfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden auf un- bzw. VN-beschichteten Glasobjektträgern kultiviert und die Expression der ILK immuncytochemisch mit einem pAk nachgewiesen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm mittels CLSM beurteilt und jeweils als repräsentatives Transmissionsbild zusammen mit dem dazugehörigen Fluoreszenzbild dargestellt. Die Fluoreszenzstärke konnte mit Hilfe einer entsprechenden CLSM Software und durch eine *look-up table*, die die Farbintensitäten in Pseudofarben umwandelt, visualisiert werden. Ein schwaches Fluoreszenzsignal wurde durch eine rote Färbung wiedergegeben, eine mittlere Fluoreszenz entsprach einer Gelbfärbung und ein starkes Fluoreszenzsignal wurde durch die weiße Farbe verdeutlicht. Die ILK-Expression war in Integrin $\alpha v\beta 3$ -überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Vektortransfizierten Zellen deutlich erhöht. Nach Adhäsion an VN und dadurch Aktivierung des Integrins $\alpha v\beta 3$ war eine weitere schwache Zunahme der ILK-Expression in den Integrin $\alpha v\beta 3$ überexprimierenden Zellen sichtbar.

4.2.3. Untersuchungen zur Integrin αvβ3-abhängigen Expression der ILK mittels Western Blot-Analyse

Zur Durchführung von Western-Blot-Analysen wurden Vektor- und Integrin $\alpha v\beta 3$ transfizierte OV-MZ-6-Zellen auf VN-, FN oder Kol I-beschichteten Zellkulturplatten kultiviert, nach verschiedenen Adhäsionszeiten (0,5; 1; 2; 4; 9; 24 Std.) lysiert und die Expression der ILK durch einen anti-ILK pAk detektiert. Außerdem wurde der Gehalt des Zytoskelettproteins β-Aktin durch einen anti-β-Aktin pAk ermittelt. In Integrin $\alpha v\beta 3$ überexprimierenden Zellen war im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen eine 1,5-fache Zunahme der ILK-Proteinexpression nach 4 Std. nachweisbar (Abb. 25 A, B). Durch die Gegenwart des Integrin $\alpha v\beta 3$ -Liganden VN war die Expression der ILK in Integrin $\alpha v\beta 3$ überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen nach 4 bzw. 9 Std. nicht zusätzlich induzierbar (Abb. 25 B). Überdies wurden Vektor- und Integrin $\alpha v\beta 3$ transfizierte OV-MZ-6-Zellen neben VN auch auf Kol I- oder FN-beschichteten Zellkulturplatten kultiviert, was jedoch ohne Auswirkung auf die Proteinexpression der ILK blieb (nicht abgebildet).



Abb. 25. Nachweis der ILK in humanen Ovarialkarzinomzellen als Funktion der Integrin avß3-Expression mittels Western Blot-Analyse. Die Proteinexpression der ILK wurde in Western Blot-Analysen aus Zelllysaten von OV-MZ-6-Zellen untersucht. Vektor- und Integrin avß3-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden auf un-, VN-, FN oder Kol I-beschichteten Zellkulturplatten kultiviert, nach bestimmten Adhäsionszeiten (0,5; 1; 2; 4; 9; 24 Std.) lysiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und das ILK-Protein mittels eines pAk, der die ILK erkennt, nachgewiesen. Zur Normalisierung von Schwankungen in der Proteinkonzentration sowie Blottingeffizienz wurde parallel der ß-Aktin-Gehalt bestimmt (A, B). Die Signalintensitäten der Banden für ILK und ß-Aktin wurden densitometrisch ausgewertet und Quotienten aus den Werten der ILK und ß-Aktin gebildet. Der ermittelte Quotient nach einer Adhäsionszeit von 0,5 Std. wurde als Ausgangswert herangezogen, um die n-fache Induzierung der Expression der ILK angeben zu können. Die dargestellten Daten beziehen sich auf Mittelwerte aus drei bis fünf verschiedenen Western Blot-Analysen für Vektor- und Integrin $\alpha v\beta$ 3-transfizierte Zellen auf un- (n = 3, ± SD) bzw. VNbeschichteten (n = 5, \pm SD) Zellkulturplatten. Die Proteinexpression der ILK war in Abhängigkeit der Integrin avß3-Expressionshöhe um 1,5-fach erhöht und in Anwesenheit von VN nicht zusätzlich induzierbar. In Vektor-transfizierten Zellen hatte die Adhäsion an VN ebenfalls keinen verstärkenden Effekt auf die Expression der ILK (A, B).

4.2.4. Untersuchungen der ILK-Promotoraktivität als Funktion des Integrins avß3

Für Studien zur Analyse der ILK-Promotoraktivität standen Reportergen-Konstrukte des ILK-Promotors zur Verfügung, die durch Prof. Dr. Nelly Kieffer (Laboratoire Franco-Luxembourgeois de Recherche Biomédicale, Luxembourg) bereitgestellt wurden. Die Aktivität des längsten Promotorkonstrukts der ILK, das 1006 bp umfasst, wurde unter Verwendung eines dualen Luziferase-Reportergen-Assays als Funktion des Integrins avß3 in humanen Ovarialkarzinomzellen bestimmt. Wildtyp- sowie Vektor- und Integrin avß3transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden bis zu einer Zellkonfluenz von 30 - 60 % kultiviert und anschließend Magnetotransfektionen durchgeführt. Die auf der Proteinebene beobachtete Induzierung der ILK in Abhängigkeit von der Integrin avß3-Expressionshöhe konnte durch Reportergen-Analysen bis auf die Ebene der ILK-Promotoraktivität zurückverfolgt werden. Die Aktivität des ILK-Promotors war durch Überexprimierung des Integrins avß3 um 1,8fach (n= 12, SD \pm 0,6) im Vergleich zur Wildtyp- und Vektor-transfizierten OV-MZ-6-Zellen erhöht. Um Integrin avß3-konzentrationsabhängige Effekte auf die ILK-Promotoraktivität zu überprüfen, wurden verschiedene Zelltransfektanten, die graduell ansteigende Integrin avß3-Spiegel aufwiesen, mit dem ILK-Promotor-Reportergen-Konstrukt transfiziert (Abb. 26 A). Die Aktivität des ILK-Promotors korrelierte mit der Integrin avß3-Expressionshöhe. In Übereinstimmung mit der Beobachtung auf der ILK-Proteinebene wurde auf der transkriptionellen Ebene die Integrin avß3-induzierte ILK-Promotoraktivität nicht zusätzlich durch Zelladhäsion an VN erhöht. Nach Zelladhäsion an Poly-L-Lysin war keine Integrin avß3-vermittelte Verstärkung der ILK-Promotoraktivität detektierbar (Abb. 26 B).



Abb. 26. A. Nachweis der ILK-Promotoraktivität in humanen Ovarialkarzinomzellen als **Funktion des Integrins av\beta3.** Die transkriptionelle Kontrolle des ILK-Gens durch das Integrin av β 3 wurde durch Bestimmung der Promotoraktivität der ILK mittels dualer Luziferase-Reportergen-Assays überprüft. Wildtyp- sowie Vektor- und Integrin avß3-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden kultiviert und transiente Transfektionen, wie unter Material & Methoden beschrieben, mittels Magnetotransfektion durchgeführt. Die aufgeführten Daten sind jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen des Ouotienten aus Firefly und Renilla Luziferase (± SD). Die Erhöhung des Proteinspiegels der ILK in Abhängigkeit der Integrin avß3-Expression war auf das Niveau der Promotoraktivität der ILK zurückverfolgbar. Die Gentranskription der ILK war durch das Integrin $\alpha v\beta 3$ 1,8-fach (n= 12, SD ± 0,6) induzierbar. B. Bestimmung der ILK-Promotoraktivität als Funktion des Integrins avß3 in Anwesenheit verschiedener EZM-Liganden. Vektor- und Integrin avß3-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden auf un-, VN- oder Poly-L-Lysin-beschichteten Zellkulturplatten kultiviert und transiente Transfektionen, wie unter Material & Methoden beschrieben, mittels Magnetotransfektion durchgeführt. Die abgebildeten Daten sind jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen des Quotienten aus der Firefly und Renilla Luziferase (exemplarisch für $n = 4, \pm SD$). Die Integrin $\alpha v\beta 3$ -abhängige Promotoraktivität der ILK war durch Zelladhäsion an VN (SD \pm 0,062) im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle (SD \pm 0,046) nicht zusätzlich induzierbar. Der Integrin αvß3-vermittelte Effekt ging nach Zelladhäsion an Poly-L-Lysin verloren (SD \pm 0,016).

4.2.5. Untersuchungen zur Integrin αvβ3-vermittelten ILK-Promotoraktivität in Abhängigkeit von der Promotorlänge

Zur Eingrenzung der Integrin αvß3-vermittelten Induzierung der ILK-Promotoraktivität auf bestimmte ILK-Promotorabschnitte und daran gekoppelter Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren wurden 5'-verkürzte ILK-Promotorkonstrukte mittels Reportergen-Analysen untersucht. Das längste Promotorkonstrukt der ILK entspricht 1006 bp, die nächsten 5'-verkürzten Fragmente des ILK-Promotors haben folgende Größen: 464 bp (BamH I - BamH I) und 353 bp (Apa I - Apa I) (Abb. 27 A). Das 1006 bp-Promotorkonstrukt der ILK offenbarte in Vektor- und Integrin αvβ3-transfizierten Zellen die höchste Aktivität, gefolgt von den 464 bp- und 353 bp-Promotorkonstrukten. Nur die Aktivität des längsten Konstrukts des ILK-Promotors war in Abhängigkeit von der Integrin αvβ3-Expression erhöht. Unter

Verwendung des 464 bp-Konstrukts blieb die ILK-Promotoraktivität sowohl in Vektor- als auch Integrin αvβ3-transfizierten Zellen unverändert. Das 353 bp-Konstrukt fährte zu einer Reduzierung der ILK-Promotoraktivität um 30 % in Vektor-transfizierten Zellen und um 50 % in Abhängigkeit von der Integrin αvβ3-Expression (Abb. 27 B).



Abb. 27. A. Schema der ILK-Promotorkonstrukte. Die schrittweise Verkürzung des ILK-Promotors führte zu drei verschieden langen Promotorkonstrukten: 1006 bp, 464 bp und 353 bp (verändert nach Melchior et al. 2002). B. Bestimmung der ILK-Promotoraktivität in Abhängigkeit verschieden langer Promotorkonstrukte als Funktion des Integrins avß3. Vektor- und Integrin avß3-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden kultiviert und transiente Transfektionen, wie unter Material & Methoden beschrieben, mittels Magnetotransfektion durchgeführt. Die aufgeführten Daten sind jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen des Quotienten aus *Firefly* und *Renilla* Luziferase aus verschiedenen Reportergen-Analysen (n = 4, \pm SD). Die ILK-Promotoraktivität des 1006 bp-Promotorkonstrukts in Vektor-transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Die ILK-Promotoraktivität des 1006 bp-Konstrukts war geringfügig durch die Integrin avß3-Expression im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen erhöht. Das 464 bp-Konstrukt blieb unverändert durch die Integrin avß3-Expression, das 353 bp-Konstrukt zeigte eine verminderte ILK-Promotoraktivität in Vektor- und Integrin avß3-transfizierten Zellen.

4.2.6. Untersuchungen der Effekte des Integrins avß3 auf ILK-Promotormutanten

Um den Einfluss des Integrins αvß3 auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren im ILK-Promotor näher zu charakterisieren, wurden verschiedene DNA-Konsensusmotive für p53, crel, AP-1 und Ets innerhalb der Sequenz des ILK-Promotors durch mehrere Basenaustausche mutiert und mittels Reportergen-Studien analysiert. Da die Integrin αvß3-vermittelte Induzierung des Proteinspiegels der ILK auf die Ebene der Promotoraktivität der ILK zurückgeführt werden konnte, sollten mögliche DNA-Elemente, die für die Abhängigkeit der ILK-Promotoraktivität von der Integrin αvß3-Expressionshöhe verantwortlich sind, identifiziert werden. Deshalb wurden gezielte Basenaustausche innerhalb der DNA-Bindungssequenzen der Transkriptionsfaktoren p53, c-rel, AP-1 und Ets mittels *site-directed* *in vitro* Mutagenese durchgeführt, um deren Effekte auf die ILK-Promotoraktivität in Abhängigkeit der Integrin αvβ3-Expression zu bestimmen (Abb. 28 A).

Die c-rel-, AP-1-, p53- und 1.Ets-Mutanten des Wildtyp-ILK-Promotors waren für eine Induzierung der ILK-Promotoraktivität sowohl in Vektor- als auch Integrin $\alpha\nu\beta3$ transfizierten Zellen verantwortlich. Anhand der c-rel-Mutante wurde die markanteste Verstärkung der ILK-Promotoraktivität erreicht. Dabei wiesen Vektor-transfizierte Zellen eine 4-fach erhöhte ILK-Promotoraktivität, die in Abhängigkeit von der Integrin $\alpha\nu\beta3$ -Expression 18-fach gesteigert wurde. Die Aktivitäten der AP-1- und p53-Mutanten waren nur geringfügig durch die Integrin $\alpha\nu\beta3$ -Expression im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen induzierbar. Die 1.Ets-Mutante verstärkte die ILK-Promotoraktivität unabhängig von der Integrin $\alpha\nu\beta3$ -Expression. Die Aktivitäten der 2.Ets-Mutante sowie die Ko-Transfektion von 1.Ets- und 2.Ets-Mutante waren vergleichbar mit der Aktivität des Wildtyp-ILK-Promotors in Vektor- und Integrin $\alpha\nu\beta3$ -transfizierten Zellen (Abb. 28 B).

A

Pst I

ctgcagaggeteaaaggagaagatgtattgtegggaaggetgattetgtgttgeagteetaecaggtaateetaggeeaggeaettaeeetgattetaagttteeeae accetectttgaacaatgatactgacaactettactgtetecaatectecacactgtaaccgacgaccettteaaaatacaaatetgaagaaataattecattgettaaaacettteattggettetatteteaatataegeaaaacttetaectettgaacageatatatgeecettteatttaetatgtattteaaceaeaaggaecaettgtgtAP-1 1.Ets $t \underline{tgtgactetga} cagaacatgetetettgteceagggecettgtacgta \underline{ctttttcetgtet}gaagaacetettegetteaceaacttetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaeteaacaactetetetgaceacattetaetetgaceacattetgaceacattetgaceacattetgaceacattetaetetgaceacattetgaceacattetaetetgaceacattetgaceacattetaetetgaceacattetaetetgaceacattetaetetgaceacattetaetetgaceacattetgaceacattetgaceacattetaetetgaceacattetgaceacattetaetetgaceacattetaetetgaceacattetgac$ **BamH** I caacgtcagtttettttggaagtteteggatetteagateaggacegeeettaacggtgeeaeaggtgteeeteeeegeaatacacacagegetgggatecaceaatg Apa I 2.Ets p53 ctggaagtcggagcgctcagacctgccagaaccggacaccggaaaccaaagcgtgacagccaggggttgctagagcggcggcggcggcggcggcgaaccatcg c-rel BamH I Pst I



Abb. 28. A. Bindungsstellen der DNA-Konsensusmotive der Transkriptionsfaktoren innerhalb der ILK-Promotorsequenz. Da der ILK-Promotor mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren interagieren und dessen Aktivität durch DNA-Elemente beeinflusst werden kann, wurden Mutationen innerhalb der DNA-Konsensusmotife des 1006 bp-Fragments des ILK-Promotors mittels site-directed in vitro Mutagenese generiert. Durch einzelne Basenaustausche wurden DNA-Konsensusmotife der Transkriptionsfaktoren c-rel, AP-1, p53 und Ets so verändert, dass eine Erkennung und Bindung an die entsprechende DNA-Sequenz innerhalb des ILK-Promotors nicht mehr möglich war. Außerdem sind die beiden Restriktionsschnittstellen des Reportergen-Vektors pGL2-basic, zwischen denen der ILK-Promotor eingefügt wurde, sowie der verkürzten Promotorkonstrukte BamH I und Apa I abgebildet. B. Nachweis der Aktivität verschiedener ILK-Promotormutanten in Abhängigkeit des Integrins avß3. Vektor- und Integrin avß3-transfizierte OV-MZ-6-Zellen wurden kultiviert und transiente Transfektionen, wie unter Material & Methoden beschrieben, mittels Magnetotransfektion durchgeführt. Die aufgeführten Daten sind jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen des Quotienten aus *Firefly* und *Renilla* Luziferase aus verschiedenen Reportergen-Analysen ($n = 3, \pm SD$). Die ILK-Promotoraktivität war durch c-rel-, Ap-1-, p53- und 1.Ets-Mutanten in Vektor- und Integrin avß3-transfizierten Zellen erhöht. Die c-rel-Mutante induzierte die ILK-Promotoraktivität markant und war in Abhängigkeit der Integrin avß3-Expressionshöhe drastisch gesteigert. Durch die 2.Ets-Mutante sowie Ko-Transfektion der 1.Ets- und 2.Ets-Mutante blieb die ILK-Promotoraktivität unverändert.

4.3. Studium der Bindung synthetischer mono- und multimerer Integrin-Liganden an Membran-inkorporierte Integrine

Die Aufklärung der Wechselwirkung zwischen integralen Membranproteinen mit Liganden stellt eine Vorraussetzung für das Verständnis der komplexen biologischen Vorgänge an der Zellmembran dar. Die Kenntnis der Bindungsaffinität und -selektivität für spezifische Rezeptor-Ligand-Assoziationen erleichtert die Entwicklung neuer synthetischer Liganden bzw. Antagonisten. Hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit ein Membranmodell verwendet, bei dem die Bindung von synthetischen und natürlichen Integrin-Liganden an Membran-inkorporierte Integrine avß3 und avß5 bzw. das Plättchenintegrin aIIbß3 mittels SPS/SPFS-Messungen charakterisiert wurde.

4.3.1. Aufbau Integrin ανβ3-, ανβ5- bzw. αΠbβ3-funktionalisierter Phospholipiddoppelschichten

Der Aufbau artifizieller Membran wurde optimiert, da unter konstanten technischen Bedingungen keine Voraussage des exakten Gehalts an Membran-inkorporierten Integrinen ermöglicht werden konnte. Durch ein variierendes Verhältnis zwischen Integrinen, Detergenz und Lipid sowie Vesikelgröße wurde das Verfahren der Funktionalisierung der Lipidvesikel modifiziert, um eine maximale Bindungsaktivität inkorporierter Integrine gewährleisten zu können (Sinner et al. 2004). Als Vorraussetzung vergleichbarer Messungen der Integrindie Schichtdicke Ligand-Interactionen konnte von Integrin-funktionalisierten Phospholipiddoppelschichten herangezogen werden. Gleiche Schichtdicken reflektierten einen vergleichbaren Gehalt an Membran-inkorporierten Integrinen auf der Oberfläche des Biosensors für die SPS/SPFS-Bindungstests. Als Referenz diente eine "proteinfreie" Membran, in die keine Integrine inkorporiert waren. Verschiedenartige SPS-Messungen von Integrin avß3- bzw. avß5-funktionalisierten Lipiddoppelschichten zeigten eine Variation der optischen Schichtdicke von 18 - 24 %.

4.3.2. Nachweis der Orientierung und Funktionalität Membran-inkorporierter Integrine

Die Ausbreitung und Funktionalität der Lipidvesikel garantierte nicht gleichzeitig die transmembrane Orientierung der inkorporierten Integrine, bei der ihre EZM-Bindungsdomänen in die wässrige Phase hineinragen. Deshalb wurde die Orientierung und Funktionalität Integrin-funktionalisierter Phospholipiddoppelschichten anhand der Bindung Integrin-spezifischer Ak, die die Bindungsregion der Integrine erkennen, sowie natürlicher EZM-Liganden nachgewiesen.

Die Bindung Integrin-spezifischer Ak wurde ausgenutzt, um die Anordnung inkorporierter Integrine mit der extrazellulären Bindungsdomäne, die in die äußere wässrige Phase der Biosensor-Oberfläche sowie gerichtet ist. Funktionalität Integrin-funktionalisierter Phospholipiddoppelschichten zu überprüfen. Dazu wurden Bindungsexperimente mit mAk, die die EZM-Bindungsdomänen der Integrine avß3 bzw. avß5 erkennen, durchgeführt. (Abb. 29 A). Die funktionelle Aktivität des Plättchenintegrins aIIbß3 wurde durch einen mAk, der die aIIb-Integrin-Untereinheit im Komplex mit der ß3-Integrin-Untereinheit erkennt, nachgewiesen (Abb. 29 B). Mit Hilfe dieser Integrin-spezifischen Ak wurden starke Bindungssignale detektiert, woraus sich schlussfolgern liess, dass ein ausreichender Gehalt an Integrinen, die mit ihrer EZM-Bindungsregion in die äußere wässrige Phase der Biosensor-Oberfläche orientiert waren, in die Lipiddoppelschicht inkorporiert werden konnte. In Kontrollmessungen, die an "proteinfreien" Membranen durchgeführt wurden, konnte verdeutlicht werden, dass Integrin-spezifische mAk nicht binden und irrelevante sowie nicht Integrin-spezifische mAk die Bindungsregion der Integrine nicht erkennen (Sinner et al. 2004).



Abb. 29. Nachweis der Bindung Integrin-spezifischer Ak an die Bindungsregion der Integrine avß5 und aIIbß3. Die Bindung Integrin-spezifischer Ak wurde mittels SPFS gemessen, um die Inkorporierung bindungsaktiver Integrine in Phospholipiddoppelschichten und die Orientierung der extrazellulären EZM-Bindungsregion in die äußere wässrige Phase der Biosensor-Oberfläche zu ermitteln. Dazu ist die Bindung eines Cy5-markierten anti-Integrin $\alpha v \beta 5$ Ak (A) sowie eines Ak, der die α IIb-Integrin-Untereinheit im Komplex mit der β 3-Integrin-Untereinheit erkennt (B), aufgezeigt. Spezifische Bindungen Cy5-markierter Ak an Integrin $\alpha v \beta 5$ - bzw. α IIb β 3-funktionalisierte Membranen werden durch farbige Fluoreszenzkurven (\blacksquare) repräsentiert. Die Intensität des reflektierten Lichtes wurde in Abhängigkeit vom Einfallswinkel (°) des Anregungslichtes gemessen und als Plasmonenkurve mittels schwarzer Linien dargestellt. SPFS-Signale der an die Biosensor-Oberfläche

gebundenen Cy5-markierten Moleküle wurden als Fluoreszenskurven (counts per second, cps) abgebildet.

Die funktionale Inkorporierung von Integrinen in Phospholipiddoppelschichten wurde ebenfalls anhand der Bindung gereinigter natürlicher EZM-Liganden überprüft. Als Bindungspartner für die Integrine avß3 und avß5 wurde die EZM-Komponente VN und für das Plättchenintegrin aIIbB3 FG als bevorzugtes EZM-Substrat benutzt. Die Inkubation mit Cy5-markiertem VN an Integrin avß3- bzw. avß5-funktionalisierte (Abb. 30 A, B) sowie Cy5-markiertem FG Integrin αIIbβ3-funktionalisierte (Abb. 30 C) an Phospholipiddoppelschichten resultierte in spezifischen Bindungssignalen, die veranschaulichten, dass die Integrine in ihrer aktiven, ligandenbindenden Konformation und Orientierung mit der extrazellulären Bindungsregion in die äußere wässrige Phase der Biosensor-Oberfläche in ausreichender Menge inkorporiert waren. Interessanterweise führte die spezifische Bindung von Cy5-markierten VN an die Integrine avß3 bzw. avß5 zu einer Zunahme des Einfallwinkels um ca. 1°, was darauf hinwies, dass das Minimum der Reflektivität der Oberflächenplasmonen-Messung mit der Bindung von multimerem VN in Zusammenhang steht. In der Tat ist für VN bekannt, dass es Multimere mit sich selbst ausbildet. Kontrollmessungen mit "proteinfreien" Membranen zeigten in keinem Fall Bindungssignale nach Zugabe Cy5-markierter EZM-Liganden (Abb. 30). Um die gleichmäßige Verteilung der inkorporierten Integrine über die gesamte Oberfläche der Phospholipiddoppelschicht zu demonstrieren, wurden Bindungssignale Cy5-markierter EZM-Liganden an fünf verschiedenen Positionen auf jeder artifiziellen Membran gemessen. Hierdurch konnte eine Variation der Signalintensität von bis zu 20 % zwischen fünf unterschiedlichen Messpunkten auf einer Membran ermittelt werden.



Abb. 30. Bindung von EZM-Liganden an in Phospholipiddoppelschichten inkorporierte Integrine $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ bzw. $\alpha IIb\beta 3$. Die Bindung gereinigter EZM-Proteine wurde mittels SPFS gemessen, um die Inkorporierung bindungsaktiver Integrine in Phospholipiddoppelschichten zu ermitteln. Membran-gebundene Integrine $\alpha v\beta 3$ (A) bzw. $\alpha v\beta 5$ (B) wurden mit Cy5-markiertem VN und Membran-gebundenes Integrin $\alpha IIb\beta 3$ (C) mit Cy5-markiertem FG (\blacksquare) inkubiert. Parallel dazu wurden Signale eines Bindungstests mit Cy5-markierten EZM-Liganden auf Integrin-freien Phospholipiddoppelschichten abgebildet (\bigcirc). Schwarze Linien repräsentieren dazugehörige Plasmonenkurven.

4.3.3. Nachweis der Dissoziation der Integrin-Ligand-Interaktion durch EDTA

Für RGD-abhängige Bindungen sowohl natürlicher als auch synthetischer Liganden an Integrine sind zweiwertige Kationen, z.B. Ca²⁺, Mg²⁺ und Mn²⁺, essentiell (Arnaout et al. 2005). Durch Zugabe von EDTA wurden die Metallionen komplexiert, was zur Folge hatte, dass diese für die Integrin-Ligand-Bindung nicht mehr zur Verfügung standen und der Komplex dadurch aufgelöst werden konnte. Um Integrin-funktionalisierte Phospholipiddoppelschichten wiederverwenden zu können, wurde, nachdem ein bestimmter Ligand an Membran-inkorporiertes Integrin gebunden hatte, 0,5 M EDTA, pH 8,0 zugegeben. Dabei wurde eine graduelle Abnahme der Liganden-Bindung bis zur ursprünglichen

Hintergrundfluoreszenz der artifiziellen Membran vor der Liganden-Bindung beobachtet (nicht dargestellt). Bevor ein weiterer SPFS-Bindungstest auf der Biosensor-Oberfläche werden die durchgeführt konnte. mussten dielektrischen Eigenschaften der Phospholipidoberfläche durch Zugabe von Bindungspuffer wiederhergestellt werden. Die dann Liganden-freie Integrin-funktionalisierte Phospholipidoberfläche ermöglicht wiederholte SPFS-Bindungsstudien. Dadurch wurde der direkte Vergleich der Affinität und Selektivität des Liganden an spezifische Integrine unter gleichen experimentellen Bedingungen ermöglicht. Zur statistischen Beurteilung der SPFS-Messungen wurden Bindungsexperimente mit demselben RGD-Peptid unter Benutzung des gleichen Integrin-Substrates und Messung an identischer Bindungsposition auf der Integrin-funktionalisierten Phospholipidmembran mehrfach wiederholt und eine Variation des Bindungssignals von 15 - 18 % berechnet.

4.3.4. Nachweis der Bindung synthetischer mono- und multimerer Integrin-Liganden an Membran-inkorporierte Integrine

Monomere RGD-basierte Peptide mit graduell zunehmenden Ahx-Spacer-Längen, eine einfache Ahx-Einheit entspricht 7,6 Å, eine zweifache Ahx-Einheit (Ahx)₂ umfasst 15,2 Å und eine dreifache Ahx-Einheit (Ahx)₃ entspricht 22,8 Å, wurden auf verschiedenen Integrinfunktionalisierten Phospholipiddoppelschichten nacheinander inkubiert. Bindungen von RGD-Peptiden an Integrin-funktionalisierte Phospholipiddoppelschichten konnten mittels Dissoziation des Integrin-Liganden durch EDTA aufgehoben werden. Das RGD-Monomer-(Ahx)₂ zeigte die höchste Bindung an die Integrine avß3 (Abb. 31 A) und avß5 (Abb. 31 B). Das RGD-Monomer-(Ahx)₃ wies die niedrigste Bindungskapazität gegenüber beiden Integrin av-Subtypen auf (Abb. 31 A, B); die Unterschiede waren jedoch innerhalb der experimentellen Abweichung. Alle getesteten RGD-Monomere waren gegenüber beiden Integrin av-Subtypen vergleichbar selektiv. Keines der monomeren RGD-Peptide mit den unterschiedlich langen Ahx-Spacern offenbarte Bindungssignale an Plättchenintegrin aIIbß3funktionalisierte Phospholipidmembranen (Abb. 31 C). Kontrollpeptide, die anstelle des RGD-Motivs eine nicht Integrin-bindende RAD-Sequenz tragen, zeigten in keinem Fall Bindungssignale an Membran-inkorporierte Integrine (nicht dargestellt). Des Weiteren waren keine Bindungssignale der verschiedenen RGD-Peptide auf "proteinfreien" Kontroll-Membranen messbar (nicht dargestellt).



Abb. 31. Bindung von RGD-basierten Monomeren an in Phospholipiddoppelschichten inkorporierte Integrine avß3, avß5 bzw. aIIbß3. Drei Cy5-markierte RGD-Monomere, die an Ahx-Spacer von unterschiedlicher Länge (Ahx (\blacksquare), (Ahx)₂ (\bigcirc), (Ahx)₃ [\blacktriangle]) gekoppelt sind, wurden auf Integrin avß3- (A), avß5- (B) bzw. aIIbß3-funktionalisierten (C) Phospholipidmembranen inkubiert. Bindungseigenschaften verschiedener monomerer RGD-Peptide wurden nacheinander an derselben Position auf einer identischen Integrin-funktionalisierten Phospholipiddoppelschicht mittels SPFS gemessen, um die Bindungssignale direkt miteinander vergleichen zu können, und mittels Dissoziation des Integrin-Liganden durch EDTA aufgehoben. Das RGD-Monomer-(Ahx)₂ wies die höchste und das RGD-Monomer-(Ahx)₃ die niedrigste Bindungskapazität an die Integrin α v-Subtypen auf (A, B). An der Integrin α IIbß3-funktionalisierten Kontroll-Membran war kein Bindungssignal der RGD-Monomere messbar (C). Schwarze Linien repräsentieren dazugehörige Plasmonenkurven.

Hinsichtlich einer Erhöhung der Bindungsstärke und -spezifität gegenüber den Integrinen wurden multivalente Integrin-Liganden mit zwei bzw. vier RGD-Bindungsepitopen synthetisiert. Um das Bindungsverhalten multimerer RGD-Peptide direkt miteinander vergleichen zu können, wurden RGD-Peptide, die entweder ein, zwei oder vier Integrinbindende RGD-Motive enthalten und mit einem Ahx-*Spacer* verknüpft sind, auf identischen Integrin αvβ3- (Abb. 32 A) bzw. αvβ5-funktionalisierten (Abb. 32 B) artifiziellen Membranen hintereinander gemessen. Bindungen von RGD-Peptiden an Integrin-funktionalisierte Phospholipiddoppelschichten konnten mittels Dissoziation des Integrin-Liganden durch EDTA aufgehoben werden. Das RGD-Dimer wies die höchste und das RGD-Monomer die niedrigste Bindungskapazität gegenüber beiden Integrin av-Subtypen auf. Das RGD-Tetramer offenbarte im Vergleich zum RGD-Dimer eine weniger effektive Bindung an die Integrine avß3 und avß5. Das RGD-Dimer verdeutlichte eine stärkere Bindung an das Integrin avß3 im Vergleich zum Integrin avß5.



Abb. 32. Bindung synthetischer mono- und multimerer Integrin-Liganden. Cy5-markierte mono-(\blacksquare), di- (\bullet) oder tetramere (\blacktriangle) RGD-Peptide, die an einen Ahx-*Spacer* gekoppelt sind, wurden auf Integrin $\alpha v\beta_3$ - (A) oder Integrin $\alpha v\beta_5$ -funktionalisierten (B) Phospholipiddoppelschichten inkubiert. Bindungseigenschaften mono- und multimerer RGD-Peptide wurden nacheinander an derselben Position auf einer identischen Integrin-funktionalisierten Phospholipiddoppelschicht mittels SPFS gemessen, um die Bindungssignale direkt miteinander vergleichen zu können, und mittels Dissoziation des Integrin-Liganden durch EDTA aufgehoben. Das RGD-Dimer zeigte die höchste, das RGD-Tetramer eine mittlere und das RGD-Monomer die niedrigste Bindungskapazität gegenüber den Integrinen $\alpha v\beta_3$ und $\alpha v\beta_5$. Die Bindung des RGD-Dimers an das Integrin $\alpha v\beta_3$ war effektiver im Vergleich zum Integrin $\alpha v\beta_5$. Schwarze Linien repräsentieren dazugehörige Plasmonenkurven.

Um die Spezifität der synthetischen Liganden mit der der natürlichen Liganden vergleichen zu können, wurde die Bindung eines Cy5-markierten RGD-Peptids durch anschließende Inkubation des unmarkierten EZM-Liganden VN kompetiert (Abb. 33 A). Durch eine VN-Konzentration von 0,2 nmol wurde eine Verdrängung der Bindung des RGD-Monomers um 60 % von Membran-inkorporierten Integrin αvβ3 erreicht. Eine Kompetition um 90 % wurde durch Zugabe von unmarkiertem VN in einer Konzentration von 0,8 nmol detektiert (Abb. 33 A). Wurde das Experiment in umgekehrter Reihenfolge ausgeführt, d.h. Kompetition des gebundenen Cy5-markierten VN durch unmarkiertes RGD-Monomer-Ahx, so wurde die VN-Bindung durch Inkubation mit equimolaren Konzentrationen des Kompetitors innerhalb von 30 min. vollständig aufgehoben (Abb. 33 B). Eine Verdrängung des gebundenen Cy5-markierten VN durch unmarkiertes RGD-Dimer-Ahx unter Verwendung einer equimolaren Konzentration resultierte in einer Kompetition der VN-Bindung um 83 % (Abb. 33 B).



Abb. 33. Kompetition der Bindung des RGD-Monomers an Membran-inkorporiertes Integrin avß3 durch unmarkiertes VN und vice versa. A. Die Bindung des Cy5-markierten RGD-Monomer-Ahx (\blacksquare) an eine Integrin avß3-funktionalisierte Phospholipiddoppelschicht wurde in Gegenwart von unmarkiertem VN für 30 min. in einer Konzentration von 0,2 nmol (\bigcirc) und 0,8 nmol (\triangle) kompetiert und mittels SPFS gemessen. B. Die Verdrängung der Bindung von Cy5-markiertem VN (\blacksquare) von Membran-gebundenem Integrin avß3 in Anwesenheit equimolarer Konzentrationen von unmarkiertem RGD-Monomer-Ahx (\bigcirc) und RGD-Dimer-Ahx (\triangle) wurde mittels SPFS detektiert. Schwarze Linien repräsentieren dazugehörige Plasmonenkurven.

Als Alternative zu mono- und multimeren RGD-Peptiden wurde eines vom RGD-Monomer-(Ahx)₃ abgeleitetes Integrin avß3-selektives Peptidomimetikum als synthetischer Integrin-Ligand für die SPFS-Bindungsstudien verwendet. Peptidomimetische Verbindungen wurden entwickelt, um die Bioverfügbarkeit sowie Biodistribution im Vergleich zu peptidischen Integrin-Liganden, unter der Vorrausetzung einer gleich hohen Affinität und Selektivität gegenüber dem Integrin avß3, zu erhöhen bzw. zu verbessern. Wurde die Bindungseffizienz an Integrin avß3 mit dem entsprechenden RGD-Monomer-(Ahx)₃ verglichen, so konnten überlappende SPFS-Bindungskurven aufgezeichnet werden. Das entsprechende vom RAD-Monomer-(Ahx)₃ abgeleitete Peptidomimetikum zeigte keine Bindung an Integrin avß3funktionalisierte Phospholipiddoppelschichten (Abb. 34 A). Die Selektivität des Peptidomimetikums gegenüber beiden Integrin av-Subtypen wurde ermittelt, indem entsprechende Bindungsexperimente auf Integrin avß3- oder avß5-funktionalisierten Phospholipiddoppelschichten mit identischer Schichtdicke (3 nm bezüglich der Integrin avß3bzw. 3,1 nm bezüglich der Integrin avß5-funktionalisierten Phospholipiddoppelschicht) durchgeführt wurden, um einen vergleichbaren Gehalt an inkorporierten Integrinen in den künstlichen Membranen zu gewährleisten. Dabei offenbarte das Peptidomimetikum eine niedrigere Bindungskapazität an das Integrin avß5 im Vergleich zum Integrin avß3 (Abb. 34 B). Das Peptidomimetikum zeigte kein Bindungssignal an Plättchenintegrin αIIbß3funktionalisierten Phospholipidmembranen (nicht dargestellt).



Abb. 34. Vergleich der Bindung des synthetischen RGD-Monomer-(Ahx)₃ und des von diesem abgeleiteten Peptidomimetikums Integrin avß3-funktionalisierte an **Phospholipiddoppelschichten. A.** Die Bindungseffizienzen des RGD-Monomer-(Ahx)₃ (Peptidomimetikums () auf der gleichen Integrin αvβ3-funktionalisierten Phospholipiddoppelschicht wurden mittels SPFS gemessen. Als Kontrollen für spezifische, RGD-abhängige Bindungen an Integrin $\alpha v\beta 3$ dienten das RAD-Monomer-(Ahx)₃ (\bullet) und das RAD-Peptidomimetikum (\bullet). Das RGD-Monomer-(Ahx)₃ und das Peptidomimetikum wiesen gleiche Bindungssignale auf. Die entsprechenden RAD-Kontrollen zeigten keine Bindungssignale. B. Die Bindungsselektivität des Peptidomimetikums gegenüber Phospholipidmembranen, die entweder mit Integrin αvβ3 (αvβ5 (●) funktionalisiert waren, wurde mittels SPFS gemessen. Dazu wurden SPFS-Bindungssignale miteinander verglichen, die auf Integrin avß3- bzw. avß5-inkorporierten Phospholipiddoppelschichten mit identische Schichtdicken detektiert wurden. Das Peptidomimetikum zeigte an Integrin avß5 eine niedrigere Bindungskapazität als an Integrin avß3. Schwarze Linien repräsentieren dazugehörige Plasmonenkurven.

4.3.5. Behandlung Integrin-funktionalisierter Phospholipiddoppelschichten mit Proteinase K

Als weitere Kontrolle der spezifischen Ligand-Wechselwirkungen mit Integrinen wurde auf Phospholipidmembran-beschichteter Biosensoren Proteinase K inkubiert. Dazu wurde zuerst die Bindung eines Cy5-markierten Liganden, in Abb. 35 für das RGD-Monomer-(Ahx)₃ dargestellt, an eine Integrin αvβ3-funktionalisierte Phospholipiddoppelschicht durch SPFS-Messung aufgezeichnet. Anschließend wurde Proteinase K für 40 min. zugegeben und das Bindungsexperiment mit demselben Cy5-markierten Liganden wiederholt. Durch Behandlung der Integrin αvβ3-funktionalisierten Phospholipiddoppelschicht mit Proteinase K war keine Integrin-Liganden-Bindung mehr möglich, da Membran-gebundene Integrine abgebaut wurden. Des Weiteren wurde eine Verschiebung des Einfallswinkels im Minimum der Reflektivität um ca. 1° nach links detektiert, was durch Abnahme der Schichtdicke der Phospholipiddoppelschicht, bedingt durch den Abbau der Membran-gebundenen Integrine, erklärt werden konnte.



Abb. 35. Behandlung von Membran-gebundenem Integrin $\alpha v\beta 3$ mit Proteinase K. Die Bindung des RGD-Monomer- $(Ahx)_3$ an eine Integrin $\alpha v\beta 3$ -funktionalisierte Phospholipiddoppelschicht wurde mittels SPFS-Messung vor (\Box) und nach (∇) der Einwirkung der Proteinase K detektiert. Gefüllte Symbole repräsentieren dazugehörige Plasmonenmessung vor (\Box) und nach (∇) Behandlung mit Proteinase K. Die Verschiebung des Einfallswinkels im Minimum der Reflektivität um ca. 1° zu einem niedrigeren Einfallswinkel resultierte aus dem Abbau Membran-gebundenen Integrine.

4.4. Nachweis der Effekte synthetischer RGD-basierter Integrin-Liganden auf die Integrin αvβ3-vermittelte Adhäsion humaner Ovarialkarzinomzellen

Neben der Evaluierung der Bindung spezifischer Integrin-Antagonisten in zell-freien SPFS-Bindungsstudien wurden die Effekte der Integrin-Liganden in *in vitro* Zelladhäsionstests analysiert. Unter Verwendung des Integrin $\alpha v\beta 3$ -selektiven Peptids c(-RGDfV-) konnte in unserer Arbeitsgruppe in Zelladhäsionstests bereits gezeigt werden, dass die humane Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 an das EZM-Protein VN fast ausschließlich mittels des Integrins $\alpha v\beta 3$ adhäriert (Hapke et al. 2001b, Hapke et al. 2003). Zur Ermittlung der Zelladhäsion, wie unter Material & Methoden beschrieben, wurden Zellkulturplatten mit VN und als Kontrolle mit Kol I, das hauptsächlich durch Integrin $\beta 1$ -Subtypen gebunden wird, beschichtet und OV-MZ-6-Zellen in Gegenwart verschiedener synthetischer Integrin-Liganden in ansteigenden Konzentrationen (0,625 - 20 μ M) inkubiert.

Monomere RGD-basierte Peptide mit graduell zunehmenden Ahx-*Spacer*-Längen sowie sowie das Peptidomimetikum hoben die Adhäsion von OV-MZ-6-Zellen an VN auf und offenbarten ähnliche IC₅₀-Werte (Abb. 36 A), hingegen blieb die Zelladhäsion an Kol I unbeeinträchtigt (nicht dargestellt). Das RGD-Monomer-(Ahx)₂ wies den größten Effekt bezüglich der Hemmung der Zelladhäsion an VN auf (IC₅₀ = 2,6 ± 1,1 μ M), gefolgt vom RGD-Monomer-Ahx (IC₅₀ = 3,2 ± 0,7 μ M) und RGD-Monomer-(Ahx)₃ (IC₅₀ = 5,2 ± 2,5 μ M). Besonders deutlich war die Kompetition der Bindung der OV-MZ-6-Zellen an VN durch das Peptidomimetikum (IC₅₀ = 1,2 ± 0,8 μ M). Durch Zugabe des Kontrollpeptids RAD-Monomer-(Ahx)₃ blieb das Adhäsionsverhalten der OV-MZ-6-Zellen an VN und Kol I unverändert.

Überdies wurde der Einfluss der Multimerisierung der RGD-Motive in einem Liganden-Molekül auf die Integrin αvβ3-vermittelte Zelladhäsion an VN ermittelt. Im Vergleich der Anzahl der Integrin-bindenden RGD-Gruppen zeigten RGD-Dimer-Ahx (IC₅₀ = 8,4 ± 0,2 μ M) und RGD-Tetramer-Ahx (IC₅₀ = 7,7 ± 0,4 μ M) höhere IC₅₀-Werte gegenüber dem RGD-Monomer-Ahx (Abb. 36 B). Des Weiteren wurde der Effekt auf die Adhäsion der OV-MZ-6-Zellen an VN eines RGD-Dimer gemessen, das mit einem Hegas-*Spacer*, der 24,3 Å entspricht, verknüpft ist und dessen Länge mit dem (Ahx)₃-*Spacer*, der 22,8 Å umfasst, vergleichbar war. Das RGD-Dimer-Hegas beeinflusste weniger effizient die adhäsiven Eigenschaften der OV-MZ-6-Zellen gegenüber VN (IC₅₀ ~ 16 μ M). Daraus liess sich schlussfolgern, dass der längere Hegas-*Spacer* des RGD-Dimers eventuell die Integrin-Bindung der funktionalen RGD-Gruppen sterisch behinderte (nicht dargestellt). Die multimeren RGD-Peptide blieben ebenfalls ohne Auswirkungen auf das adhäsive Verhalten der OV-MZ-6-Zellen an Kol I.



Abb. 36. Effekte mono- und multimerer RGD-Peptide und des Peptidomimetikums auf die Integrin avß3-vermittelte Adhäsion humaner Ovarialkarzinomzellen. A. Einfluss der RGD-Monomere als Funktion der Ahx-Spacer-Länge. Ansteigende Konzentrationen (0,625 - 20 µM) der RGD-Monomere, die an unterschiedlich lange Ahx-Spacer (Ahx (\diamondsuit), (Ahx)₂ (\Box), (Ahx)₃ [\bigtriangleup]) gekoppelt waren, und des Peptidomimetikums (\blacklozenge) wurden zusammen mit OV-MZ-6-Zellen, die an VN adhärierten, inkubiert. Die Anzahl der an VN adhärenter Zellen ohne Anwesenheit eines RGD-Peptids wurde auf 100 % gesetzt. Die dargestellten Daten sind jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen, resultierend aus vier Experimenten ($n = 4, \pm SD$). Die RGD-Monomere mit verschieden langen Ahx-Spacern zeigten einen ähnlichen Effekt hinsichlich der Aufhebung der Zelladhäsion an VN. Das Peptidomimetikum wies die stärkste Kompetition der Bindung der OV-MZ-6-Zellen an VN auf. B. Effekte polyvalenter RGD-Peptide. Ansteigende Konzentrationen (0,625 -20 µM) von mono- (♦), di- (■) und tetrameren (▲) RGD-Peptiden, die mit einem Ahx-Spacer verknüpft waren, wurden zusammen mit OV-MZ-6-Zellen, die an VN adhärierten, inkubiert. RGD-Dimer-Ahx und RGD-Tetramer-Ahx waren weniger effizient bezüglich der Aufhebung der Zelladhäsion an VN im Vergleich zum entsprechenden RGD-Monomer-Ahx. Das RAD-Monomer (\diamondsuit) bleib ohne Effekt auf das adhäsive Verhalten der OV-MZ-6-Zellen an VN.

4.5. Entwicklung eines Liganden-Bindungstests auf immobilisierten Integrinen an Mikrotiterplatten

Die Entwicklung eines Mikrotiter-Liganden-Bindungstests sollte mit dem Ziel etabliert werden, gereinigte Integrine auf Oberflächen von Mikrotiterplatten zu immobilisieren, um Bindungen fluoreszenzmarkierter synthetischer und natürlicher Liganden, die gleichzeitig für SPFS-Messungen eingesetzt wurden, hinsichtlich ihrer Selektivität und Spezifität gegenüber den Integrinen $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$ in einem zusätzlichen zell-freien System zu analysieren. Dazu sollte die Bindung der fluoreszenzmarkierten Liganden durch unmarkierte Liganden kompetiert werden.

4.5.1. Verwendung fluoreszenzmarkierter EZM-Liganden

Gereinigte Integrine wurden auf Mikrotiterplatten chemisorbiert, fluoreszenzmarkierte EZM-Proteine gleichzeitig oder zeitversetzt mit unmarkierten RGD-Peptiden inkubiert und die Kompetition der Integrin-Liganden-Bindungen mittels Fluorimetrie bestimmt. Cy5-markierte EZM-Proteine bzw. RGD-Peptide, die parallel für SPFS-Messungen benutzt wurden, konnten allerdings nicht verwendet werden, da freie Fluorophore, die bei SPFS-Messungen nicht störten, nicht in ausreichender Menge von Cy5-markierten Molekülen abtrennbar waren. Außerdem verhinderte ein zu hoher Hintergrund der verwendeten Messfilter (610 und 660 nm) die Detektion einer Kompetition von Cy5-markierten EZM-Proteinen durch unmarkierte RGD-Peptide (nicht abgebildet). Deshalb wurden EZM-Proteine FITC- bzw. Alexa488markiert, da hierdurch eine Abtrennung unmarkierter EZM-Proteine über Chromatographie in ausreichender Menge möglich war. Da erneut Fluorophore unspezifische Bindungen an Mikrotiterplatten aufwiesen, konnte die Hintergrundfluoreszenz nicht herabgesetzt werden. FACS-Analysen, in denen Vektor- und Integrin avß3-transfizierte OV-MZ-6-Zellen mit fluoreszierenden EZM-Proteinen inkubiert wurden, offenbarten, dass zum einen EZM-Liganden nach Fluoreszenzmarkierung inaktiviert wurden, da keine Bindung an OV-MZ-6-Zellen gemessen werden konnte. Zum anderen zeigten die verwendeten Fluorophore ebenso unspezifische Bindungen die Zelloberflächen an (nicht abgebildet). Da Fluoreszenzmarkierungen von EZM-Proteinen nicht effizient genug durchgeführt und unspezifische Bindungen detektiert wurden, wurde eine alternative Methode der Proteinmarkierung, die Biotinylierung, gewählt.

4.5.2. Biotinylierung von EZM-Liganden

Um eine optimale Biotinylierung von EZM-Proteinen zu erreichen, wurden sowohl verschiedene Konzentration von Biotin (37,5 - 225,0 μ g/mg EZM-Protein) als auch unterschiedliche Inkubationszeiten und -temperaturen getestet. Die stärkste Biotinylierung wurde zeitabhängig bei einer Konzentration von 37,5 μ g Biotin/mg FN für 1,5 Std. bei RT ermittelt. Biotinyliertes FN wurde von freien Biotin-Molekülen über Chromatographie und mittels Dialyse in PBS über Nacht bei 4°C separiert, wobei ein enormer Verlust an biotinyliertem FN nicht verhindert werden konnte. Bindungen von biotinyliertem FN an immobilisiertes Integrin $\alpha\nu\beta5$ wurden durch Zugabe von HRP-konjugiertem Streptavidin und einem entsprechenden Peroxidase-Substrat bestimmt und der Substratumsatz mittels eines

ELISA-Messgerätes bei 450 nm gemessen. Die Bindung von biotinylierten FN an Integrin $\alpha\nu\beta5$ war bei einer Konzentration von 1 µg/ml linear, weshalb diese Konzentration im Anschluß für Kompetitionsexperimente mit 250 µM unmarkiertem RGD-Peptid in drei verschiedenen Inkubationsansätzen ausgewählt wurde. Entweder wurde biotinyliertes FN gleichzeitig mit unmarkiertem RGD-Peptid inkubiert oder zuerst unmarkiertes RGD-Peptid und dann biotinyliertes FN oder *vice versa*. Durch Bindung eines Integrin-spezifischen mAk, der die Bindungsregion des Integrins $\alpha\nu\beta5$ erkennt, konnte die Aktivität des immobilisierten Integrins überprüft werden. Die Abhängigkeit der Integrin-Ligand-Bindung vom RGD-Motiv wurde durch Verwendung eines RAD-Peptids bzw. Beschichtung mit BSA nachgewiesen. In allen drei Versuchsvarianten konnte keine Kompetition der Bindung von biotinyliertem FN an Integrin $\alpha\nu\beta5$ durch unmarkiertes RGD-Peptid und *vice versa* detektiert werden (nicht abgebildet).

Daraufhin wurde VN biotinyliert, um dessen Bindung an immobilisiertes Integrin αvβ3 durch unmarkiertes RGD-Peptid zu hemmen. Die Aktivität des immobilisierten Integrins αvβ3 wurde durch Bindung eines Integrin-spezifischen mAk, der dessen aktive Bindungsregion erkennt, nachgewiesen. Eine Kompetition der Bindung von biotinyliertem VN an Integrin αvβ3 durch unmarkiertes RGD-Peptid und *vice versa* war nicht möglich (nicht abgebildet). Das biotinylierte VN zeigte ebenso eine unspezifische Bindung an immobilisiertes BSA. In FACS-Analysen wurde die Spezifität der Bindung des biotinylierten VN an Integrin αvβ3überexprimierende OV-MZ-6-Zellen untersucht und mittels fluoreszenzmarkiertem Streptavidin detektiert. Dabei offenbarte das biotinylierte VN erneut unspezifische Bindungen an Integrin αvβ3 auf OV-MZ-6-Zelloberflächen (nicht abgebildet). Deshalb wurde der Aufbau des Mikrotiter-Liganden-Bindungstests modifiziert und unmarkierte EZM-Liganden verwendet, die mittels spezifischer Bindung der entsprechenden mAk, die gegen das EZM-Protein gerichtet sind, detektiert werden konnten.

4.5.3. Verwendung unmarkierter EZM-Liganden

Gereinigtes Integrin $\alpha v\beta 3$ wurde auf Mikrotiterplatten chemisorbiert, verschiedene Konzentrationen von 0,1 - 5,0 µg/ml VN inkubiert, ein entsprechenden anti-VN mAk sowie sekundärer HRP-konjugierter Ak zugegeben und der Substratumsatz mittels eines ELISA-Messgerätes bei 450 nm bestimmt. Die Aktivität des immobilisierten Integrins $\alpha v\beta 3$ wurde durch Bindung eines anti-Integrin $\alpha v\beta 3$ mAk bestätigt. Die RGD-abhängige Integrin-Ligand-Bindung durch Verwendung eines RAD-Peptid bzw. Beschichtung mit BSA nachgewiesen. Neben einer RGD-abhängigen Bindung von VN an Integrin $\alpha v\beta 3$ wurde auch eine konzentrationsabhängige Bindung an BSA-beschichtete Mikrotiterplatten gemessen (nicht abgebildet). Die Bindung von VN an Integrin $\alpha v\beta 3$ war bei einer Konzentration von 3 µg/ml linear, weshalb diese Konzentration im Anschluß für Kompetitionsexperimente ausgewählt wurde, bei denen VN und 250 µM RGD-Peptid gleichzeitig inkubiert wurden. Eine Kompetition der Bindung von VN an Integrin $\alpha v\beta 3$ durch ein RGD-Peptid war nicht möglich (nicht abgebildet). In FACS-Analysen konnte eine Bindung von VN an Integrin $\alpha v\beta 3$ auf OV-MZ-6-Zelloberflächen und dessen Kompetition durch ein RGD-Peptid einmalig gemessen werden, jedoch in wiederholten FACS-Experimenten nicht reproduziert werden (nicht abgebildet).

Der Liganden-Bindungstests auf immobilisierten Integrinen an Miktotiterplatten konnte leider im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht etabliert werden.

5. DISKUSSION

I. Differentielle Genexpression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R) und der *Integrin-Linked Kinase* (ILK) als Funktion der Integrin αvβ3-Expression in humanen Ovarialkarzinomzellen

Charakterisierung der Integrin avß3-abhängigen Expression des EGF-R

Die differentielle Genexpression des EGF-R in Abhängigkeit von der Integrin αvß3-Expression in humanen Ovarialkarzinomzellen wurde auf der Grudlage früherer cDNA *Expression Microarray*-Analysen unserer Arbeitsgruppe beschrieben (Hapke et al. 2003). Darauf basierend wurde die Expression und Aktivität des EGF-R als Funktion der Integrin αvβ3/VN-Interaktion mittels Immuncytochemie, Western Blot-Analysen und ELISA in OV-MZ-6-Zellen untersucht. Ferner wurde der Einfluss des Integrins αvβ3 und seines EZM-Liganden VN auf der transkriptionellen Ebene des EGF-R mittels Reportergen-Assays und Generierung von EGF-R-Promotormutanten charakterisiert.

Im humanen epithelialen Ovarialkarzinom ist eine frühe Metastasierung durch Dissoziation von Tumorzellen des Primärtumors und deren Interaktion mit mesothelialen Zellen des Peritoneums und der submesothelialen EZM, gefolgt von Invasion von Tumorzellen in die Organe des kleinen Beckens, gekennzeichnet (Auersperg et al. 2001). An jedem Zelladhäsions-abhängigen Schritt der malignen Progression sind Integrine, insbesondere das Integrin avß3, beteiligt (Cruet et al. 1999). In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits vor Fertigstellung der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass in humanen Ovarialkarzinomzellen nach Überexprimierung des Integrins avß3 sowie Zelladhäsion an VN, die motile sowie proliferative Kapazität verstärkt wurden, was sich in wesentlichen Veränderungen der zytoskelettalen Organisation und der Zellmorphologie widerspiegelte (Hapke et al. 2003). Allerdings ist der genaue Ablauf der Integrin avß3-vermittelten Tumorprogression noch nicht vollständig aufgeklärt (Brakebusch and Fassler 2003). So können Änderungen in der Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren sich auf Interaktionen mit Integrinen auswirken. Deshalb lag ein Schwerpunkt der vorgelegten Arbeit auf der Untersuchung der Veränderungen der Expression sowie Aktivität des EGF-R in Abhängigkeit des Integrins ανβ3.

Mittels Western Blot- und immuncytochemischen Analysen der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 konnte eine markante Erhöhung des EGF-R-Proteinspiegels und der Aktivität der RTK durch eine verstärkte Expression des Integrins αvß3 beobachtet werden. Die Aktivierung des EGF-R wurde sogar ohne zusätzliche exogene Stimulierung durch spezifische Liganden erreicht. Ein weiterer Anstieg der Integrin αvß3induzierten Expression und Aktivität des EGF-R wurde durch Zelladhärenz an VN erzielt.

Ähnliche Effekte wurden für die Integrin α 684-induzierte Phosphorylierung des EGF-R beschrieben (Yoon et al. 2006). Überdies wurde in Brustkrebszellen die Assoziation des Integrins α 684 mit einem anderen Mitglied der erbB-Familie, dem erbB2-Rezeptor, nachgewiesen. Sowohl das Integrin α 684 als auch erbB2 sind für Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Stimulierung der Zellinvasion erforderlich (Adelsman et al. 1999, Gambaletta et al. 2000). Vor kurzem konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des Integrins α 684 die erbB3-Expression beeinflusst, wodurch erbB2/erbB3-Dimere gebildet und die Apoptose von Krebszellen ausgelöst wurden (Folgiero et al. 2007). Jedoch werden auch gegensätzliche Effekte beschrieben, indem Bindungen des Integrins α 181 an Kollagen EGF-R-vermittelte Signalkaskaden negativ regulieren können. Hierbei interagiert der EGF-R mit und aktiviert gleichzeitig eine ubiquitär exprimierte Proteintyrosinphosphatase, die eine verminderte Phosphorylierung des EGF-R hervorruft (Mattila et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit blieb das Expressionsniveau des Integrins avß3 durch Aktivierung des EGF-R mittels Stimulierung von OV-MZ-6-Zellen durch EGF unverändert. Die Anreicherung von Integrinen in Gewebebereichen, die den EGF-R und/oder platelet-derived growth factor receptor-A (PDGF-R-A) überexprimieren, konnte schon vor einiger Zeit nachgewiesen werden (Schneller et al. 1997). Jüngsten Ergebnissen zufolge, wurde mittels Zugabe von EGF ein vorübergehender Verlust des Integrin α2-Subtyps von Zelloberflächen erzielt, der wahrscheinlich durch Internalisierung mit dem physikalisch assoziierten EGF-R bedingt war (Ning et al. 2007). So kann z.B. auch die Bindung von Heregulin-ß an erbB3 in Brustkrebszellen eine erbB2/erbB3-Dimerisierung hervorrufen, die die Integrin ß1-Subtypinduzierte Zelladhäsion und Migration verstärkt (Adelsman et al. 1999). Die aufgezählten widersprüchlichen Daten verschiedener Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass die komplexen Wechselbeziehungen nicht nur als isolierte Ereignisse, sondern auch in Abhängigkeit vom jeweiligen Integrin, Wachstumsfaktor-Rezeptor sowie dem entsprechenden Zelltyp zu betrachten sind.

Die Rolle des EGF-R hinsichtlich der Pathogenese und Progression im Ovarialkarzinom ist noch weitgehend unklar (Alper et al. 2001). Ein hohes EGF-R-Expressionsniveau ist mit einer vermehrten Zellproliferation sowie Migration in vitro und Progression in einen transformierten und aggressiven kanzerogenen Phänotyp in vivo assoziiert (Aaronson 1991, Alper et al. 2000, Cabodi et al. 2004, Chen et al. 1994a, Chen et al. 1994b, Jorissen et al. 2003, Lichtner et al. 1993). Die Bedeutung des EGF-R konnte weiterhin mittels Antisense-Experimenten nachgewiesen werden, bei denen die Expression des EGF-R inhibiert und ein Krebszellen, vermindert maligner Phänotyp in humanen einschließlich Ovarialkarzinomzellen, hervorgerufen werden konnte (Alper et al. 2000, Brader et al. 1998). Eine Vielzahl von Ovarialkarzinomzelllinien exprimieren substantielle EGF-R-Spiegel und sind in ihrem Wachstum durch EGF-R-Liganden stimulierbar (Stromberg et al. 1992). Daran anlehnend konnte in der vorliegenden Arbeit eine Stimulierung der Proliferation der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 durch EGF beobachtet werden, die weiter durch Integrin avß3-Überexprimierung gesteigert werden konnte. In früheren Analysen unserer Arbeitsgruppe wurde demonstriert, dass die Proliferation von OV-MZ-6-Zellen durch die Integrin avß3-Expression induziert und durch Integrin avß3/VN-Interaktion die MAPK aktiviert werden konnte (Hapke et al. 2003). Untersuchungen der MAPK-Signalkaskade untermauern die kooperativen Wechselwirkungen der Integrin- und Wachstumsfaktor-Rezeptor-induzierten Signaltransduktionswege, die eine vermehrte Zellproliferation hervorrufen (Moro et al. 1998). Mittlerweile ist bekannt, dass Integrine und der EGF-R unabhängig voneinander die MAPK aktivieren können. Veränderungen der Zellproliferation durch eine aktivierte MAPK erfordern allerdings das Zusammenspiel beider Oberflächen-Rezeptortypen (Chen et al. 1994c, Miyamoto et al. 1996, Morino et al. 1995, Schwartz and Baron 1999, Zhu and Assoian 1995). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in humanen Fibroblasten, Endothelzellen sowie EGF-R-transfizierten embryonalen Maus-Fibroblasten beschrieben. Dabei löste die Integrin-vermittelte Zelladhäsion an EZM-Proteine eine transiente Phosphorylierung der Tyrosinreste des EGF-R aus, wodurch die MAPK aktiviert wurde (Moro et al. 1998).

Erhöhte EGF-R-Spiegel in Krebszellen sind nur teilweise auf Genamplifikation oder posttranslationale Regulierung zurückzuführen. In den meisten Fällen ist die Gentranskription verändert (Jorissen et al. 2003). So resultiert in verschiedenen Krebserkrankungen eine Überproduktion des EGF-R aus (post-)transkriptionellen Ereignissen (Xu et al. 1984). Transkriptionelle *response elements* von Genen können häufig auf Veränderungen Integrinvermittelter Zelladhäsionen sowie deren Signalweiterleitungen reagieren. Um Elemente innerhalb des EGF-R-Promotors zu identifizieren, die die transkriptionelle Kontrolle des EGF-R-Gens beeinflussen, wurden in der vorgelegten Arbeit DNA-Bindungsmotive einzelner Transkriptionsfaktoren, die im EGF-R-Promotor enthalten sind, mutagenisiert. Aufgrund der mutierten c-rel-Bindungssequenz war neben einer drastischen Reduzierung der Aktivität des EGF-R-Promotors auch ein fast völliger Verlust der Integrin αvß3-vermittelten Induzierung der Aktivität des EGF-R-Promotors detektierbar.

Aufgrund unserer Untersuchungen lässt sich nicht ausschliessen, dass trans-aktivierende Faktoren, z.B. NF-κB, des humanen EGF-R-Promotors zur Integrin αvß3-induzierten Aktivität des EGF-R-Promotors beitragen. Diese Auffassung wird zusätzlich dadurch unterstützt, dass eine schwache Integrin αvß3-induzierte Aktivität des 479 bp-Promotorkonstrukts des EGF-R, in dem kein c-rel-Bindungsmotiv vorhanden ist, messbar war. Im Gegensatz dazu wurde durch die mutierte Bindungssequenz von p50, ein weiteres Mitglied der Rel-Protein-Familie, keine Änderung der Aktivität des EGF-R-Promotors in Anbzw. Abwesenheit des Integrins αvβ3 beobachtet. Rel-Proteine sind im Krebsgeschehen von Bedeutung (Gilmore et al. 2002). Bisher ist allerdings nur sehr wenig über eine mögliche Trans-Aktivierung des EGF-R-Promotors durch den dimeren Transkriptionsfaktor NF-κB (p65/p50) bekannt (Nishi et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit war unter Verwendung der p53-Mutante eine Integrin avß3induzierte Aktivität des EGF-R-Promotors erkennbar, obschon die Aktivität des EGF-R-Promotors im Vergleich zum Wildtyp-EGF-R-Promotor reduziert wurde. Die Resultate stimmen mit Untersuchungen anderer überein, in denen der Einfluss von p53 auf die Aktivität des EGF-R-Promotors gezeigt wurde (Deb et al. 1994). Die Mutagenese des ETF-Bindungsmotivs bedingte eine schwache Integrin avß3-induzierte Aktivität des EGF-R-Promotors. Bislang ist beschrieben, das der EGF-R Transkriptionsfaktor ETF spezifisch die Gentranskription des EGF-R durch schwache oder indirekte Interaktionen mit dem entsprechenden DNA-Motiv stimulieren kann (Kageyama et al. 1988a). Eine identische Bindungssequenz für ETF konnte auch in der Sequenz eines anderen Wachstumsfaktor-Rezeptors, dem humanen Insulin-Rezeptor, identifiziert werden, so dass ETF an der Regulierung des Zellwachstums beteiligt sein könnte (Kageyama et al. 1988a). Des Weiteren wurde ein Konsensusmotiv eines negativen Regulators der EGF-R-Promotoraktivität, dem transkriptionellen Repressor ETR, in der EGF-R-Promotorsequenz mutiert und resultierte erwartungsgemäß im Anstieg der EGF-R-Promotoraktivität in Vektor-transfizierten OV-MZ- 6-Zellen. Die ETR-Promotormutante war allerdings immer noch durch das Integrin $\alpha v\beta 3$ induzierbar.

Die molekularen Eigenschaften der Interaktion zwischen Integrinen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren sind bislang nicht eindeutig charakterisiert. Jedoch scheint die Notwendigkeit der Ko-Lokalisierung oder des Ko-Clusterings an der Zelloberfläche von entscheidender Bedeutung zu sein. In der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 war es möglich, die Ko-Lokalisierung des EGF-R mit dem Integrin avß3 durch Immunpräzipitationen zu demonstrieren. Hinsichtlich des Integrins avß3 ist bisher nur die Interaktion mit dem *platelet*derived growth factor receptor-ß (PDGF-R-ß) beschrieben. Hierbei konnte ein synergistischer Anstieg der platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB)-induzierten Chemotaxis und Proliferation von Fibroblasten, die an VN adhärierten, ausgelöst werden. Überdies konnte in humanen vaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen, die ebenfalls an VN anhafteten, eine Aktivierung von PDGF-R-ß durch das Integrin avß3 in Anwesenheit von PDGF-BB nachgewiesen werden (Miller et al. 1998, Schneller et al. 1997, Woodard et al. 1998). Andere Integrine, z.B. α6β4, α6β1 oder Integrin β1-Subtypen, sind ebenfalls innerhalb makromolekularer Komplexe mit Wachstumsfaktor-Rezeptoren, z.B. erbB2, PDGF-R-ß oder vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGF-R 2), ko-lokalisiert (Borges et al. 2000, Falcioni et al. 1997, Miyamoto et al. 1996, Plopper et al. 1995, Schneller et al. 1997, Sundberg and Rubin 1996, Woodard et al. 1998). Bezüglich des EGF-R konnte eine Assoziation mit dem Integrin α 6 β 4 aufgezeigt werden (Yoon et al. 2006).

Integrine kooperieren mit Wachstumsfaktor-Rezeptoren an fokalen Zelladhäsionspunkten. In unserer Arbeitsgruppe war es möglich, die FAK, innerhalb von Integrin $\alpha v\beta 3$ /EGF-R-Immunkomplexen zu detektieren. Spezifische Bindungen an Integrine und durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren initiierte Signalweiterleitungen spielen bei der Aktivierung von FAK eine Rolle (Riemenschneider et al. 2005). Unsere Arbeitgruppe demonstrierte in früheren Untersuchungen an humanen Ovarialkarzinomzellen, dass die Aktivierung der FAK im Zusammenhang mit der Integrin $\alpha v\beta 3$ -Expressionshöhe und der Zelladhäsion an VN an fokalen Zelladhäsionspunkten steht (Hapke et al. 2003). Die Interaktion der FAK mit zytoplasmatischen Domänen der Integrin $\beta 1$ - und $\beta 3$ -Subtypen sowie deren C-terminale Assoziation mit zytoplasmatischen Domänen der RTK sind bereits beschrieben (Morino et al. 1995). Überdies wird FAK in den meisten humanen Ovarialkarzinomen überexprimiert und ihre Expression korreliert mit einer schlechten Differenzierung und Prognose (Hauptmann et al. 2002, Judson et al. 1999, Kiechle et al. 2001, Sood et al. 2004).

Die Resultate der vorgelegten Arbeit untermauern die Auffassung, dass das Integrin αvß3 in humanen Ovarialkarzinomzellen von besonderer Bedeutung ist. Aufgrund der Signalweiterleitenden Eigenschaften interagiert das Integrin αvß3 mit dem EGF-R innerhalb eines funktionellen Kontexts und kann in Zusammenhang mit dem Expressionsniveau und der Aktivität des EGF-R gebracht werden. Die Wechselbeziehung des Integrins αvß3 und des EGF-R begünstigen tumorbiologisch relevante Prozesse, z.B. die Integrin αvß3-vermittelte Adhäsion, Motilität und Proliferation humaner Ovarialkarzinomzellen.

Charakterisierung der Integrin avß3-abhängigen Expression der ILK

Neben der Genexpression des EGF-R wurde die ILK als differentiell reguliertes Gen in Abhängigkeit der Integrin $\alpha\nu\beta3$ -Expression in humanen Ovarialkarzinomzellen identifiziert. Die Proteinebene der ILK wurde mittels immuncytochemischen und Western Blot-Analysen, die transkriptionelle Ebene anhand von Reportergen-Assays und Generierung von ILK-Promotormutanten als Funktion der Integrin $\alpha\nu\beta3/VN$ -Interaktion charakterisiert.

Intergine gewährleisten physikalische Interaktionen mit zellulären Komponenten der EZM, indem sie intrazelluläre Signale übertragen und schliesslich die Zellmigration, Überleben und Proliferation beeinflussen und eine entscheidende Rolle während des Tumorwachstums und Metastasierung wichtiger Effektor der der spielen. Als Integrinund Wachstumsfaktorsignalwege die ILK verbindet intrazelluläre unterschiedliche Oberflächenrezeptoren mit nachfolgenden Signalmolekülen über die zytoplasmatischen Domänen der Integrin ß1- und ß3-Suptypen. Dabei baut die ILK ein molekulares Gerüst zwischen Signalmolekülen, EZM-Proteinen und Wachstumsfaktoren über Integrine und RTK, z.B. EGF-R oder PDGF-R, und dem Aktin-Zytoskelett auf (Dedhar et al. 1999, Hehlgans et al. 2007). Die Aktivität der ILK kann durch Zell-EZM-Interaktionen, Zytokine sowie Wachstumsfaktoren in Abhängigkeit von PI3K positiv und durch PTEN und ILK1-associated phosphatase (ILK-AP) negativ reguliert werden (Delcommenne et al. 1998, Leung-Hagesteijn et al. 2001, Persad et al. 2000). Ferner fungiert die ILK nicht nur als Adapter- und Signalmolekül, das in den PI3K-Signalweg oberhalb der PKB/Akt und GSK-3 eingreift, sondern auch als Myosinkinase, die die Zellbeweglichkeit beeinflusst. Die Überexprimierung der Kinase in vivo bedingt Hyperplasien und die Tumorgenese. Die Hemmung der Kinaseaktivität kann in Tumorzellen einige der malignen Eigenschaften und Veränderungen
umkehren. Deshalb stellt die ILK ein vielversprechendes Zielmolekül der Krebstherapie dar (Deng et al. 2001, Persad and Dedhar 2003, Yoganathan et al. 2002).

Die ILK ist zytoplasmatisch besonders mit fokalen Anhaftungspunkten assoziiert, wodurch ihre Funktion während Zell-EZM-Interaktionen über die Integrin ß1-Subtypen gewährleistet wird (Driver and Veale 2006). Integrin-vermittelte Signalweiterleitungen über die ILK können zu einer vermehrten Zellmigration, Invasion und letztendlich einer veränderten Anordnung von Aktinfilamenten führen. Es konnte gezeigt werden, dass die Uberexprimierung der ILK eine Neuordnung der Aktinfilamente induziert, die Zellmigration und Invasion in Anhängigkeit verschiedener Signalmoleküle, z.B. PI3K, Akt, verstärkt und schliesslich die Ausbildung von Lamellipodien und somit eine erhöhte Zellbeweglichkeit verantwortlich ist. Eine Fehlregulierung der Zellmigration und Invasion tritt v.a. in metastasierenden Krebsgeschwüren und Abnormitäten während der Entwicklung auf, was durch eine ILK-vermittelte onkogene Transformation in verschiedenen Zelllinien in vitro und die Tumorformation im transgenen Tiermodell nachgewiesen werden konnte (Qian et al. 2005). Überdies korreliert die Expression und Aktivität der ILK mit der Tumorprogression und ihre Überexprimierung konnte in verschiedenartigen humanen Krebserkrankungen, z.B. beim Melanom, Prostatakrebs, Lungenkrebs sowie Ovarialkarzinom, nachgewiesen werden (Troussard et al. 2006). Ausserdem resultiert eine Überexprimierung der ILK in Adenokarzinomzellen der Pankreas in einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (Duxbury et al. 2005).

Auf Grund der geschilderten tumorbiologischen Funktionen der ILK wurde in der vorgelegten Arbeit die Expression der ILK als Funktion des Integrins αvß3 in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 untersucht werden. Mittels Western Blot- und immuncytochemischen Analysen konnte eine erhöhte ILK-Proteinexpression durch eine Integrin αvβ3-Induzierung in humanen Ovarialkarzinomzellen demonstriert werden. Die Expression des ILK-Proteins konnte in Gegenwart von VN als Adhäsionssubstrat nur teilweise weiter erhöht werden. Überdies wurde der Einfluss des Integrins αvβ3 auf die Proteinebene der ILK auf die transkriptionelle Ebene der ILK-Genexpression zurückgeführt. Hierbei wurde deutlich, dass die Aktivität des ILK-Promotors in Abhängigkeit der Integrin αvβ3-Expression steht. Anhand verschiedener ILK-Promotorkonstrukte wurde die Integrin αvβ3-vermittelte Aktivität des ILK-Promotors überprüft. Dabei zeigte das längste ILK-Fragment eine Aktivität in Abhängigkeit der Integrin αvβ3-Expressionshöhe. Hingegen ging die Integrin αvβ3-Induzierung der Promotoraktivität der ILK mit abnehmender Länge der Promotorkonstrukte verloren. Das kürzeste ILK-Promotorkonstrukt offenbarte eine verminderte Aktivität in Vektor- und Integrin αvβ3-tranfizierten Zellen. Die in der vorgelegten Arbeit detektierten Aktivitäten der ILK-Promotorkonstrukte sind nicht in Übereinstimmung mit Luziferasemessungen in anderen Zelllinien, z.B. Nieren- und Melanomzellen, bei denen das kürzeste ILK-Fragment die höchste Aktivität aufwies (Melchior et al. 2002). Da die ILK ubiquitär, nicht gewebe- oder zelltyp-spezifisch exprimiert wird, könnten die unterschiedlichen Aktivitäten des ILK-Promotors im Zusammenhang mit der *in vivo* Aktivität des nativen Promotors gebracht werden.

Anhand von ILK-Promotormutanten sollten DNA-Elemente und trans-aktivierende Faktoren, die die Transkription der ILK beeinflussen und für die Integrin avß3-Induzierung verantwortlich sind, bestimmt werden. Der Einfluss der Transkriptionsfaktoren c-rel, AP-1, p53 und Ets auf die Aktivität des ILK-Promotors wurde in der vorgelegten Arbeit mit Hilfe gezielter Mutationen der DNA-Bindungsstellen charakterisiert. Die Mutationen der Bindungsmotife von c-rel, AP-1, p53 und der 1.Ets führten zu einer Erhöhung der ILK-Promotoraktivität sowohl in Vektor- als auch Integrin αvß3-transfizierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp-ILK-Promotor. Durch die Aktivität der c-rel-Mutante konnte die ILK-Promotoraktivität am stärksten im Vergleich zur Aktivität des Wildtyp-ILK-Promotors gesteigert werden und ist durch die Integrin avß3-Expression zusätzlich induzierbar im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen. Die Mutation des AP-1-Konsensusmotifs resultierte in einer Verstärkung der Aktivität des ILK-Promotors unabhängig von der Integrin avß3-Expression. In Pankreaszellen konnte gezeigt werden, dass durch eine ILK-Überexpression GSK-3 stärker aktiviert, folglich MAPK phosphoryliert und die DNA-Bindekapazität von AP-1 induziert wurde. Eine Inhibierung der ILK unterdrückte die Phosphorylierung von GSK-3 und verhinderte die Aktivierung des MAPK/AP-1-Signalweges (Sawai et al. 2006). In Abhängigkeit vom verwendeten Zellsystem könnten Wechelwirkungen mit verschiedenen anderen trans-aktivierenden Faktoren in einem Anstieg der ILK-Promotoraktivität resultieren.

Die Mutation der 1.Ets-Bindungsstelle bedingte ebenfalls eine Erhöhung der Aktivität des ILK-Promotors unabhängig von der Integrin αvß3-Expression. Die Mutation der 2.Ets-Bindungsstelle innerhalb der Sequenz des ILK-Promotors blieb ohne Effekt auf die Aktivität des ILK-Promotors. Die Ets-Proteinfamilie besteht aus evolutionär konservierten Transkriptionsfaktoren, die sowohl positiv als auch negativ die Expression von Genen regulieren, die bei unterschiedlichsten biologischen Vorgängen, z.B. Zellproliferation,

109

Differenzierung, Apoptose, Angiogenese, maligne Transformation sowie Tumorprogression, von Bedeutung sind. Außerdem können Ets-Proteine bei einigen Krebsarten, einschließlich dem Ovarialkarzinom, überexprimiert werden und ihre Expression geht mit der Malignität des Tumors und einer schlechten Prognose einher (Coletta et al. 2004, Hsu et al. 2004, Oikawa 2004). Die Ets-Transkriptionsfaktoren sind Effektormoleküle, die am Ende unterschiedlicher Signalwege stehen, z.B. der Ras-MAPK-Signalkaskade, durch die eine Phosphorylierung der Ets-Proteine hervorgerufen wird. Nicht nur Integrin-vermittelte Signalkaskaden, sondern auch durch RTK induzierte Signalkaskaden stellen wesentliche Auslöser der intrazellulären Aktivität der Ets-Effektoren dar (Hsu et al. 2004). Die so aktivierten Ets-Transkriptionsfaktoren können dann die Promotoraktivität direkt oder indirekt über verschiedene Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren oder Co-Faktoren beeinflussen (Coletta et al. 2004, Oikawa 2004). Überdies wurde gezeigt, dass die Genexpression der Integrin av- und ß3-Suptypen sowie anderer Zelladhäsionsmoleküle, die für die Zelladhäsion und Migration notwendig sind, durch Ets-Proteine reguliert wurde (Oikawa 2004).

Während der Tumorgenese des Ovarialkarzinoms spielt die ILK bei der epithelialenmesenchymalen Transition (EMT) eine essentielle Rolle, da sie Zelladhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktor-Rezeptoren mit einer Vielzahl von Signalwegen vebindet und so z.B. eine scr-vermittelte Transaktivierung des EGF-R veranlassen kann, wodurch eine Invasion von Tumorzellen begünstigt werden kann (Rosano et al. 2005). Durch Co-Immunpräzipitationsanalysen anderer Arbeitsgruppen konnte demonstriert werden, dass die ILK einen Komplex sowohl mit PKB/Akt als auch mit PDK1 bildet. Die PDK1/PKB-Assoziation konnte durch Phoshorylierung der PKB/Akt am Serin 473 unterbrochen werden. In Tumorzellen, in denen der Tumorsuppressor PTEN fehlt, ist die Aktivität der ILK konstitutiv verstärkt, was zu einer vermehrten PKB/Akt-Aktivität führt und somit die Apoptose mittels Phosphorylierung bzw. Inaktivierung proapoptotischer Moleküle, z.B. Bad, Caspase-9, hemmt sowie einen fortschreitenden Zellzyklus gewährleistet (D'Amico et al. 2000, Hannigan et al. 1996, Persad et al. 2001). In Ovarialkarzinomzellen konnte die Aktivität der ILK inhibiert und eine PKB/Akt-Phosphorylierung am Serin 473 vermindert werden (Cruet-Hennequart et al. 2003). In Glioblastomazellen resultierte eine Inhibierung der ILK in einer verminderten Zellproliferation, Invasion sowie Angiogenese aufgrund der Inaktivierung von Akt und GSK-3 (Koul et al. 2005). Der genaue Mechanismus bezüglich der Phosphorylierung des Serins 473, die notwendig für die Aktivierung der ILK ist, wird jedoch in Abhängigkeit vom Zelltyp kontrovers diskutiert (Troussard et al. 2006).

Das Zusammenspiel der ILK, die einen bedeutenden intrazellulären Baustein in der Verbindung der Signalkaskaden der Integrine und Wachstumsfaktor-Rezeptoren darstellt, konnte als Funktion des Integrins avß3 in humanen Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen werden.

II. Evaluierung der Bindung synthetischer und natürlicher Integrin-Antagonisten mittels Oberflächenplasmonenspektroskopie

Durch die bedeutende Rolle des Integrins αvß3 für die Tumorprogression und Angiogenese stellt dieses eine therapeutische Zielstruktur dar. Deshalb wurden Integrin-Antagonisten entwickelt, um spezifische Interaktionen zwischen dem Integrin αvß3 und dessen EZM-Liganden zu blockieren. Ein Anliegen der vorgelegten Arbeit war es, RGD-basierte synthetische Integrin-Liganden in zell-freien Bindungsstudien mittels Oberflächenplasmonenspektroskopie zu untersuchen, um deren Bindungsselektivität sowie spezifität gegenüber gereinigten Membran-inkorporierten Integrinen αvß3 und αvß5 zu bestimmen. Mittels der Erweiterung, der plasmonenverstärkten Fluoreszenzspektroskopie, konnten Bindungseigenschaften kleiner zyklischer mono- und oligomerer RGD-Peptide an Integrin-funktionalisierte Phospholipiddoppelschichten gemessen werden.

Innerhalb des letzten Jahrzehnts wurden verschiedene RGD-basierte Peptide entwickelt, um die Integrin avß3- bzw. avß5-vermittelte Zelladhäsion zu unterbinden. Die ersten synthetischen Integrin $\alpha v\beta$ 3-selektiven zyklischen Peptide basierend auf dem Pentapeptid c(-RGDfV-) wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Horst Kessler entwickelt und synthetisiert (Aumailley et al. 1991, Haubner et al. 1996, Pfaff et al. 1994). Darüber hinaus wurden auch multimere zyklische RGD-basierte Peptide generiert, die erhöhte Bindungsstärken gegenüber Integrinen versprechen (Poethko et al. 2004, Thumshirn et al. 2003). Um synthetische Integrin-Liganden hinsichtlich ihrer spezifischen und selektiven Bindung an Integrin av-Subtypen zu überprüfen, sind sowohl sensitive als auch zuverlässige in vitro Bindungstests erforderlich. Deshalb wurde in der vorgelegten Arbeit ein zell-freies in für Bindungstestsystem etabliert, das gereinigte, native Integrine vitro in Phospholipiddoppelschichten auf einem Biosensor inkorporiert wurden (Sinner et al. 2004). Dabei wurde nicht nur die strukturelle Integrität der Integrine bewahrt, sondern auch anhand hydrophiler "Abstandhalter-Moleküle" (Spacer) ausreichend Raum und Flexibilität, z.B. für zytoplasmatische Integrin-Domänen geschaffen (Sinner and Knoll 2002, Sinner et al. 2004).

Assoziationen Membran-gebundener Integrine mit synthetischen Liganden wurden mittels SPS/SPFS-Messungen bestimmt. Dazu wurden die Integrine avß3 und avß5 in Phospholipiddoppelschichten inkorporiert und deren ligandenbindende Konformation sowie Funktionalität anhand der Bindung von Integrin-spezifischen Ak, die die EZM-Bindungsdomänen der Integrine erkennen, nachgewiesen. Ebenso wurde die Funktionalität der Membran-gebundenen Integrine mittels Bindung natürlich vorkommender EZM-Liganden an die extrazellulären Kopfgruppen der Integrine überprüft. Nachdem sichergestellt wurde, dass ein ausreichender Gehalt an Integrinmolekülen in die Phospholipiddoppelschicht mit ihrer EZM-Bindungsdomäne zur wässrigen Phase der Biosensoroberfläche orientiert war, konnten Integrin-Ligand-Bindungsstudien durchgeführt werden. Daraufhin wurden synthetische mono- und oligomere RGD-basierte Liganden sowie ein Peptidomimetikum, die ein Molekulargewicht von ca. 700 - 4500 Da besitzen, auf Integrin-funktionalisierten Phospholipiddoppelschichten inkubiert, um deren Bindungskapazität gegenüber den Integrinen avß3 und avß5 mittels SPS/SPFS-Bindungstests zu charakterisieren. Als Kontrolle diente das Plättchenintegrin aIIbß3. Da synthetische Integrin-Antagonisten für die systemische Behandlung von Patienten als Therapieform eingesetzt werden sollen, ist es absolut erforderlich, die Aktivierung und Aggregation der Blutplättchen zu vermeiden. Daher wurde über räumliches Screening bei der Peptidsynthese die Selektivität der synthetischen Liganden auf Integrin av-Subtypen angepasst. Deshalb wurden Interaktionen mit Integrin avß3- und avß5-selektiven RGD-basierten Antagonisten mit dem Plättchenintegrin aIIbß3 untersucht. Mittels SPS/SPFS-Messungen sowie in vitro Zelladhäsionstests waren keine Bindungen der synthetischen Integrin-Antagonisten an das Plättchenintegrin aIIbß3 nachweisbar.

Unter konventionellen SPS-Einstellungen kann eine molekulare Größe von ca. 10000 Da vermessen werden, wodurch nur indirekte Messungen sehr kleiner Liganden möglich sind, z.B. anhand der Bestimmung ihrere Kapazität als lösliche Kompetitoren für größere Liganden, wie das EZM-Protein VN. So resultierte die VN-Bindung an Membraninkorporiertes Integrin $\alpha v\beta 3$ in einem markanten Anstieg des Einfallswinkels im Minimum der Plasmonenkurve, der sich durch die Bindung eines großen Molekulargewichts erklären läßt. Es ist bekannt, dass VN-Proteine Multimere formieren können, die ausgeprägte Integrin-Bindungskapazitäten aufweisen (Schvartz et al. 1999). Um die Affinität und Bindungsstärke synthetischer Integrin-Liganden mit der natürlichern Integrin-Liganden vergleichen zu können, wurde die Bindung des fluoreszenzmarkierten RGD-Monomer-Ahx durch anschließende Inkubation von unmarkiertem VN aufgehoben. Obwohl der natürlicher Kompetitor VN im ungleichen molaren Verhältnis eingesetzt wurde, konnte eine ausreichende Verdrängung des fluoreszenzmarkierten RGD-Peptids erzielt werden. Des Weiteren wurde die Bindung von fluoreszenzmarkiertem VN durch eine equimolare Konzentration des unmarkierten RGD-Monomer-Ahx vollständig aufgehoben.

Die Bindungskapazität synthetischer RGD-Monomere, die mit verschieden langen Ahx-Spacern verknüpft sind, um eine optimale Bindung an Integrinmoleküle zu erreichen, wurde mittels *in vitro* Bindungsstudien miteinander verglichen. Dabei offenbarte das RGD-Momomer mit der mittleren Ahx-Spacer-länge die stärkste Bindung an Membraninkorporierte Integrine αvβ3 bzw. αvβ5, gefolgt vom RGD-Monomer mit dem kürzesten Ahx-Spacer und dem RGD-Monomer mit dem längsten Ahx-Spacer. Die verwendeten RGD-Monomere unterschieden sich hinsichtlich ihrer Selektivität gegenüber beiden Integrin αv-Subtypen nicht. Entsprechend der 2001 beschriebenen Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des Integrins αvβ3 ist die RGD-Bindungsdomäne in der globulären Kopfregion der beiden Untereinheiten des Integrins αvβ3 nur wenige Angström tief lokalisiert, was zu der Annahme führt, dass lange Spacer-Abstände nicht unbedingt erforderlich sind (Xiong et al. 2001, Xiong et al. 2002). Dennoch scheint die Verwendung von Spacern entscheidend zu sein, um rauhe Zelloberflächen auszugleichen und Bindungen der RGD-Peptide innerhalb von Oberflächenspalten der Zellmembran zu ermöglichen.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Horst Kessler wurden RGD-Multimere generiert, um die Anzahl der RGD-Gruppen in Integrinnähe zu erhöhen und deren Bindungen an Membraninkorporierte Integrine in *in vitro* Bindungstudien festgehalten. Die räumliche Anordnung der RGD-Motive innerhalb der Multimere für eine effiziente Integrinbindung auf Zelloberflächen ist bislang noch unzureichend untersucht. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten RGD-Peptide wurde Lysin als Verzweigungseinheit benutzt, um die verschiedenen RGD-Motive mit Ahx-*Spacern* miteinander zu verbinden. Daraus resultierten Makromoleküle, in denen die RGD-Erkennungsmotive der Integrine in einer komplexen Weise miteinander verknüpft sind (Cukierman et al. 2001, Thumshirn et al. 2003). Die Multimerisierung von RGD-Gruppen soll zu einer verstärkten Avidität synthetischer Integrin-Liganden führen (Mammen et al. 1998, Maynard et al. 2001, Thumshirn et al. 2003).

Die Aufzeichnung der Bindungssignale mono-, di- und tetramerer RGD-Peptide an die Integrine αvβ3 und αvβ5 mittels SPFS-Messungen liess einen direkten Vergleich polyvalenter Assoziationen zu. Das RGD-Dimer wies hierbei die größte Bindungskapazität gegenüber den Integrin αv-Subtypen im Vergleich zum RGD-Monomer auf. Das RGD-Tetramer zeigte allerdings eine weniger effektive Bindung gegenüber den Integrinen im Vergleich zum RGD-Dimer, was nicht mit den Ergebnissen anderer Bindungsstudien übereinstimmt. Dies könnte daran liegen, dass für die Bindungstests anderer Arbeitsgruppen von denen in der vorgelegten Arbeit veschiedene oligomere RGD-Peptide eingesetzt wurden, die zu einer Zunahme der Avidität als Folge multivalenter Integrin-Interaktionen führten (Kok et al. 2002, Maheshwari et al. 2001). Die Bindung von mehr als zwei Integrinmolekülen durch RGD-Tetramere könnte durch die Größe der Kopfgruppen der Integrine sterisch behindert werden. Darüber hinaus ist der Abstand zwischen den einzelnen Integrinmolekülen hinsichtlich ihrer Aktivität entscheidend. Wird der Abstand zwischen der Oberfläche und dem RGD-Liganden einer bestimmten *Spacer*-Länge, die an Oberflächen von Biomaterialen gebunden sind, verringert, so können Bindungen von Zellen, z.B. Osteoblasten, in Abhängigkeit von der *Spacer*-Länge vermindert oder sogar unterbunden werden (Auernheimer et al. 2005a, Spatz and Geiger 2007).

Neben der Evaluierung der Bindung spezifischer Integrin-Antagonisten in zell-freien SPS/SPFS-Bindungsstudien wurden Effekte synthetischer Liganden in vitro auf das adhäsive Verhalten humaner Ovarialkarzinomzellen analysiert. Unter Verwendung des Integrin avß3selektiven Peptids c(-RGDfV-) konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits in früheren in vitro Zelladhäsionstests demonstriert werden, dass das Integrin avß3 fast ausschließlich mit VN interagiert (Hapke et al. 2001b, Hapke et al. 2003). In Übereinstimmung mit diesen Resultaten wurde die Integrin avß3-vermittelte Adhäsion der OV-MZ-6-Zellen an VN drastisch durch die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Integrin avß3-selektiven RGD-Peptide reduziert. Die Zelladhäsion an Kol I blieb unverändert, da das EZM-Protein verschiedenen Ahx-Spacer-Längen offenbarten ähnliche IC₅₀-Werte hinsichtlich ihrer Effektivität, die Adhäsion an VN zu unterbrechen. Das RGD-Momomer mit der mittleren Ahx-Spacer-Länge zeigte die größte Inhibierung der Zelladhärenz an VN, gefolgt vom RGD-Monomer mit dem kürzesten Ahx-Spacer und dem RGD-Monomer mit dem längsten Ahx-Spacer. Hinsichtlich der inhibierenden Wirkung der multimeren RGD-Peptide auf Integrin avß3-vermittelte Zelladhäsionen konnten keine markanten Unterschiede zwischen den IC₅₀-Werten des RGD-Dimers und RGD-Tetramers festgestellt werden, obschon die IC₅₀-Werte der oligomeren RGD-Peptide deutlich höher waren als die der entsprechenden monomeren RGD-Peptide.

Die Resultate stimmen mit der gegenwärtigen Auffassung überein, dass flexible *Spacer* die Bindung von RGD-Peptiden an Integrine in räumlichen zellulären Mikrodomänen ermöglichen. Allerdings wurde in einigen Fällen eine verminderte Bindung an Integrinmoleküle beobachtet, wenn beispielsweise die *Spacer*-Gruppe zu lang war, da die ansteigende Entropie der längeren flexibleren *Spacer* einer stärkeren Bindung entgegenwirkt (Mammen et al. 1998). Da keine generellen Erkenntnisse dazu aus derzeitigen Publikationen gewonnen werden können, müssen verschiedene *Spacer*-Längen empirisch für das jeweilige Zellsystem sowie für spezifische experimentelle Ansätze ausgetestet werden. Zell-EZM-Adhäsionen beeinflussen das zelluläre Verhalten nicht nur durch Anwesenheit von RGD-Motiven, sondern auch durch deren Verteilung und Dichte innerhalb der zellulären Mikroumgebung. Die Auswirkungen der räumlichen Anordnung der RGD-Gruppen auf zelluläre Antworten, wie Adhäsion, Migration und Wachstum, sind auf molekularer Ebene derzeit noch weitgehend unklar.

Abschliessend betrachtet stimmen die Ergebnisse der in vitro Zelladhäsionstests nicht mit den Ergebnissen der SPFS-Bindungstests überein. Dies lässt sich aber durch die unterschiedliche Beschaffenheit und Eigenschaften der Bindungsoberfläche auf natürlichen Zellmembranen im Vergleich artifiziellen Membranoberfläche Integrin-funktionalisierter zur Phospholipiddoppelschichten des SPFS-Biosensors erklären. An Plastikoberflächen immobilisierte RGD-Peptide unterstützen die Zelladhäsion, wobei die Dichte der RGD-Motive auf der Oberfläche in Verbindung mit dem Ausmaß der Zelladhäsion, der Ausbildung fokaler Adhäsionskontakte, der Zellausbreitung, Migration, Proliferation und dem Zellüberleben steht (Jeschke et al. 2002, Kantlehner et al. 2000, Mann and West 2002, Spatz and Geiger 2007). Es konnte demonstriert werden, dass die Zellmigration durch die Dichte der RGD-Motive auf Oberflächen bestimmt wird (Brandley and Schnaar 1989). Durch exakte Vermessungen von RGD-Oberflächen konnte eine maximale Distanz zwischen den Integrinen von 65 nm für die Ausbildung fokaler Zelladhäsionskontakte nachgewiesen werden (Brandley and Schnaar 1989).

Die in der vorgelegten Arbeit gewählte Methode der Oberflächenplasmonenspektroskopie diente der Analyse und Bewertung von Bindungen spezifischer Integrin-Antagonisten auf Integrin-funktionalisierten Phospholipidmembranen. Dabei war es möglich, Assoziationen von sehr kleinen Liganden mit transmembranen nativen Rezeptoren, wie Integrinen, in Echtzeit, in einer Mikroumgebung, mit niedrigen Hintergrundsignalen und hoher Präzision zu beurteilen.

6. ANHANG

Zusammenfassung

Integrine sind zelluläre Adhäsivrezeptoren, die u.a. in pathophysiologische Prozesse, wie Tumorangiogenese und -progression, involviert sind. Sie interagieren mit extrazellulären Matrixproteinen über die Zelladhäsionssequenz Arg-Gly-Asp (RGD), wodurch sie intrazelluläre Signale vermitteln, die zu Veränderungen im Genexpressionsmuster führen. Deshalb wurde die Integrin αvβ3-abhängige differentielle Genregulierung in humanen Ovarialkarzinomzellen untersucht. Hierbei konnte eine Induzierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R) und der *Integrin-linked Kinase* (ILK) als Funktion der Integrin αvβ3-Expression auf der Protein- und Promotor-Ebene nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden aufgrund der tumorbiologischen Bedeutung des Integrins αvβ3 RGDbasierte Integrin-Antagonisten hinsichtlich ihrer Bindungsselektivität und -spezifität in *in vitro*-Zelladhäsionstests sowie zellfreien, an gereinigten Membran-inkorporierten Integrinen mittels Oberflächenplasmonenspektroskopie charakterisiert.

Abbildungsverzeichnis

Abb.	1. Integrine-EZM-Interaktion	9
Abb.	2. Die Struktur der Integrine	10
Abb.	3. Effekte Integrin αvβ3-vermittelter Signaltransduktionen	12
Abb.	. 4. Integrin-abhängige Signaltransduktionskaskaden	17
Abb.	5. Die Struktur und Aktivierung des EGF-R	20
Abb.	. 6. Physikalische Verknüpfung des EGF-R mit Integrinen	23
Abb.	7. Die Primärstruktur der ILK	27
Abb.	. 8. Die Aktivierung und Signaltransduktionskaskaden der ILK	29
Abb.	9. RGD-basierte synthetische Integrin-Liganden	48
Abb.	. 10. Apparativer Aufbau der Messküvette für SPS-Messungen	51
Abb.	. 11. Chemisorption von Molekülen an Goldoberflächen	52
Abb.	. 12. Schematische Darstellung der verwendeten Messanordnung für SPFS-Messungen.	54
Abb.	13. Plasmonenspektroskopische Messung des Aufbaus einer Integrin-inkorporierten	
	Phospholipiddoppelschicht	56
Abb.	14. Nachweis der EGF-R-Promotor-Mutagenese der c-rel-Sequenz	64
Abb.	15. A. Nachweis der Überexpression des Integrins $\alpha v\beta 3$ nach stabiler Transfektion	
	humaner Ovarialkarzinomzellen. B. Untersuchung der Integrin avß3-abhängigen	
	differentiellen Genexpression in humanen Ovarialkarzinomzellen	66
Abb.	. 16. Detektion der Expression des EGF-R als Funktion des Integrins $\alpha v\beta 3$ in humanen	
	Ovarialkarzinomzellen mittels ICC und Auswertung am CLSM	68
Abb.	. 17. Nachweis des EGF-R in humanen Ovarialkarzinomzellen als Funktion der Integrin	1
	avß3-Expression mittels Western Blot-Analyse	70
Abb.	18. Nachweis des phosphorylierten EGF-R in humanen Ovarialkarzinomzellen als	
	Funktion der Integrin avß3-Expression mittels Western Blot-Analyse	71
Abb.	. 19. Detektion der EGF-R-Expression in humanen Ovarialkarzinomzellen als Funktion	
	des Integrins αvβ3 mittels ELISA	72
Abb.	20. A. Nachweis der EGF-R-Promotoraktivität in humanen Ovarialkarzinomzellen als	
	Funktion des Integrins avß3. B. Bestimmung der EGF-R-Promotoraktivität als Funktion	m
	des Integrins avß3 in Anwesenheit verschiedener EZM-Liganden	73
Abb.	21. A. Schema der EGF-R-Promotorkonstrukte. B. Bestimmung der EGF-R-	
	Promotoraktivität in Abhängigkeit verschieden langer Promotorkonstrukte als Funktion	n
	des Integrins avß3	74

Abb. 22. A. Bindungsstellen der DNA-Konsensusmotive der Transkriptionsfaktoren innerhalb
der EGF-R-Promotorsequenz. B. Nachweis der Aktivität verschiedener EGF-R-
Promotormutanten in Abhängigkeit des Integrins αvß3
Abb. 23. A. Nachweis der Überexpression des Integrins avß3 nach stabiler Transfektion
humaner Ovarialkarzinomzellen. B. Untersuchung der Integrin avß3-abhängigen
differentiellen Genexpression in humanen Ovarialkarzinomzellen
Abb. 24. Detektion der Expression der ILK als Funktion des Integrins avß3 in humanen
Ovarialkarzinomzellen mittels ICC und Auswertung am CLSM79
Abb. 25. Nachweis der ILK in humanen Ovarialkarzinomzellen als Funktion der Integrin
avß3-Expression mittels Western Blot-Analyse
Abb. 26. A. Nachweis der ILK-Promotoraktivität in humanen Ovarialkarzinomzellen als
Funktion des Integrins avß3. B. Bestimmung der ILK-Promotoraktivität als Funktion des
Integrins avß3 in Anwesenheit verschiedener EZM-Liganden
Abb. 27. A. Schema der ILK-Promotorkonstrukte. B. Bestimmung der ILK-Promotoraktivität
in Abhängigkeit verschieden langer Konstrukte als Funktion des Integrins avß3
Abb. 28. A. Bindungsstellen der DNA-Konsensusmotive der Transkriptionsfaktoren innerhalb
der ILK-Promotorsequenz. B. Nachweis der Aktivität verschiedener ILK-
Promotormutanten in Abhängigkeit des Integrins αvß3
Abb. 29. Nachweis der Bindung Integrin-spezifischer Ak an die Bindungsregion der Integrine
αvβ5 und αIIbβ3
Abb. 30. Bindung von EZM-Liganden an in Phospholipiddoppelschichten inkorporierte
Integrine avß3, avß5 bzw. aIIbß3
Abb. 31. Bindung von RGD-basierten Monomeren an in Phospholipiddoppelschichten
inkorporierte Integrine avß3, avß5 bzw. aIIbß391
Abb. 32. Bindung synthetischer mono- und multimerer Integrin-Liganden
Abb. 33. Kompetition der Bindung des RGD-Monomers an Membran-inkorporiertes Integrin
avß3 durch unmarkiertes VN und <i>vice versa</i>
Abb. 34. Vergleich der Bindung des synthetischen RGD-Monomer-(Ahx) ₃ und des von
diesem abgeleiteten Peptidomimetikums an Integrin avß3-funktionalisierte
Phospholipiddoppelschichten94
Abb. 35. Behandlung von Membran-gebundenem Integrin avß3 mit Proteinase K
Abb. 36. Effekte mono- und multimerer RGD-Peptide und des Peptidomimetikums auf die
Integrin αvβ3-vermittelte Adhäsion humaner Ovarialkarzinomzellen

Abkürzungsverzeichnis

aa	amino acid
Abb.	Abbildung
Ahx	ε-Aminohexansäure
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchinonsäure
bp	base pairs
BP	Bindungspuffer
BSA	bovines Serumalbumin
c	<i>cyclo</i> , zyklo
cDNA	komplementäre DNA
CLSM	konfokale Laserscanning-Mikroskopie
cps	counts per second
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMPE	Dimyristoyl-Phosphatidyl-Ethanolamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleotidphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDC	N-Ethyl-N-Dimethylaminopropyl-Carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent-assay
EGF	Epidermal growth factor
EGF-R	Epidermal growth factor receptor
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	fluorescence activated cell sorting
FAK	Focal adhesion kinase
FCS	fötales Kälberserum
FG	Fibrinogen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FN	Fibronektin
g	Erdbeschleunigung

GAM	growth arrest medium
H ₂ O bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Hegas	Heptaethylenglykolaminocarbonsäure
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl)-1-Piperazin]ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase
ICC	Immuncytochemie
IgG	Immunglobulin G
ILK	Integrin-linked kinase
kDA	Kilodalton
Kol I	Kollagen Typ I
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
mAk	monoklonaler Antikörper
МАРК	Mitogen activated protein kinase
min.	Minute
MW	molecular weight
mut	Mutante
NHS	N-Hydroxy-Succinimid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	phosphate buffered solution
PC	Phosphatidylcholin
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGF-R	Platelet-derived growth factor receptor
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
p-EGF-R	phosphorylated epidermal growth factor receptor
PKB/Akt	Proteinkinase B
PFA	Paraformaldehyd
RGD	Erkennungssequenz Arg-Gly-Asp
RLU	relative ligth units
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur

RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPFS	Surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy
SPR	Surface plasmon resonance
SPS	Surface plasmon resonance spectroscopy
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
Taq	thermophilus aquaticus
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit
VN	Vitronektin
v/v	Volumenanteil
w/v	Gewichtsvolumenanteil

Literaturverzeichnis

Aaronson, S. A. 1991. Growth factors and cancer. Science 254: 1146-53.

- Adelsman, M. A., J. B. McCarthy, and Y. Shimizu. 1999. Stimulation of beta1-integrin function by epidermal growth factor and heregulin-beta has distinct requirements for erbB2 but a similar dependence on phosphoinositide 3-OH kinase. *Mol Biol Cell* 10: 2861-78.
- Ahmed, N., K. Oliva, G. E. Rice, and M. A. Quinn. 2004. Cell-free 59 kDa immunoreactive integrin-linked kinase: a novel marker for ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 10: 2415-20.
- Ahmed, N., C. Riley, K. Oliva, E. Stutt, G. E. Rice, and M. A. Quinn. 2003. Integrin-linked kinase expression increases with ovarian tumour grade and is sustained by peritoneal tumour fluid. *J Pathol* 201: 229-37.
- Albelda, S. M., S. A. Mette, D. E. Elder, R. Stewart, L. Damjanovich, M. Herlyn, and C. A. Buck. 1990. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* 50: 6757-64.
- Alonso, J. L., M. Essafi, J. P. Xiong, T. Stehle, and M. A. Arnaout. 2002. Does the integrin alphaA domain act as a ligand for its betaA domain? *Curr Biol* 12: R340-2.
- Alper, O., E. S. Bergmann-Leitner, T. A. Bennett, N. F. Hacker, K. Stromberg, and W. G. Stetler-Stevenson. 2001. Epidermal growth factor receptor signaling and the invasive phenotype of ovarian carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 93: 1375-84.
- Alper, O., M. L. De Santis, K. Stromberg, N. F. Hacker, Y. S. Cho-Chung, and D. S. Salomon. 2000. Anti-sense suppression of epidermal growth factor receptor expression alters cellular proliferation, cell-adhesion and tumorigenicity in ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 88: 566-74.
- Arnaout, M. A., S. L. Goodman, and J. P. Xiong. 2002. Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr Opin Cell Biol* 14: 641-51.
- Arnaout, M. A., B. Mahalingam, and J. P. Xiong. 2005. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 381-410.
- Arndt, T., U. Arndt, U. Reuning, and H. Kessler. 2005. Integrins in angiogenesis: implications for tumor therapy. *Cancer Therapy: Molecular Targets in Tumor-Host Interactions*. Weber, G. F., Ed.; Horizon Bioscience: Norfolk, U.K.: 93-141.
- Attwell, S., C. Roskelley, and S. Dedhar. 2000. The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene* 19: 3811-5.

- Auernheimer, J., C. Dahmen, U. Hersel, A. Bausch, and H. Kessler. 2005a. Photoswitched cell adhesion on surfaces with RGD peptides. *J Am Chem Soc* 127: 16107-10.
- Auernheimer, J., D. Zukowski, C. Dahmen, M. Kantlehner, A. Enderle, S. L. Goodman, and H. Kessler. 2005b. Titanium implant materials with improved biocompatibility through coating with phosphonate-anchored cyclic RGD peptides. *Chembiochem* 6: 2034-40.
- Auersperg, N., A. S. Wong, K. C. Choi, S. K. Kang, and P. C. Leung. 2001. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 22: 255-88.
- Aumailley, M., M. Gurrath, G. Muller, J. Calvete, R. Timpl, and H. Kessler. 1991. Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett* 291: 50-4.
- Bast, R. C., Jr., M. Brewer, C. Zou, M. A. Hernandez, M. Daley, R. Ozols, K. Lu, Z. Lu, D. Badgwell, G. B. Mills, S. Skates, Z. Zhang, D. Chan, A. Lokshin, and Y. Yu. 2007. Prevention and early detection of ovarian cancer: mission impossible? *Recent Results Cancer Res* 174: 91-100.
- Beglova, N., S. C. Blacklow, J. Takagi, and T. A. Springer. 2002. Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat Struct Biol* 9: 282-7.
- Bella, J., and H. M. Berman. 2000. Integrin-collagen complex: a metal-glutamate handshake. *Structure* 8: R121-6.
- Belvisi, L., T. Riccioni, M. Marcellini, L. Vesci, I. Chiarucci, D. Efrati, D. Potenza, C. Scolastico, L. Manzoni, K. Lombardo, M. A. Stasi, A. Orlandi, A. Ciucci, B. Nico, D. Ribatti, G. Giannini, M. Presta, P. Carminati, and C. Pisano. 2005. Biological and molecular properties of a new alpha(v)beta3/alpha(v)beta5 integrin antagonist. *Mol Cancer Ther* 4: 1670-80.
- Blume-Jensen, P., and T. Hunter. 2001. Oncogenic kinase signalling. Nature 411: 355-65.
- Borges, E., Y. Jan, and E. Ruoslahti. 2000. Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain. *J Biol Chem* 275: 39867-73.
- Borgono, C. A., T. Kishi, A. Scorilas, N. Harbeck, J. Dorn, B. Schmalfeldt, M. Schmitt, and E. P. Diamandis. 2006. Human kallikrein 8 protein is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 12: 1487-93.
- Bork, P., T. Doerks, T. A. Springer, and B. Snel. 1999. Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci* 24: 261-3.

- Brader, K. R., J. K. Wolf, S. Chakrabarty, and J. E. Price. 1998. Epidermal growth factor receptor (EGFR) antisense transfection reduces the expression of EGFR and suppresses the malignant phenotype of a human ovarian cancer cell line. *Oncol Rep* 5: 1269-74.
- Brakebusch, C., and R. Fassler. 2003. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *Embo J* 22: 2324-33.
- Brandley, B. K., and R. L. Schnaar. 1989. Tumor cell haptotaxis on covalently immobilized linear and exponential gradients of a cell adhesion peptide. *Dev Biol* 135: 74-86.
- Brooks, P. C., R. A. Clark, and D. A. Cheresh. 1994. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264: 569-71.
- Brooks, P. C., S. Stromblad, R. Klemke, D. Visscher, F. H. Sarkar, and D. A. Cheresh. 1995. Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest* 96: 1815-22.
- Brown, M. C., J. A. Perrotta, and C. E. Turner. 1996. Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J Cell Biol* 135: 1109-23.
- Bunjes, N., E. K. Schmidt, A. Jonczyk, F. Rippmann, D. Beyer, H. Ringsdorf, P. Gräber, W. Knoll, and R. Naumann. 1997. Thiopeptide-supported lipid layers on solid substrates. *Langmuir* 13: 6188-6194.
- Cabodi, S., L. Moro, E. Bergatto, E. Boeri Erba, P. Di Stefano, E. Turco, G. Tarone, and P. Defilippi. 2004. Integrin regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor and of EGF-dependent responses. *Biochem Soc Trans* 32: 438-42.
- Calderwood, D. A., Y. Fujioka, J. M. de Pereda, B. Garcia-Alvarez, T. Nakamoto, B. Margolis, C. J. McGlade, R. C. Liddington, and M. H. Ginsberg. 2003. Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2272-7.
- Cannistra, S. A., C. Ottensmeier, J. Niloff, B. Orta, and J. DiCarlo. 1995. Expression and function of beta 1 and alpha v beta 3 integrins in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 58: 216-25.
- Carpenter, G., L. King, Jr., and S. Cohen. 1978. Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature* 276: 409-10.

- Carreiras, F., S. Cruet, C. Staedel, F. Sichel, and P. Gauduchon. 1999. Human ovarian adenocarcinoma cells synthesize vitronectin and use It to organize their adhesion. *Gynecol Oncol* 72: 312-22.
- Carreiras, F., Y. Denoux, C. Staedel, M. Lehmann, F. Sichel, and P. Gauduchon. 1996. Expression and localization of alpha v integrins and their ligand vitronectin in normal ovarian epithelium and in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 62: 260-7.
- Chen, P., K. Gupta, and A. Wells. 1994a. Cell movement elicited by epidermal growth factor receptor requires kinase and autophosphorylation but is separable from mitogenesis. J Cell Biol 124: 547-55.
- Chen, P., H. Xie, M. C. Sekar, K. Gupta, and A. Wells. 1994b. Epidermal growth factor receptor-mediated cell motility: phospholipase C activity is required, but mitogenactivated protein kinase activity is not sufficient for induced cell movement. *J Cell Biol* 127: 847-57.
- Chen, Q., M. S. Kinch, T. H. Lin, K. Burridge, and R. L. Juliano. 1994c. Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 269: 26602-5.
- Cheresh, D. A. 1991. Structure, function and biological properties of integrin alpha v beta 3 on human melanoma cells. *Cancer Metastasis Rev* 10: 3-10.
- Chinnaiyan, P., and P. M. Harari. 2006. Clinical advancement of EGFR inhibitors in cancer therapy. *Methods Mol Biol* 327: 189-202.
- Chung, W. Y., L. Yuan, L. Feng, T. Hensle, and B. Tycko. 1996. Chromosome 11p15.5 regional imprinting: comparative analysis of KIP2 and H19 in human tissues and Wilms' tumors. *Hum Mol Genet* 5: 1101-8.
- Citri, A., and Y. Yarden. 2006. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 505-16.
- Coletta, R. D., P. Jedlicka, A. Gutierrez-Hartmann, and H. L. Ford. 2004. Transcriptional control of the cell cycle in mammary gland development and tumorigenesis. J Mammary Gland Biol Neoplasia 9: 39-53.
- Critchley, D. R. 2004. Cytoskeletal proteins talin and vinculin in integrin-mediated adhesion. *Biochem Soc Trans* 32: 831-6.
- Cruet, S., C. Salamanca, G. W. Mitchell, and N. Auersperg. 1999. alphavbeta3 and vitronectin expression by normal ovarian surface epithelial cells: role in cell adhesion and cell proliferation. *Gynecol Oncol* 75: 254-60.

- Cruet-Hennequart, S., S. Maubant, J. Luis, P. Gauduchon, C. Staedel, and S. Dedhar. 2003. alpha(v) integrins regulate cell proliferation through integrin-linked kinase (ILK) in ovarian cancer cells. *Oncogene* 22: 1688-702.
- Cukierman, E., R. Pankov, D. R. Stevens, and K. M. Yamada. 2001. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294: 1708-12.
- Czuchra, A., H. Meyer, K. R. Legate, C. Brakebusch, and R. Fassler. 2006. Genetic analysis of beta1 integrin "activation motifs" in mice. *J Cell Biol* 174: 889-99.
- Dahmen, C., J. Auernheimer, A. Meyer, A. Enderle, S. L. Goodman, and H. Kessler. 2004. Improving implant materials by coating with nonpeptidic, highly specific integrin ligands. *Angew Chem Int Ed Engl* 43: 6649-52.
- D'Amico, M., J. Hulit, D. F. Amanatullah, B. T. Zafonte, C. Albanese, B. Bouzahzah, M. Fu,
 L. H. Augenlicht, L. A. Donehower, K. Takemaru, R. T. Moon, R. Davis, M. P.
 Lisanti, M. Shtutman, J. Zhurinsky, A. Ben-Ze'ev, A. A. Troussard, S. Dedhar, and R.
 G. Pestell. 2000. The integrin-linked kinase regulates the cyclin D1 gene through glycogen synthase kinase 3beta and cAMP-responsive element-binding proteindependent pathways. *J Biol Chem* 275: 32649-57.
- D'Amore, P. A., and R. W. Thompson. 1987. Mechanisms of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 49: 453-64.
- Daud, A., P. Munster, and D. R. Spriggs. 2001. New drugs in gynecologic cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2: 119-28.
- Deb, S. P., R. M. Munoz, D. R. Brown, M. A. Subler, and S. Deb. 1994. Wild-type human p53 activates the human epidermal growth factor receptor promoter. *Oncogene* 9: 1341-9.
- Dechantsreiter, M. A., E. Planker, B. Matha, E. Lohof, G. Holzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, and H. Kessler. 1999. N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(V)beta(3) integrin antagonists. *J Med Chem* 42: 3033-40.
- Dedhar, S. 2000. Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Curr Opin Cell Biol* 12: 250-6.
- Dedhar, S., B. Williams, and G. Hannigan. 1999. Integrin-linked kinase (ILK): a regulator of integrin and growth-factor signalling. *Trends Cell Biol* 9: 319-23.
- Delcommenne, M., C. Tan, V. Gray, L. Rue, J. Woodgett, and S. Dedhar. 1998. 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: 11211-6.

- Deng, J. T., J. E. Van Lierop, C. Sutherland, and M. P. Walsh. 2001. Ca2+-independent smooth muscle contraction. a novel function for integrin-linked kinase. *J Biol Chem* 276: 16365-73.
- Diefenbach, B. 1995. Dissertation. MerckKGaA, Präklinische Forschung, Darmstadt.
- Drapkin, R., H. H. von Horsten, Y. Lin, S. C. Mok, C. P. Crum, W. R. Welch, and J. L. Hecht. 2005. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 65: 2162-9.
- Driver, G. A., and R. B. Veale. 2006. Modulation of integrin-linked kinase (ILK) expression in human oesophageal squamous cell carcinoma cell lines by the EGF and TGFbeta1 growth factors. *Cancer Cell Int* 6: 12.
- Duggan, M. E., L. T. Duong, J. E. Fisher, T. G. Hamill, W. F. Hoffman, J. R. Huff, N. C. Ihle, C. T. Leu, R. M. Nagy, J. J. Perkins, S. B. Rodan, G. Wesolowski, D. B. Whitman, A. E. Zartman, G. A. Rodan, and G. D. Hartman. 2000. Nonpeptide alpha(v)beta(3) antagonists. 1. Transformation of a potent, integrin-selective alpha(IIb)beta(3) antagonist into a potent alpha(v)beta(3) antagonist. *J Med Chem* 43: 3736-45.
- Duxbury, M. S., H. Ito, E. Benoit, T. Waseem, S. W. Ashley, and E. E. Whang. 2005. RNA interference demonstrates a novel role for integrin-linked kinase as a determinant of pancreatic adenocarcinoma cell gemcitabine chemoresistance. *Clin Cancer Res* 11: 3433-8.
- Eliceiri, B. P., and D. A. Cheresh. 1999. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 103: 1227-30.
- Engel, J., G. Hölscher, and G. Schubert-Fritschle. 2004. Epidemiologie. MANUAL Maligne Ovarialtumoren. *Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München*: 1-11.
- Ertl, P., B. Rohde, and P. Selzer. 2000. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J Med Chem* 43: 3714-7.
- Eskens, F. A., H. Dumez, R. Hoekstra, A. Perschl, C. Brindley, S. Bottcher, W. Wynendaele, J. Drevs, J. Verweij, and A. T. van Oosterom. 2003. Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins alphavbeta3 and alphavbeta5 in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer* 39: 917-26.

- Falcioni, R., A. Antonini, P. Nistico, S. Di Stefano, M. Crescenzi, P. G. Natali, and A. Sacchi. 1997. Alpha 6 beta 4 and alpha 6 beta 1 integrins associate with ErbB-2 in human carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* 236: 76-85.
- Felding-Habermann, B. 2003. Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis* 20: 203-13.
- Felding-Habermann, B., E. Fransvea, T. E. O'Toole, L. Manzuk, B. Faha, and M. Hensler. 2002. Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 19: 427-36.
- Felding-Habermann, B., B. M. Mueller, C. A. Romerdahl, and D. A. Cheresh. 1992. Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J Clin Invest* 89: 2018-22.
- Fields, G. B., and R. L. Noble. 1990. Solid phase peptide synthesis utilizing 9fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res* 35: 161-214.
- Fischer, K., V. Lutz, O. Wilhelm, M. Schmitt, H. Graeff, P. Heiss, T. Nishiguchi, N. Harbeck,
 H. Kessler, T. Luther, V. Magdolen, and U. Reuning. 1998. Urokinase induces proliferation of human ovarian cancer cells: characterization of structural elements required for growth factor function. *FEBS Lett* 438: 101-105.
- Folgiero, V., R. E. Bachelder, G. Bon, A. Sacchi, R. Falcioni, and A. M. Mercurio. 2007. The alpha6beta4 integrin can regulate ErbB-3 expression: implications for alpha6beta4 signaling and function. *Cancer Res* 67: 1645-52.
- Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 27-31.
- Friedrich, E. B., E. Liu, S. Sinha, S. Cook, D. S. Milstone, C. A. MacRae, M. Mariotti, P. J. Kuhlencordt, T. Force, A. Rosenzweig, R. St-Arnaud, S. Dedhar, and R. E. Gerszten. 2004. Integrin-linked kinase regulates endothelial cell survival and vascular development. *Mol Cell Biol* 24: 8134-44.
- Gambaletta, D., A. Marchetti, L. Benedetti, A. M. Mercurio, A. Sacchi, and R. Falcioni. 2000.
 Cooperative signaling between alpha(6)beta(4) integrin and ErbB-2 receptor is required to promote phosphatidylinositol 3-kinase-dependent invasion. *J Biol Chem* 275: 10604-10.
- Garcia-Alvarez, B., J. M. de Pereda, D. A. Calderwood, T. S. Ulmer, D. Critchley, I. D. Campbell, M. H. Ginsberg, and R. C. Liddington. 2003. Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol Cell* 11: 49-58.

- Gardner, D. P., and N. Shimizu. 1990. TPA induces repression of EGF receptor gene expression. *FEBS Lett* 269: 288-91.
- Giancotti, F. G. 1997. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* 9: 691-700.
- Giancotti, F. G., and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. Science 285: 1028-32.
- Giancotti, F. G., and G. Tarone. 2003. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 173-206.
- Gibson, C., S. L. Goodman, D. Hahn, G. Hölzemann, and H. Kessler. 1999. Novel solidphase synthesis of azapeptides and azapeptoids via Fmoc-strategy and its application in the synthesis of RGD-mimetics. *J Org Chem* 64: 7388-7394.
- Gibson, C., G. A. Sulyok, D. Hahn, S. L. Goodman, G. Holzemann, and H. Kessler. 2001. Nonpeptidic alpha(v)beta(3) Integrin Antagonist Libraries: On-Bead Screening and Mass Spectrometric Identification without Tagging The authors acknowledge technical assistance from M. Urzinger, B. Cordes, M. Kranawetter, and A. Schroder. Financial support of the Fonds der Chemischen Industrie and the Deutsche Forschungsgemeinschaft is gratefully acknowledged. *Angew Chem Int Ed Engl* 40: 165-169.
- Gilmore, T., M. E. Gapuzan, D. Kalaitzidis, and D. Starczynowski. 2002. Rel/NF-kappa B/I kappa B signal transduction in the generation and treatment of human cancer. *Cancer Lett* 181: 1-9.
- Ginsberg, M. H., A. Partridge, and S. J. Shattil. 2005. Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol* 17: 509-16.
- Gladson, C. L., and D. A. Cheresh. 1991. Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J Clin Invest* 88: 1924-32.
- Goodman, S. L., G. Holzemann, G. A. Sulyok, and H. Kessler. 2002. Nanomolar small molecule inhibitors for alphav(beta)6, alphav(beta)5, and alphav(beta)3 integrins. J Med Chem 45: 1045-51.
- Gordon, A. N., N. Finkler, R. P. Edwards, A. A. Garcia, M. Crozier, D. H. Irwin, and E. Barrett. 2005. Efficacy and safety of erlotinib HCl, an epidermal growth factor receptor (HER1/EGFR) tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ovarian carcinoma: results from a phase II multicenter study. *Int J Gynecol Cancer* 15: 785-92.

- Gottschalk, K. E., P. D. Adams, A. T. Brunger, and H. Kessler. 2002a. Transmembrane signal transduction of the alpha(IIb)beta(3) integrin. *Protein Sci* 11: 1800-12.
- Gottschalk, K. E., R. Gunther, and H. Kessler. 2002b. A three-state mechanism of integrin activation and signal transduction for integrin alpha(v)beta(3). *Chembiochem* 3: 470-3.
- Gottschalk, K. E., and H. Kessler. 2002. The structures of integrins and integrin-ligand complexes: implications for drug design and signal transduction. *Angew Chem Int Ed Engl* 41: 3767-74.
- Graff, J. R., J. A. Deddens, B. W. Konicek, B. M. Colligan, B. M. Hurst, H. W. Carter, and J. H. Carter. 2001. Integrin-linked kinase expression increases with prostate tumor grade. *Clin Cancer Res* 7: 1987-91.
- Grandis, J. R., and J. C. Sok. 2004. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol Ther* 102: 37-46.
- Gurrath, M., G. Muller, H. Kessler, M. Aumailley, and R. Timpl. 1992. Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides. *Eur J Biochem* 210: 911-21.
- Haley, J., N. Whittle, P. Bennet, D. Kinchington, A. Ullrich, and M. Waterfield. 1987. The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription. *Oncogene Res* 1: 375-96.
- Hanks, S. K., and T. R. Polte. 1997. Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays* 19: 137-45.
- Hannigan, G. E., J. Bayani, R. Weksberg, B. Beatty, A. Pandita, S. Dedhar, and J. Squire. 1997. Mapping of the gene encoding the integrin-linked kinase, ILK, to human chromosome 11p15.5-p15.4. *Genomics* 42: 177-9.
- Hannigan, G. E., C. Leung-Hagesteijn, L. Fitz-Gibbon, M. G. Coppolino, G. Radeva, J. Filmus, J. C. Bell, and S. Dedhar. 1996. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 379: 91-6.
- Hapke, S. 2000. alpha(v)beta(3)-Integrin bedingte Regulation der Zelladhäsion, -invasion und -proliferation beim Ovarialkarzinom. Dissertation. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.
- Hapke, S., M. Gawaz, K. Dehne, J. Kohler, J. F. Marshall, H. Graeff, M. Schmitt, U. Reuning, and E. Lengyel. 2001a. beta(3)A-integrin downregulates the urokinase-type plasminogen activator receptor (u-PAR) through a PEA3/ets transcriptional silencing element in the u-PAR promoter. *Mol Cell Biol* 21: 2118-32.

- Hapke, S., H. Kessler, N. Arroyo de Prada, A. Benge, M. Schmitt, E. Lengyel, and U. Reuning. 2001b. Integrin alpha(v)beta(3)/vitronectin interaction affects expression of the urokinase system in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 276: 26340-8.
- Hapke, S., H. Kessler, B. Luber, A. Benge, P. Hutzler, H. Hofler, M. Schmitt, and U. Reuning. 2003. Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha(v)beta3/Vitronectin interaction. *Biol Chem* 384: 1073-83.
- Haubner, R., D. Finsinger, and H. Kessler. 1997. Stereoisomere Peptid-Bibliotheken und Peptidomimetika zum Design von selektiven Inhibitoren des alpha(v)beta(3)-Integrins für eine neuartige Krebstherapie. Angew Chem 109: 1440-1456. Int. Ed. Engl. 36: 1374-1389.
- Haubner, R., R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, and H. Kessler. 1996. Structural and functional aspects of RGD-containing cyclic pentapeptides as highly potent and selective integrin alpha(v) beta(3) antagonists. *J Am Chem Soc* 118: 7461-7472.
- Hauptmann, S., C. Denkert, I. Koch, S. Petersen, K. Schluns, A. Reles, M. Dietel, and I. Petersen. 2002. Genetic alterations in epithelial ovarian tumors analyzed by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol* 33: 632-41.
- Heckmann, D., A. Meyer, L. Marinelli, G. Zahn, R. Stragies, and H. Kessler. 2007. Probing integrin selectivity: rational design of highly active and selective ligands for the alpha5beta1 and alphavbeta3 integrin receptor. *Angew Chem Int Ed Engl* 46: 3571-4.
- Hehlgans, S., M. Haase, and N. Cordes. 2007. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta* 1775: 163-80.
- Hellstrom, I., J. Raycraft, M. Hayden-Ledbetter, J. A. Ledbetter, M. Schummer, M. McIntosh,C. Drescher, N. Urban, and K. E. Hellstrom. 2003. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res* 63: 3695-700.
- Hermsen, B. B., S. von Mensdorff-Pouilly, J. Berkhof, P. J. van Diest, J. J. Gille, F. H. Menko, M. A. Blankenstein, P. Kenemans, and R. H. Verheijen. 2007. Serum CA-125 in relation to adnexal dysplasia and cancer in women at hereditary high risk of ovarian cancer. J Clin Oncol 25: 1383-9.
- Hersel, U., C. Dahmen, and H. Kessler. 2003. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 24: 4385-415.
- Hou, X., A. C. Johnson, and M. R. Rosner. 1994. Identification of an epidermal growth factor receptor transcriptional repressor. *J Biol Chem* 269: 4307-12.

- Hsu, T., M. Trojanowska, and D. K. Watson. 2004. Ets proteins in biological control and cancer. *J Cell Biochem* 91: 896-903.
- Hudson, L. G., K. L. Thompson, J. Xu, and G. N. Gill. 1990. Identification and characterization of a regulated promoter element in the epidermal growth factor receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7536-40.
- Hynes, R. O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. Cell 48: 549-54.
- -. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 69: 11-25.
- —. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 110: 673-87.
- Janji, B., C. Melchior, V. Gouon, L. Vallar, and N. Kieffer. 1999. Autocrine TGF-betaregulated expression of adhesion receptors and integrin-linked kinase in HT-144 melanoma cells correlates with their metastatic phenotype. *Int J Cancer* 83: 255-62.
- Janji, B., C. Melchior, L. Vallar, and N. Kieffer. 2000. Cloning of an isoform of integrinlinked kinase (ILK) that is upregulated in HT-144 melanoma cells following TGFbeta1 stimulation. *Oncogene* 19: 3069-77.
- Jeschke, B., J. Meyer, A. Jonczyk, H. Kessler, P. Adamietz, N. M. Meenen, M. Kantlehner, C. Goepfert, and B. Nies. 2002. RGD-peptides for tissue engineering of articular cartilage. *Biomaterials* 23: 3455-63.
- Johnson, A. C. 1996. Activation of epidermal growth factor receptor gene transcription by phorbol 12-myristate 13-acetate is mediated by activator protein 2. *J Biol Chem* 271: 3033-8.
- Johnson, R. P., and S. W. Craig. 1995. F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains. *Nature* 373: 261-4.
- Jones, J. I., M. E. Doerr, and D. R. Clemmons. 1995. Cell migration: interactions among integrins, IGFs and IGFBPs. *Prog Growth Factor Res* 6: 319-27.
- Jorissen, R. N., F. Walker, N. Pouliot, T. P. Garrett, C. W. Ward, and A. W. Burgess. 2003. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284: 31-53.
- Judson, P. L., X. He, W. G. Cance, and L. Van Le. 1999. Overexpression of focal adhesion kinase, a protein tyrosine kinase, in ovarian carcinoma. *Cancer* 86: 1551-6.
- Kageyama, R., G. T. Merlino, and I. Pastan. 1988a. Epidermal growth factor (EGF) receptor gene transcription. Requirement for Sp1 and an EGF receptor-specific factor. *J Biol Chem* 263: 6329-36.
- —. 1988b. A transcription factor active on the epidermal growth factor receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5016-20.

- Kamat, A. A., F. Z. Bischoff, D. Dang, M. F. Baldwin, L. Y. Han, Y. G. Lin, W. M. Merritt, C. N. Landen, Jr., C. Lu, D. M. Gershenson, J. L. Simpson, and A. K. Sood. 2006. Circulating cell-free DNA: a novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma. *Cancer Biol Ther* 5: 1369-74.
- Kantlehner, M., P. Schaffner, D. Finsinger, J. Meyer, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, G. Holzemann, S. L. Goodman, and H. Kessler. 2000. Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *Chembiochem* 1: 107-14.
- Karlan, B. Y., and M. McIntosh. 2007. The quest for ovarian cancer's Holy Grail: can CA-125 still be the chalice of early detection? *J Clin Oncol* 25: 1303-4.
- Kerr, J. S., A. M. Slee, and S. A. Mousa. 2000. Small molecule alpha(v) integrin antagonists: novel anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs* 9: 1271-9.
- Kiechle, M., A. Jacobsen, U. Schwarz-Boeger, J. Hedderich, J. Pfisterer, and N. Arnold. 2001. Comparative genomic hybridization detects genetic imbalances in primary ovarian carcinomas as correlated with grade of differentiation. *Cancer* 91: 534-40.
- Knoll, W. 1998. Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves. *Annu Rev Phys Chem* 49: 569-638.
- Knoll, W., C. W. Frank, C. Heibel, R. Naumann, A. Offenhausser, J. Ruhe, E. K. Schmidt, W.
 W. Shen, and A. Sinner. 2000. Functional tethered lipid bilayers. *J Biotechnol* 74: 137-58.
- Kok, R. J., A. J. Schraa, E. J. Bos, H. E. Moorlag, S. A. Asgeirsdottir, M. Everts, D. K. Meijer, and G. Molema. 2002. Preparation and functional evaluation of RGDmodified proteins as alpha(v)beta(3) integrin directed therapeutics. *Bioconjug Chem* 13: 128-35.
- Koul, D., R. Shen, S. Bergh, Y. Lu, J. F. de Groot, T. J. Liu, G. B. Mills, and W. K. Yung.
 2005. Targeting integrin-linked kinase inhibits Akt signaling pathways and decreases tumor progression of human glioblastoma. *Mol Cancer Ther* 4: 1681-8.
- Kouns, W. C., D. Kirchhofer, P. Hadvary, A. Edenhofer, T. Weller, G. Pfenninger, H. R. Baumgartner, L. K. Jennings, and B. Steiner. 1992. Reversible conformational changes induced in glycoprotein IIb-IIIa by a potent and selective peptidomimetic inhibitor. *Blood* 80: 2539-47.
- Kretschmann, E. 1971a. Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. Z. Physik 241: 313-324.

- —. 1971b. Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberfldchenplasmaschwingungen. Z. Physik 241: 313-324.
- Kretschmann, E., and H. Raether. 1968. Radiative decay of nonradiative surface plasmon excited by light. Z. Naturf. 23A: 2135-2136.
- Krupka, S. 2005. Detektion molekularer Interaktionen an biofunktionalisierten Grenzflächen. Dissertation. Ludwigs-Maximilians-Universität München.
- Krupka, S. S., B. Wiltschi, U. Reuning, K. Holscher, M. Hara, and E. K. Sinner. 2006. In vivo detection of membrane protein expression using surface plasmon enhanced fluorescence spectroscopy (SPFS). *Biosens Bioelectron* 22: 260-7.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Lafrenie, R. M., S. Gallo, T. J. Podor, M. R. Buchanan, and F. W. Orr. 1994. The relative roles of vitronectin receptor, E-selectin and alpha 4 beta 1 in cancer cell adhesion to interleukin-1-treated endothelial cells. *Eur J Cancer* 30A: 2151-8.
- Lahana, R. 1999. How many leads from HTS? Drug Discov Today 4: 447-448.
- Landegren, U. 1984. Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J Immunol Methods* 67: 379-88.
- Lee, J. O., L. A. Bankston, M. A. Arnaout, and R. C. Liddington. 1995. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* 3: 1333-40.
- Legate, K. R., E. Montanez, O. Kudlacek, and R. Fassler. 2006. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 20-31.
- Lengyel, E., B. Schmalfeldt, E. Konik, K. Spathe, K. Harting, A. Fenn, U. Berger, R. Fridman, M. Schmitt, D. Prechtel, and W. Kuhn. 2001. Expression of latent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 82: 291-8.
- Leung-Hagesteijn, C., A. Mahendra, I. Naruszewicz, and G. E. Hannigan. 2001. Modulation of integrin signal transduction by ILKAP, a protein phosphatase 2C associating with the integrin-linked kinase, ILK1. *Embo J* 20: 2160-70.
- Li, F., Y. Zhang, and C. Wu. 1999a. Integrin-linked kinase is localized to cell-matrix focal adhesions but not cell-cell adhesion sites and the focal adhesion localization of integrin-linked kinase is regulated by the PINCH-binding ANK repeats. *J Cell Sci* 112 (Pt 24): 4589-99.

- Li, J., M. L. Lin, G. J. Wiepz, A. G. Guadarrama, and P. J. Bertics. 1999b. Integrin-mediated migration of murine B82L fibroblasts is dependent on the expression of an intact epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 274: 11209-19.
- Liapis, H., L. M. Adler, M. R. Wick, and J. S. Rader. 1997. Expression of alpha(v)beta3 integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas. *Hum Pathol* 28: 443-9.
- Lichtner, R. B., M. Wiedemuth, C. Noeske-Jungblut, and V. Schirrmacher. 1993. Rapid effects of EGF on cytoskeletal structures and adhesive properties of highly metastatic rat mammary adenocarcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 11: 113-25.
- Liebermann, T., and W. Knoll. 2000. Surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy. Colloids & Surfaces A: Physicochemical & Engineering Aspects. *Elsevier* 171: 115-130.
- Liu, W., F. Innocenti, M. H. Wu, A. A. Desai, M. E. Dolan, E. H. Cook, Jr., and M. J. Ratain. 2005. A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res* 65: 46-53.
- Lossner, D., H. Kessler, G. Thumshirn, C. Dahmen, B. Wiltschi, M. Tanaka, W. Knoll, E. K. Sinner, and U. Reuning. 2006. Binding of small mono- and oligomeric integrin ligands to membrane-embedded integrins monitored by surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy. *Anal Chem* 78: 4524-33.
- Luo, B. H., C. V. Carman, and T. A. Springer. 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 25: 619-47.
- Luo, B. H., and T. A. Springer. 2006. Integrin structures and conformational signaling. *Curr Opin Cell Biol* 18: 579-86.
- Maheshwari, G., G. Brown, D. A. Lauffenburger, A. Wells, and L. G. Griffith. 2001. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J Cell Sci* 113: 1677-1686.
- Malik, S. N., L. L. Siu, E. K. Rowinsky, L. deGraffenried, L. A. Hammond, J. Rizzo, S. Bacus, M. G. Brattain, J. I. Kreisberg, and M. Hidalgo. 2003. Pharmacodynamic evaluation of the epidermal growth factor receptor inhibitor OSI-774 in human epidermis of cancer patients. *Clin Cancer Res* 9: 2478-86.
- Mammen, M., S.-K. Choi, and G. M. Whitesides. 1998. Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew Chem Int Ed* 37: 2755-2794.

- Mann, B. K., and J. L. West. 2002. Cell adhesion peptides alter smooth muscle cell adhesion, proliferation, migration, and matrix protein synthesis on modified surfaces and in polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 60: 86-93.
- Marshall, J. F., S. A. Nesbitt, M. H. Helfrich, M. A. Horton, K. Polakova, and I. R. Hart. 1991. Integrin expression in human melanoma cell lines: heterogeneity of vitronectin receptor composition and function. *Int J Cancer* 49: 924-31.
- Mattila, E., T. Pellinen, J. Nevo, K. Vuoriluoto, A. Arjonen, and J. Ivaska. 2005. Negative regulation of EGFR signalling through integrin-alpha1beta1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Nat Cell Biol* 7: 78-85.
- Maynard, H. D., S. Y. Okada, and R. H. Grubbs. 2001. Inhibition of cell adhesion to fibronectin by oligopeptide-substituted polynorbornenes. *J Am Chem Soc* 123: 1275-9.
- Mehta, R. J., B. Diefenbach, A. Brown, E. Cullen, A. Jonczyk, D. Gussow, G. A. Luckenbach, and S. L. Goodman. 1998. Transmembrane-truncated alphavbeta3 integrin retains high affinity for ligand binding: evidence for an 'inside-out' suppressor? *Biochem J* 330 (Pt 2): 861-9.
- Melchior, C., S. Kreis, B. Janji, and N. Kieffer. 2002. Promoter characterization and genomic organization of the gene encoding integrin-linked kinase 1. *Biochim Biophys Acta* 1575: 117-22.
- Mendelsohn, J. 2001. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 8: 3-9.
- Mendelsohn, J., and J. Baselga. 2000. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19: 6550-65.
- Miller, W. E., J. L. Cheshire, A. S. Baldwin, Jr., and N. Raab-Traub. 1998. The NPC derived C15 LMP1 protein confers enhanced activation of NF-kappa B and induction of the EGFR in epithelial cells. *Oncogene* 16: 1869-77.
- Miyamoto, S., H. Teramoto, J. S. Gutkind, and K. M. Yamada. 1996. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. J Cell Biol 135: 1633-42.
- Möbus, V., C. D. Gerharz, U. Press, R. Moll, T. Beck, W. Mellin, K. Pollow, P. G. Knapstein, and R. Kreienberg. 1992. Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 52: 76-84.

- Montgomery, A. M., R. A. Reisfeld, and D. A. Cheresh. 1994. Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8856-60.
- Morino, N., T. Mimura, K. Hamasaki, K. Tobe, K. Ueki, K. Kikuchi, K. Takehara, T. Kadowaki, Y. Yazaki, and Y. Nojima. 1995. Matrix/integrin interaction activates the mitogen-activated protein kinase, p44erk-1 and p42erk-2. *J Biol Chem* 270: 269-73.
- Moro, L., L. Dolce, S. Cabodi, E. Bergatto, E. B. Erba, M. Smeriglio, E. Turco, S. F. Retta, M. G. Giuffrida, M. Venturino, J. Godovac-Zimmermann, A. Conti, E. Schaefer, L. Beguinot, C. Tacchetti, P. Gaggini, L. Silengo, G. Tarone, and P. Defilippi. 2002. 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: 9405-14.
- Moro, L., M. Venturino, C. Bozzo, L. Silengo, F. Altruda, L. Beguinot, G. Tarone, and P. Defilippi. 1998. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *Embo J* 17: 6622-32.
- Mousa, S. A. 2003. alphav Vitronectin receptors in vascular-mediated disorders. *Med Res Rev* 23: 190-9.
- Naumann, R., E. K. Schmidt, A. Jonczyk, K. Fendler, B. Kadenbach, T. Liebermann, A. Offenhäusser, and W. Knoll. 1999. The peptide-tethered lipid membrane as a biomimetic system to incorporate cytochrome c oxidase in a functionallyactive form. *Biosensors & Bioelectronics* 14: 651-662.
- Neumann, T., M. L. Johansson, D. Kambhampati, and W. Knoll. 2002. Surface-plasmon fluorescence spectroscopy. *Adv Funct Mater* 12: 575-586.
- Nikolopoulos, S. N., and C. E. Turner. 2001. Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *J Biol Chem* 276: 23499-505.
- Ning, Y., T. Buranda, and L. G. Hudson. 2007. Activated epidermal growth factor receptor induces integrin alpha2 internalization via caveolae/raft-dependent endocytic pathway. *J Biol Chem* 282: 6380-7.
- Nip, J., and P. Brodt. 1995. The role of the integrin vitronectin receptor, alpha v beta 3 in melanoma metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 14: 241-52.
- Nishi, H., G. Neta, K. H. Nishi, L. M. Akers, T. Rikiyama, K. N. Proctor, B. A. Murphy, and A. C. Johnson. 2003. Analysis of the epidermal growth factor receptor promoter: the effect of nuclear factor-kappaB. *Int J Mol Med* 11: 49-55.

- Novak, A., S. C. Hsu, C. Leung-Hagesteijn, G. Radeva, J. Papkoff, R. Montesano, C. Roskelley, R. Grosschedl, and S. Dedhar. 1998. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4374-9.
- Oikawa, T. 2004. ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 95: 626-33.
- Persad, S., S. Attwell, V. Gray, M. Delcommenne, A. Troussard, J. Sanghera, and S. Dedhar. 2000. Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3207-12.
- Persad, S., S. Attwell, V. Gray, N. Mawji, J. T. Deng, D. Leung, J. Yan, J. Sanghera, M. P. Walsh, and S. Dedhar. 2001. 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: 27462-9.
- Persad, S., and S. Dedhar. 2003. The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 22: 375-84.
- Pfaff, M., K. Tangemann, B. Muller, M. Gurrath, G. Muller, H. Kessler, R. Timpl, and J. Engel. 1994. Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by alpha IIb beta 3, alpha V beta 3, and alpha 5 beta 1 integrins. *J Biol Chem* 269: 20233-8.
- Pierschbacher, M. D., and E. Ruoslahti. 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309: 30-3.
- Plopper, G. E., H. P. McNamee, L. E. Dike, K. Bojanowski, and D. E. Ingber. 1995. Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex. *Mol Biol Cell* 6: 1349-65.
- Plow, E. F., T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, and J. W. Smith. 2000. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 275: 21785-8.
- Poethko, T., M. Schottelius, G. Thumshirn, M. Herz, R. Haubner, G. Henriksen, H. Kessler,
 M. Schwaiger, and H.-J. Wester. 2004. Chemoselective pre-conjugate
 radiohalogenation of unprotected mono- and multimeric peptides via oxime formation.
 Radiochim Acta 92: 317-327.
- Posey, J. A., M. B. Khazaeli, A. DelGrosso, M. N. Saleh, C. Y. Lin, W. Huse, and A. F. LoBuglio. 2001. A pilot trial of Vitaxin, a humanized anti-vitronectin receptor (anti

alpha v beta 3) antibody in patients with metastatic cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 16: 125-32.

- Qian, Y., X. Zhong, D. C. Flynn, J. Z. Zheng, M. Qiao, C. Wu, S. Dedhar, X. Shi, and B. H. Jiang. 2005. ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling. *Oncogene* 24: 3154-65.
- Rabb, H., E. Barroso-Vicens, R. Adams, J. Pow-Sang, and G. Ramirez. 1996. Alpha-V/beta-3 and alpha-V/beta-5 integrin distribution in neoplastic kidney. *Am J Nephrol* 16: 402-8.
- Radeva, G., T. Petrocelli, E. Behrend, C. Leung-Hagesteijn, J. Filmus, J. Slingerland, and S. Dedhar. 1997. Overexpression of the integrin-linked kinase promotes anchorageindependent cell cycle progression. *J Biol Chem* 272: 13937-44.
- Raether, H. 1988. Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Raguse, J. D., H. J. Gath, J. Bier, H. Riess, and H. Oettle. 2004. Cilengitide (EMD 121974) arrests the growth of a heavily pretreated highly vascularised head and neck tumour. *Oral Oncol* 40: 228-30.
- Ranson, M., L. A. Hammond, D. Ferry, M. Kris, A. Tullo, P. I. Murray, V. Miller, S. Averbuch, J. Ochs, C. Morris, A. Feyereislova, H. Swaisland, and E. K. Rowinsky. 2002. ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol* 20: 2240-50.
- Riemenschneider, M. J., W. Mueller, R. A. Betensky, G. Mohapatra, and D. N. Louis. 2005. In situ analysis of integrin and growth factor receptor signaling pathways in human glioblastomas suggests overlapping relationships with focal adhesion kinase activation. *Am J Pathol* 167: 1379-87.
- Rosano, L., F. Spinella, V. Di Castro, M. R. Nicotra, S. Dedhar, A. G. de Herreros, P. G. Natali, and A. Bagnato. 2005. Endothelin-1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 65: 11649-57.
- Ruegg, C., O. Dormond, and A. Mariotti. 2004. Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1654: 51-67.
- Rust, W. L., S. W. Carper, and G. E. Plopper. 2002. The Promise of Integrins as Effective Targets for Anticancer Agents. *J Biomed Biotechnol* 2: 124-130.
- Saccà, B., E. K. Sinner, S. Fiori, J. Kaiser, J. E. Eble, and L. Moroder. 2002. Identification of the Cell-Adhesion Epitope of Collagen Type IV. *ChemBioChem* 9: 904-907.

- Sackmann, E. 1996. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* 271: 43-8.
- Sawai, H., Y. Okada, H. Funahashi, Y. Matsuo, H. Takahashi, H. Takeyama, and T. Manabe. 2006. Integrin-linked kinase activity is associated with interleukin-1 alpha-induced progressive behavior of pancreatic cancer and poor patient survival. *Oncogene* 25: 3237-46.
- Schelling, M., C. Anthuber, and S. Rutke. 2004. Früherkennung und Diagnostik. MANUAL Maligne Ovarialtumoren. *Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München*: 1-11.
- Schlessinger, J. 2002. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 110: 669-72.
- Schmidt, E. K., T. Liebermann, M. Kreiter, A. Jonczyk, R. Naumann, A. Offenhausser, E. Neumann, A. Kukol, A. Maelicke, and W. Knoll. 1998. Incorporation of the acetylcholine receptor dimer from Torpedo californica in a peptide supported lipid membrane investigated by surface plasmon and fluorescence spectroscopy. *Biosens Bioelectron* 13: 585-91.
- Schneller, M., K. Vuori, and E. Ruoslahti. 1997. Alphavbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *Embo J* 16: 5600-7.
- Schvartz, I., D. Seger, and S. Shaltiel. 1999. Vitronectin. Int J Biochem Cell Biol 31: 539-44.
- Schwartz, M. A., and V. Baron. 1999. Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections. *Curr Opin Cell Biol* 11: 197-202.
- Schwartz, M. A., and M. H. Ginsberg. 2002. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol* 4: E65-8.
- Seftor, R. E., E. A. Seftor, K. R. Gehlsen, W. G. Stetler-Stevenson, P. D. Brown, E. Ruoslahti, and M. J. Hendrix. 1992. Role of the alpha v beta 3 integrin in human melanoma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1557-61.
- Sevin-Landais, A., P. Rigler, S. Tzartos, F. Hucho, R. Hovius, and H. Vogel. 2000. Functional immobilisation of the nicotinic acetylcholine receptor in tethered lipid membranes. *Biophys Chem* 85: 141-52.
- Sheikh, M. S., F. Carrier, A. C. Johnson, S. E. Ogdon, and A. J. Fornace, Jr. 1997. Identification of an additional p53-responsive site in the human epidermal growth factor receptor gene promotor. *Oncogene* 15: 1095-101.

- Shimaoka, M., and T. A. Springer. 2003. Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. *Nat Rev Drug Discov* 2: 703-16.
- Shimaoka, M., J. Takagi, and T. A. Springer. 2002. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31: 485-516.
- Sieg, D. J., C. R. Hauck, D. Ilic, C. K. Klingbeil, E. Schaefer, C. H. Damsky, and D. D. Schlaepfer. 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2: 249-56.
- Sinner, E. K., and W. Knoll. 2001. Functional tethered membranes. *Curr Opin Chem Biol* 5: 705-11.
- -. 2002. Functional tethered membranes. Curr Opin Chem Biol 5: 705-11.
- Sinner, E. K., U. Reuning, F. N. Kok, B. Sacca, L. Moroder, W. Knoll, and D. Oesterhelt. 2004. Incorporation of integrins into artificial planar lipid membranes: characterization by plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy. *Anal Biochem* 333: 216-24.
- Sinner, E. K., Wiltschi, B. 2003. Erleuchtung für Membranproteine garantiert! BIOspektrum 2003/02, 275-7.
- Sood, A. K., J. E. Coffin, G. B. Schneider, M. S. Fletcher, B. R. DeYoung, L. M. Gruman, D. M. Gershenson, M. D. Schaller, and M. J. Hendrix. 2004. Biological significance of focal adhesion kinase in ovarian cancer: role in migration and invasion. *Am J Pathol* 165: 1087-95.
- Spatz, J. P., and B. Geiger. 2007. Molecular engineering of cellular environments: cell adhesion to nano-digital surfaces. *Methods Cell Biol* 83: 89-111.
- Stromberg, K., T. J. t. Collins, A. W. Gordon, C. L. Jackson, and G. R. Johnson. 1992. Transforming growth factor-alpha acts as an autocrine growth factor in ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res* 52: 341-7.
- Stupack, D. G., and D. A. Cheresh. 2004. Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol* 64: 207-38.
- Sulyok, G. A., C. Gibson, S. L. Goodman, G. Holzemann, M. Wiesner, and H. Kessler. 2001. Solid-phase synthesis of a nonpeptide RGD mimetic library: new selective alphavbeta3 integrin antagonists. *J Med Chem* 44: 1938-50.
- Sun, M., G. Wang, J. E. Paciga, R. I. Feldman, Z. Q. Yuan, X. L. Ma, S. A. Shelley, R. Jove,
 P. N. Tsichlis, S. V. Nicosia, and J. Q. Cheng. 2001. AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol* 159: 431-7.

- Sundberg, C., and K. Rubin. 1996. Stimulation of beta1 integrins on fibroblasts induces PDGF independent tyrosine phosphorylation of PDGF beta-receptors. *J Cell Biol* 132: 741-52.
- Takagi, J., B. M. Petre, T. Walz, and T. A. Springer. 2002. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 110: 599-11.
- Tan, C., P. Costello, J. Sanghera, D. Dominguez, J. Baulida, A. G. de Herreros, and S. Dedhar. 2001. 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: 133-40.
- Tannock, I. F., and D. Rotin. 1989. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res* 49: 4373-84.
- Thumshirn, G. 2003. Multivalente zyklische RGD-Peptide und RGD-Mimetika für den Einsatz in Tumordiagnostik und Tumortherapie. Dissertation. Technischen Universität München.
- Thumshirn, G., U. Hersel, S. L. Goodman, and H. Kessler. 2003. Multimeric cyclic RGD peptides as potential tools for tumor targeting: solid-phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation. *Chemistry* 9: 2717-25.
- Troussard, A. A., P. Costello, T. N. Yoganathan, S. Kumagai, C. D. Roskelley, and S. Dedhar. 2000. The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). Oncogene 19: 5444-52.
- Troussard, A. A., P. C. McDonald, E. D. Wederell, N. M. Mawji, N. R. Filipenko, K. A. Gelmon, J. E. Kucab, S. E. Dunn, J. T. Emerman, M. B. Bally, and S. Dedhar. 2006. Preferential dependence of breast cancer cells versus normal cells on integrin-linked kinase for protein kinase B/Akt activation and cell survival. *Cancer Res* 66: 393-403.
- Troussard, A. A., C. Tan, T. N. Yoganathan, and S. Dedhar. 1999. Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner. *Mol Cell Biol* 19: 7420-7.
- Tu, Y., F. Li, S. Goicoechea, and C. Wu. 1999. The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells. *Mol Cell Biol* 19: 2425-34.
- Tucker, G. C. 2003. Alpha v integrin inhibitors and cancer therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 4: 722-31.

- Wagner, M. L., and L. K. Tamm. 2000. Tethered polymer-supported planar lipid bilayers for reconstitution of integral membrane proteins: silane-polyethyleneglycol-lipid as a cushion and covalent linker. *Biophys J* 79: 1400-14.
- Wahl, F., and M. Mutter. 1996. Analogues of oxytocin with an oxime bridge using chemoselectively addressable building blocks. *Tetrahedron Lett* 37: 6861-6864.
- Watt, F. M. 2002. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *Embo J* 21: 3919-26.
- Wennerberg, K., R. Fassler, B. Warmegard, and S. Johansson. 1998. Mutational analysis of the potential phosphorylation sites in the cytoplasmic domain of integrin beta1A. Requirement for threonines 788-789 in receptor activation. *J Cell Sci* 111 (Pt 8): 1117-26.
- Woodard, A. S., G. Garcia-Cardena, M. Leong, J. A. Madri, W. C. Sessa, and L. R. Languino. 1998. The synergistic activity of alphavbeta3 integrin and PDGF receptor increases cell migration. *J Cell Sci* 111 (Pt 4): 469-78.
- Wu, C., S. Y. Keightley, C. Leung-Hagesteijn, G. Radeva, M. Coppolino, S. Goicoechea, J.
 A. McDonald, and S. Dedhar. 1998. Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression, and tumorigenicity. *J Biol Chem* 273: 528-36.
- Xie, W., F. Li, J. E. Kudlow, and C. Wu. 1998. Expression of the integrin-linked kinase (ILK) in mouse skin: loss of expression in suprabasal layers of the epidermis and up-regulation by erbB-2. *Am J Pathol* 153: 367-72.
- Xiong, J. P., T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, and M. A. Arnaout. 2001. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* 294: 339-45.
- Xiong, J. P., T. Stehle, S. L. Goodman, and M. A. Arnaout. 2003. New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood* 102: 1155-9.
- Xiong, J. P., T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, and M. A. Arnaout. 2002. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 296: 151-5.
- Xu, Y. H., N. Richert, S. Ito, G. T. Merlino, and I. Pastan. 1984. Characterization of epidermal growth factor receptor gene expression in malignant and normal human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 7308-12.
- Yamaji, S., A. Suzuki, Y. Sugiyama, Y. Koide, M. Yoshida, H. Kanamori, H. Mohri, S. Ohno, and Y. Ishigatsubo. 2001. A novel integrin-linked kinase-binding protein,
affixin, is involved in the early stage of cell-substrate interaction. *J Cell Biol* 153: 1251-64.

- Yasuda, N., Y. Hsiao, M. S. Jensen, N. R. Rivera, C. Yang, K. M. Wells, J. Yau, M. Palucki, L. Tan, P. G. Dormer, R. P. Volante, D. L. Hughes, and P. J. Reider. 2004. An efficient synthesis of an alphavbeta3 antagonist. *J Org Chem* 69: 1959-66.
- Yoganathan, N., A. Yee, Z. Zhang, D. Leung, J. Yan, L. Fazli, D. L. Kojic, P. C. Costello, M. Jabali, S. Dedhar, and J. Sanghera. 2002. Integrin-linked kinase, a promising cancer therapeutic target: biochemical and biological properties. *Pharmacol Ther* 93: 233-42.
- Yoganathan, T. N., P. Costello, X. Chen, M. Jabali, J. Yan, D. Leung, Z. Zhang, A. Yee, S. Dedhar, and J. Sanghera. 2000. Integrin-linked kinase (ILK): a "hot" therapeutic target. *Biochem Pharmacol* 60: 1115-9.
- Yoon, S. O., S. Shin, and E. A. Lipscomb. 2006. A novel mechanism for integrin-mediated ras activation in breast carcinoma cells: the alpha6beta4 integrin regulates ErbB2 translation and transactivates epidermal growth factor receptor/ErbB2 signaling. *Cancer Res* 66: 2732-9.
- Yousef, G. M., M. E. Polymeris, L. Grass, A. Soosaipillai, P. C. Chan, A. Scorilas, C. Borgono, N. Harbeck, B. Schmalfeldt, J. Dorn, M. Schmitt, and E. P. Diamandis. 2003. Human kallikrein 5: a potential novel serum biomarker for breast and ovarian cancer. *Cancer Res* 63: 3958-65.
- Zhu, X., and R. K. Assoian. 1995. Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol Biol Cell* 6: 273-82.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Daniela Lössner
Geburtsdatum:	27.Oktober 1977
Geburtsort:	Neuhaus am Rennweg, Thüringen
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung

1984-1986	Grundschule Oberweißbach, Thüringen
1986-1991	Gesamtschule Neuhaus am Rennweg, Thüringen
1991-1996	Staatliches Hennebergisches Gymnasium "Georg Ernst" Schleusingen,
	Thüringen
06/1996	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Akademischer Werdegang

09/1997-09/1999	Biologie-Studium an der Friedrich-Alexander-Universität	
	Erlangen-Nürnberg, Bayern	
09/1999-03/2003	Biologie-Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Thüringen	
08/2001-03/2003	Diplomarbeit am Institut für Spezielle Botanik, Thema: "Biogeograph	
	und Sippendifferenzierung der Gattung Rosa unter besonderer	
	Berücksichtigung des Formenkreises von Rosa spinosissima L."	
	Betreuung: PD Dr. Volker Wissemann	
	Finanzielle Unterstützung: Stiftung des Vereins Deutscher	
	Rosenfreunde (VDR) Europa-Rosarium Sangerhausen, Thüringen	
09/2003	Erwerb des Diploms in Biologie	
12/2002-01/2007	Promotion in der Klinischen Forschergruppe (Direktor: Prof. Dr.	
	Manfred Schmitt) der Frauenklinik der Technischen Universität	
	München, Klinikum rechts der Isar, Thema: "Tumorbiologische Rolle	
	des Integrins avß3 beim humanen Ovarialkarzinom"	
	Betreuung: PD Dr. Ute Reuning	
	Finanzielle Unterstützung: Forschungsstipendium der Deutschen	
	Forschungsgemeinschaft (DFG)	
02/2007-02/2009	Postdoctoral Research Fellowship, IHBI, QUT, Brisbane, Australien	

Veröffentlichungen

- Lössner, D., H. Kessler, G. Thumshirn, C. Dahmen, B. Wiltschi, M. Tanaka, W. Knoll, E. K. Sinner, and U. Reuning. 2006. Binding of small mono- and oligomeric integrin ligands to membrane-embedded integrins monitored by surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy. *Anal Chem* 78: 4524-33.
- Lenski, C., R. F. Kooy, E. Reyniers, D. Lössner, R. J. Wanders, B. Winnepenninckx, H. Hellebrand, S. Engert, C. E. Schwartz, A. Meindl, and J. Ramser. 2007. The reduced expression of the HADH2 protein causes X-linked mental retardation, choreoathetosis, and abnormal behavior. *Am J Hum Genet* 80: 372-7.
- Lössner, D., C. Abou-Ajram, A. Benge, and U. Reuning. 2007a. Integrin alphavbeta3/vitronectin-interaction of human ovarian cancer cells upregulates epidermal growth factor receptor expression and activity. In submission.
- Lössner, D., C. Abou-Ajram, A. Benge, and U. Reuning. 2007b. Integrin alphavbeta3/vitronectin-interaction effects expression of integrin-linked kinase in human ovarian cancer cells. In preparation.