

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

Untersuchungen an murinen Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup>  
Fibroblasten zur Rolle von Pinch-1 für die zelluläre  
Strahlenreaktion

Veit Sandfort

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

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

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

Die Dissertation wurde am 05.06.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.09.2007 angenommen.

meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>12</b>
2.1	Pinch-1 . . . . .	12
2.1.1	Struktur und Funktion . . . . .	12
2.1.2	Fokale Adhäsionen . . . . .	15
2.2	Extrazelluläre Matrix . . . . .	25
2.3	Integrine . . . . .	28
2.3.1	Struktur . . . . .	30
2.3.2	Signalübertragung . . . . .	32
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>35</b>
3.1	Zelllinien . . . . .	35
3.2	Geräte und Hilfsmittel . . . . .	36
3.2.1	Zellkultur . . . . .	36
3.2.2	Bestrahlung . . . . .	37
3.2.3	Koloniebildungsassay . . . . .	37
3.2.4	Western-Blot . . . . .	37
3.2.5	Immunfluoreszenz . . . . .	38
3.3	Reagenzien . . . . .	38
3.3.1	Reagenzien für Zellkultur . . . . .	38
3.3.2	Reagenzien für Western Blot . . . . .	38
3.3.3	Reagenzien für Koloniebildungsassay . . . . .	43
3.3.4	Reagenzien für Immunfluoreszenz . . . . .	43
3.3.5	Reagenzien für $\gamma$ -H2AX-Färbung . . . . .	44
3.4	Substrate . . . . .	44
3.5	Antikörper . . . . .	45
3.5.1	Primärantikörper . . . . .	45

3.5.2	Sekundärantikörper . . . . .	46
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>47</b>
4.1	Zellkultur . . . . .	47
4.1.1	Subkultivierung . . . . .	47
4.1.2	Einfrieren . . . . .	47
4.1.3	Auftauen . . . . .	47
4.1.4	Suspension . . . . .	47
4.2	Bestrahlung . . . . .	48
4.3	Koloniebildungsassay . . . . .	48
4.3.1	Ansatz . . . . .	48
4.3.2	Fixierung . . . . .	50
4.3.3	Auswertung . . . . .	50
4.4	Proliferationsbestimmung mittels Zellzählung . . . . .	50
4.4.1	Ansatz . . . . .	50
4.4.2	Zählung . . . . .	51
4.4.3	Auswertung . . . . .	51
4.5	SDS-Elektrophorese und Western Blot . . . . .	51
4.5.1	Versuchsabläufe . . . . .	51
4.5.2	Herstellung der Gesamtzellysate . . . . .	52
4.5.3	Proteinbestimmung . . . . .	52
4.5.4	Western Blotting . . . . .	53
4.5.5	Detektion . . . . .	53
4.5.6	Auswertung . . . . .	54
4.6	Dotblot . . . . .	54
4.7	Immunfluoreszenz . . . . .	55
4.7.1	Ansatz . . . . .	55
4.7.2	$\gamma$ H2AX-Färbung . . . . .	56
4.8	Bestimmung der Apoptose . . . . .	57
4.8.1	Fixierung . . . . .	57
4.8.2	Präparation . . . . .	57
4.9	Statistik . . . . .	57
4.9.1	Lineare Korrelation . . . . .	57

<b>5 Ergebnisse</b>	<b>59</b>
5.1 Koloniebildungsassay . . . . .	59
5.1.1 Pinch-1 Zelllinie, Bestrahlung 0-6 Gy in Adhäsion . . . . .	59
5.1.2 Pinch-1 Zelllinie, Bestrahlung 0-6 Gy in Suspension . . . . .	61
5.1.3 Pinch-1 Zelllinie, Behandlung mit Cisplatin . . . . .	62
5.1.4 Pinch-1 Zelllinie, Behandlung mit Mitomycin-C . . . . .	63
5.1.5 Pinch-1 Zelllinie, Bestrahlung 0-6 Gy in Suspension, Zeitwerte . . .	64
5.1.6 Pinch-1 Zelllinie, Bestrahlung 0-6 Gy in Suspension und Serumentzug	64
5.1.7 Pinch-1 <sup>rekon</sup> Zelllinien, Bestrahlung 0-6 Gy in Adhäsion . . . . .	65
5.1.8 ILK Zelllinien, Bestrahlung 0-6 Gy in Adhäsion . . . . .	69
5.1.9 ILK Zelllinien, Behandlung mit Cisplatin . . . . .	69
5.2 Proliferationsbestimmung mittels Zellzählung . . . . .	70
5.3 Western-Blot . . . . .	71
5.3.1 Dotblot zur Fibronektinbeschichtung . . . . .	71
5.3.2 Proteinexpression in verschiedenen Zelllinien . . . . .	72
5.3.3 Pinch-1 Zelllinie, Proteinexpression zum Zeitpunkt der Bestrahlung	75
5.3.4 Pinch-1 Expression in den Pinch-1 rekonstituierten Pinch-1 <sup>rekon</sup> Zellen	77
5.4 Bestimmung der Zahl $\gamma$ H2AX- und p53BP-positiver nukleärer Foci . . . .	78
5.5 Apoptose . . . . .	80
5.6 Immunfluoreszenz . . . . .	80
5.6.1 Subzelluläre Lokalisation von Pinch-1 in Pinch-1 <sup>fl/fl</sup> Zellen . . . . .	80
5.6.2 Subzelluläre Lokalisation von Pinch-1 in Pinch-1 <sup>rekon</sup> Zellen . . . . .	80
5.6.3 Adhäsionsassay bei Pinch-1 <sup>fl/fl</sup> und Pinch-1 <sup>-/-</sup> Zellen . . . . .	81
<b>6 Diskussion</b>	<b>84</b>
<b>7 Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>116</b>
<b>Danksagung</b>	<b>117</b>

## Abkürzungen

<i>4E-BP1</i>	humaner eukaryotischer translations initiations Faktor 4E bindendes Protein 1
<i>AKT</i>	<i>engl.</i> v-akt (AKR transforming) murine thymoma viral oncogene
<i>ALL</i>	Akute lymphatische Leukämie
<i>AML</i>	Akute myeloische Leukämie
<i>ANOVA</i>	<i>engl.</i> analysis of variance
<i>APS</i>	Ammonium Persulfat
<i>ASAP1</i>	Arf GTPase aktivierendes Protein
<i>ATM</i>	<i>engl.</i> Ataxia telangiectasia mutated
<i>BCA</i>	Bicinchoninsäure Assay
<i>BSA</i>	bovines Serumalbumin
<i>CAM-RR</i>	<i>engl.</i> cell adhesion mediated radioresistance
<i>Cas</i>	Crk assoziiertes Substrat
<i>CDK</i>	<i>engl.</i> cyclin dependent kinase
<i>cDNA</i>	<i>engl.</i> complementary DNA
<i>CH</i>	Calponin-Homologie
<i>CH-ILKBP</i>	Calponin-Homologie ILK bindendes Protein
<i>Cre</i>	<i>engl.</i> cyclization recombination
<i>Cys</i>	Cystein
<i>DMEM</i>	<i>engl.</i> Dulbecco's modified Eagle medium
<i>DMSZ</i>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen
<i>DOCK180</i>	dedicator of cytokinesis, 180 kDa protein downstream of CRK
<i>DRAL</i>	downregulated in rhabdomyosarcoma Lim protein
<i>DSB</i>	Doppelstrangbruch
<i>EDTA</i>	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EGFR</i>	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
<i>eIF4E</i>	eukaryotischer Translations Initiations Faktor 4E

## Inhaltsverzeichnis

---

<i>ELISA</i>	<i>engl.</i> enzyme linked immunosorbent assay
<i>EZM</i>	extrazelluläre Matrix
<i>FA</i>	fokale Adhäsionen
<i>FAB</i>	französisch-amerikanisch-britisch (AML Klassifikation)
<i>FAK</i>	fokale Adhäsionskinase
<i>FAT</i>	<i>engl.</i> focal adhesion targeting
<i>FERM</i>	Protein 4.1 Ezrin Radixin Moesin
<i>FITC</i>	Fluoreszeinisothiocyanat
<i>FKS</i>	fetales Kälber Serum
<i>FN</i>	Fibronektin
<i>GDP</i>	Guanosin-5-diphosphat
<i>Grb</i>	<i>engl.</i> growth factor receptor-bound protein
<i>GSK</i>	Glykogen Synthase Kinase
<i>GTP</i>	Guanosin-5'-triphosphat
<i>Gy</i>	Gray
<i>HIF</i>	Hypoxie induzierbarer Faktor
<i>His</i>	Histidin
<i>HRP</i>	<i>engl.</i> horseradish peroxidase
<i>IAP</i>	Inhibitor der Apoptose
<i>ICAM</i>	<i>engl.</i> intercellular cell adhesion molecule
<i>IF</i>	Immunfluoreszenz
<i>ILK</i>	<i>engl.</i> integrin linked kinase
<i>ILKAP</i>	ILK assoziierte Phosphatase
<i>IPP</i>	ILK-Pinch-Parvin
<i>IR</i>	<i>engl.</i> Irradiation
<i>IRS</i>	Insulin Rezeptor Substrat
<i>JNK</i>	Jun N-terminale Kinase
<i>LAD</i>	Leukozyten Adhäsions Defekt
<i>Lar</i>	<i>engl.</i> leukocyte common related antigen
<i>Lef</i>	<i>engl.</i> lymphoid enhancer-binding factor
<i>LIM</i>	Lin-1, Isl-1, Mec-3
<i>LoxP</i>	<i>engl.</i> Locus of Crossover in P1
<i>MAPK</i>	Mitogen aktivierte Proteinkinase
<i>MBq</i>	Megabecquerel

## Inhaltsverzeichnis

---

<i>MEF</i>	murine embryonale Fibroblasten
<i>MEM</i>	Minimum essentielles Medium
<i>MMP</i>	Matrix Metalloproteinase
<i>mTor</i>	<i>engl.</i> mammalian target of rapamycin
<i>MW</i>	Molekulargewicht
<i>NEA</i>	nichtessentielle Aminosäuren
<i>NES</i>	nukleares Exportsignal
<i>NHEJ</i>	<i>engl.</i> Non-homologous end joining
<i>NLS</i>	nukleares Lokalisationssignal
<i>NMR</i>	<i>engl.</i> nuclear magnetic resonance
<i>NOS</i>	<i>engl.</i> reactive nitrogen species
<i>p53BP</i>	p53 bindendes Protein
<i>PAGE</i>	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
<i>PAK</i>	p21-aktivierte Kinase
<i>PBS</i>	<i>engl.</i> phosphate buffered saline
<i>PDB</i>	Protein Datenbank (Brookhaven)
<i>PDGF</i>	<i>engl.</i> platlet derived growth factor receptor
<i>PFA</i>	Paraformaldehyd
<i>PH</i>	Pleckstrin-Homologie
<i>PI3K</i>	Phosphoinositid 3-Kinase
<i>Pinch</i>	<i>engl.</i> particularily interesting new cys-his protein
<i>PIP<sub>2</sub></i>	Phosphotidylinositol 4,5-Bisphosphat
<i>PIP<sub>3</sub></i>	Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat
<i>PIX</i>	PAK interaktiver Austausch-Faktor
<i>PKB</i>	Proteinkinase B
<i>PLC</i>	Phospholipase C
<i>PML</i>	Progressive multifokale Leukoenzephalopathie
<i>PTEN</i>	<i>engl.</i> phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
<i>RNA</i>	<i>engl.</i> ribonucleic acid
<i>ROS</i>	<i>engl.</i> reactive oxygen species
<i>rpm</i>	Rotationen pro Minute
<i>RPMI</i>	Roswell Park Memorial Institute
<i>RSU</i>	Ras Supressor Protein

<i>SAPK</i>	stressaktivierte Proteinkinase
<i>SFK</i>	Src family kinases
<i>SH2</i>	Src Homologie 2
<i>SH3</i>	Src Homologie 3
<i>Shc</i>	<i>engl.</i> Src homology collagen-like protein
<i>Src</i>	<i>engl.</i> sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog
<i>siRNA</i>	<i>engl.</i> small interfering RNA
<i>STEMI</i>	<i>engl.</i> ST-elevation myocardial infarction
<i>TESK1</i>	testiculäre Proteinkinase 1
<i>TRITC</i>	Tetramethyl Rhodamin iso-Thiocyanat
<i>Tyr</i>	Tyrosin
<i>uPAR</i>	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor
<i>VASP</i>	Vasodilator stimuliertes Phosphoprotein
<i>VCAM</i>	<i>engl.</i> vascular cell adhesion molecule
<i>VEGFR</i>	<i>engl.</i> vascular endothelial growth factor receptor

# 1 Einleitung

Das Hauptziel der Strahlentherapie ist die kurative Behandlung von malignen Tumoren. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen alle klonogenen Zellen eines Tumors zerstört werden. Ein entscheidender Faktor ist dabei die Strahlensensibilität des Tumors bzw. des umgebenden Normalgewebes, dessen Reaktion oft dosislimitierend ist.

Die Wirksamkeit der Strahlentherapie konnte durch Fraktionierung der Bestrahlung und Kombination mit Zytostatikagabe [17,28] verbessert werden. Ein neuer erfolgversprechender Ansatz ist die gezielte Beeinflussung von bestimmten Schlüsselproteinen, die für die Strahlensensibilität der Zelle eine Rolle spielen. Ein Beispiel hierfür ist die Inhibition von rezeptorgebundenen Tyrosinkinase wie dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR [101,133] oder die Anwendung von Angiogeneseinhibitoren, die den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptor VEGFR hemmen.

Die Integrine sind eine weitere Gruppe von Proteinen, die über die Regulation grundlegender Zellfunktionen wie Zellüberleben und Proliferation [89] eine Rolle beim Tumorstadium *in vivo* spielen [128]. Integrine sind membrangebundene Rezeptoren, die Interaktionen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix vermitteln. Diese Interaktionen finden an den fokalen Adhäsionen statt, in denen die EZM, Zellmembran, Integrine, Wachstumsfaktorrezeptoren, das Zytoskelett und eine Vielzahl von Signalmolekülen in Kontakt treten und in kooperativer Weise Zellfunktionen regulieren [139,149]. Die fokalen Adhäsionen spielen eine wichtige Rolle bei der Chemo- und Strahlenresistenz von Tumorzellen. Solche erworbenen oder bereits vor Therapie bestehenden Resistenzen besitzen klinische Relevanz für die Effektivität von Tumortherapien [3,30,55,56,85].

Pinch-1 ist ein in vielen Geweben exprimiertes, ebenfalls in den fokalen Adhäsionen lokalisiertes Protein, das fünf LIM Domänen enthält, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Bekannt sind Interaktionen von Pinch-1 über die LIM1 Domäne mit Integrin gebundener Kinase (ILK) [169], über die LIM4 Domäne mit dem Adapterprotein Nck2 [167] und über die LIM5 Domäne mit dem Ras Suppressor 1 (RSU1) [13,94]. Diese Bindungspartner weisen auf eine Bedeutung von Pinch-1 sowohl in Integrin- als auch in Wachstumsfaktorsignalwegen hin.

Zellbiologische und genetische Untersuchungen an *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila*

*melanogaster* haben eine direkte Beteiligung von Pinch-1 an verschiedenen Prozessen wie Zellüberleben, Zytoskelettorganisation und Signalübertragung nachgewiesen [27, 53, 62, 84, 107, 108, 153, 166, 189]. Diese Daten lassen Pinch-1 als vielversprechendes therapeutisches Zielprotein bei malignen Erkrankungen erscheinen [77, 104].

Zusammenfassend weisen diese Arbeiten auf eine zentrale Funktion der fokalen Adhäsionen und insbesondere von Pinch-1 und ILK bei der Regulation des Zellüberlebens hin und zeigen, daß es erforderlich ist, die zugrunde liegenden Mechanismen genauer zu verstehen. Aus diesem Grund wurde in dieser experimentellen Arbeit die Rolle von Pinch-1 für das Zellüberleben nach genotoxischem Stress in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) untersucht.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Pinch-1

#### 2.1.1 Struktur und Funktion

**Identifikation** Pinch-1 wurde erstmals 1994 von Ann Rearden identifiziert und sequenziert [138, S. 1124ff]. Rearden war auf der Suche nach dem «senescence antigen», einem Antigen, das z. B. gealterte Erythrozyten tragen und gegen die der Mensch Autoantikörper besitzt. Rearden hat diese Autoantikörper von Erythrozyten gewaschen und nach einem entsprechenden Antigen gesucht.

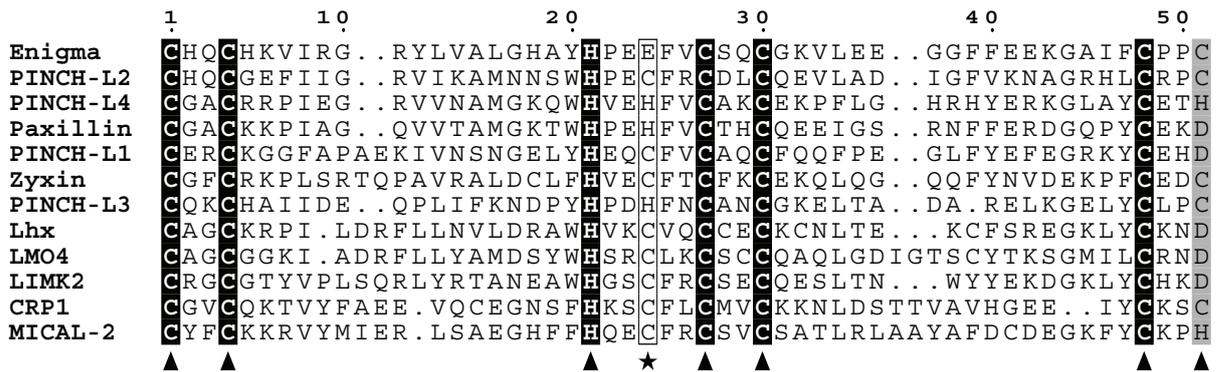
Bei den Experimenten wurden E. coli Bakterien mit einer cDNA-Bibliothek in  $\lambda$ -Phagen transformiert und so zur Expression einer Vielzahl von menschlichen Proteinen gebracht. Die unterschiedlichen E. coli Klone wurden mit den Autoantikörpern überprüft. Dabei wurde ein Klon gefunden, der ein 35,8 kDa schweres Protein exprimiert, das aufgrund seiner Aminosäuresequenz den Namen Pinch von «particularly interesting new cys-his protein» erhielt [138, S. 1125]. Nach der Beschreibung des zu Pinch weitgehend homologen Proteins Pinch-2 durch Braun et al. im Jahr 2003 wurde Pinch zu Pinch-1 umbenannt [16].

#### **Struktur** .

Pinch-1 besteht aus 325 Aminosäuren, die fünf LIM-Domänen bilden. Neben diesen Protein-Protein-Interaktionen vermittelnden Domänen besitzt Pinch-1 keine weiteren funktionellen Domänen. Es handelt sich somit um ein sogenanntes «LIM-only» Protein. Unter den bisher bekannten LIM-Domänen-Proteinen ist es dasjenige mit den meisten LIM-Domänen. LIM-Domänen bestehen aus ca. 55 Aminosäuren, bei denen 8 Cystein- und Histidinreste hochgradig konserviert sind. Als Konsensussequenz kann



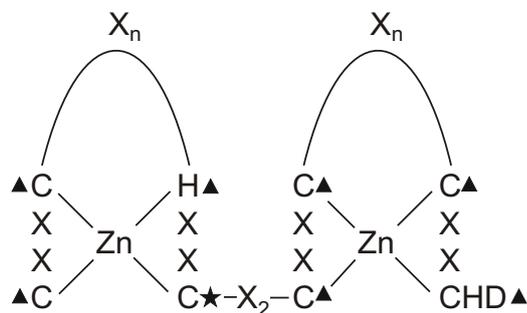
angesehen werden, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht [93, 146, S. 920]. Ein Vergleich von Pinch-1 LIM1 und verschiedenen anderen LIM-Domänen bestätigt dieses Muster (siehe Abbildung 2.1).



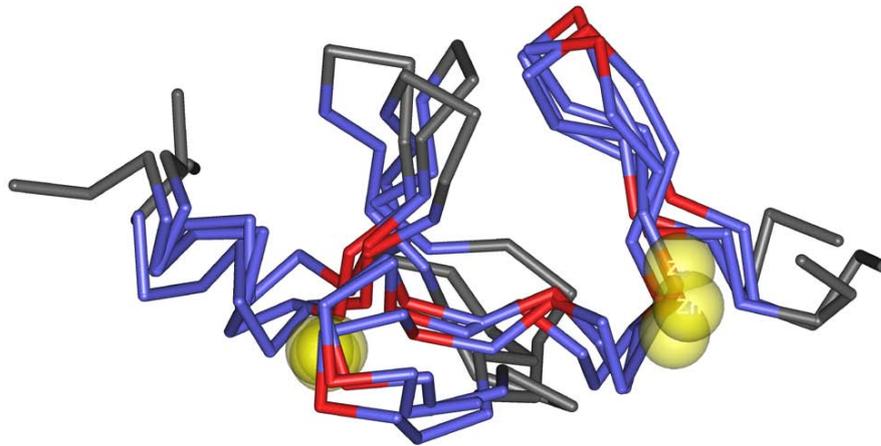
**Abbildung 2.1:** Sequenzvergleich der LIM-Domänen verschiedener Proteine. Die konservierten Aminosäuren sind schwarz markiert, die laut Konsensussequenz vorgegebenen Aminosäuren sind mit Dreiecken bezeichnet. Zu erkennen ist eine gute Übereinstimmung der Sequenzen mit der Konsensussequenz, lediglich an dem mit ★ markierten Ort sind Abweichungen zu sehen. Insgesamt liegt eine geringe Homologie der Sequenzen untereinander vor. Software: MULTALIGN [38]

Da LIM-Domänen für die Protein-Protein-Interaktion kein einheitliches Bindungsmotiv aufweisen, ist es schwierig, die betreffenden Bindungspartner zu identifizieren. Für LIM1 [169], LIM4 [167] und LIM5 [13,94] ist dies im Gegensatz zu LIM2, LIM3 bereits gelungen. Es liegen Interaktionen mit ILK (über LIM1), einem Protein der fokalen Adhäsionen und Nck-2 (über LIM4), einem Protein, das an Signalwegen der Wachstumsfaktorrezeptoren beteiligt ist, vor. LIM5 interagiert mit RSU1 (Ras Supressor 1) in *Drosophila melanogaster* während Thymosin-β4 in Mauszellen an LIM4 und LIM5 binden kann.

Eine LIM-Domäne besitzt zwei Zinkfinger, die an ihrer Basis über Cystein und Histidin ein Zink-Ion binden (vergleiche Abbildung 2.2). Es besteht eine – angesichts der großen



**Abbildung 2.2:** Schema einer LIM-Domäne. Die konservierten Aminosäuren (mit ★ und ▲ bezeichnet (siehe Abbildung 2.1) – meist Cystein oder Histidin – binden das Zink-Ion an der Basis der Zinkfinger



**Abbildung 2.3:** Die Domänen Pinch-1 LIM1, LIM4 und zum Vergleich CRP1-LIM1 (*Gallus gallus*) sind übereinander gelegt. Blau: ähnlich lokalisierte aber nicht identische Aminosäuren, Rot: in allen drei Strukturen übereinstimmende Aminosäuren, Gelb: Zink-Ion. Der hohe Grad an struktureller Ähnlichkeit bei relativ geringer Sequenzähnlichkeit ist zu erkennen. Software: CN3D, National Center for Biotechnology Information (NCBI), Strukturen: Pinch-1 LIM1: 1G47A LIM4: 1NYPA, CRP1 LIM1: 1B8TA (NCBI Entrez Protein Database),

Unterschiede in den Sequenzen – erstaunliche strukturelle Ähnlichkeit verschiedener LIM-Domänen, zumindest auf der Ebene des Aminosäurerückrats (siehe Abbildung 2.3).

Es ist bekannt, dass Zinkfinger neben Protein-Protein-Interaktionen auch DNA binden können [129], wobei unklar ist, ob dies für Pinch-1 ebenfalls gilt. Sowohl Pinch-1 als auch Pinch-2 enthalten carboxyterminal Sequenzen, die vermutlich Signale für den Import und Export in bzw. aus dem Zellkern darstellen (NLS-Nuclear Localization Signal und NES Nuclear Export Signal) [67]. Während in humanen WI-38 Lungenzellen Pinch-2 [186] und in Schwann-Zellen Pinch-1 [22] im Zellkern beobachtet wurde, konnte in NIH 3T3 keines der Proteine dort lokalisiert werden [16].

**Funktion** Einen Hinweis auf die Funktion von Pinch-1 geben Experimente mit Pinch-1 defizienten Genotypen von *Drosophila melanogaster*. Hier zeigt sich im Vergleich zum Wildtyp eine hohe Letalität der Larven. Die überlebenden Larven sind signifikant kleiner als beim Wildtyp und praktisch vollständig immobil. Immunfluoreszenzmikroskopisch konnte eine Störung der Muskelzellen gezeigt werden, wobei insbesondere das Aktinzytoskelett in den Pinch-1 defizienten Zellen betroffen war. Zudem zeigt sich eine Kolokalisation von Pinch-1 und ILK beim Wildtyp [27, S.2614]. Diese Ergebnisse deuten

darauf hin, dass Pinch-1 ein Modulator der Integrinfunktion ist und eine Bedeutung bei der Organisation des Zytoskeletts hat.

Bei Mäusen führt ein Ausschalten des Pinch-1 kodierenden Gens *lims1*, zum Absterben des Embryos kurz nach der Implantation, ähnlich wie bei ILK und  $\beta_1$ -Integrin defizienten Tieren. Es zeigen sich auch verminderte Zell-Zell-Kontakte, eine Ablösung endodermaler Zellen von der Basalmembran und vermehrte Apoptose. Die Expression von ILK ist vermindert, eine kompensatorische Hochregulation von Pinch-2 findet nicht statt [107].

Interessanterweise zeigen Pinch-2<sup>-/-</sup> Mäuse keinen offensichtlichen pathologischen Phänotyp. Es war jedoch in bestimmten Geweben (Niere, Harnblase) eine – möglicherweise kompensatorisch – erhöhte Pinch-1 Expression nachweisbar. In vitro konnte gezeigt werden, dass sowohl Pinch-1 als auch Pinch-2 in der Lage sind, bei Pinch-1/2<sup>-/-</sup> Fibroblasten den Defekt der Zellausbreitung und Adhäsion zu kompensieren, was auf ein teilweises Überlappen der Funktionen beider Proteine hinweist [153].

Anhand von Zellkulturexperimenten, in denen Pinch-1 durch Überexpression einer nicht funktionsfähigen Pinch-1 Variante gehemmt wurde, konnte gezeigt werden, dass Pinch-1 Proliferation und Migration in Mauszellen moduliert [70, 189].

Mittels RNA Interferenz konnte die Bedeutung von Pinch-1 für Adhäsion und Migration in humanen Zellen bestätigt werden. Es zeigte sich auch ein Einfluss von Pinch-1 auf Zellüberleben und AKT Phosphorylierung [62].

### 2.1.2 Fokale Adhäsionen

Bei Adhäsion von Zellen an einem Substrat bilden sich fokale Adhäsionen (FA), die eine Verbindung zwischen dem Substrat und dem Zytoskelett der Zelle herstellen. Fokale Adhäsionen sind ca. 10  $\mu\text{m}$  lange und 0,5  $\mu\text{m}$  breite Strukturen [2, 92]. Hier ist eine unüberschaubare Vielzahl an Proteinen lokalisiert. Die Verbindung zum Substrat wird über Oberflächenrezeptoren der Integrinfamilie hergestellt, während die Verbindung zwischen Integrinen und Zytoskelett über Aktin, Paxillin,  $\alpha$ -Parvin, Vinculin, Talin, Tensin, Filamin und andere vermittelt wird. Hier findet auch Signaltransduktion statt, was sich an der großen Zahl phosphorylierter Proteinen (z. B. Paxillin, Src, p130<sup>Cas</sup>) und Kinasen (ILK, FAK, Src, PI3K) zeigt. Außerdem sind verschiedene Wachstumsfaktorrezeptoren wie z. B. epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR) und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) involviert. Auch Pinch-1 und zahlreiche Adapterproteine (GRB2, Nck-2) sind hier lokalisiert.

Es handelt sich bei den fokalen Adhäsionen um komplexe, aus vielen Proteinen bestehende Strukturen, in denen strukturelle Beziehungen zwischen Zelle und Matrix sowie funktionell verschiedene intrazelluläre Signalprozesse integriert werden

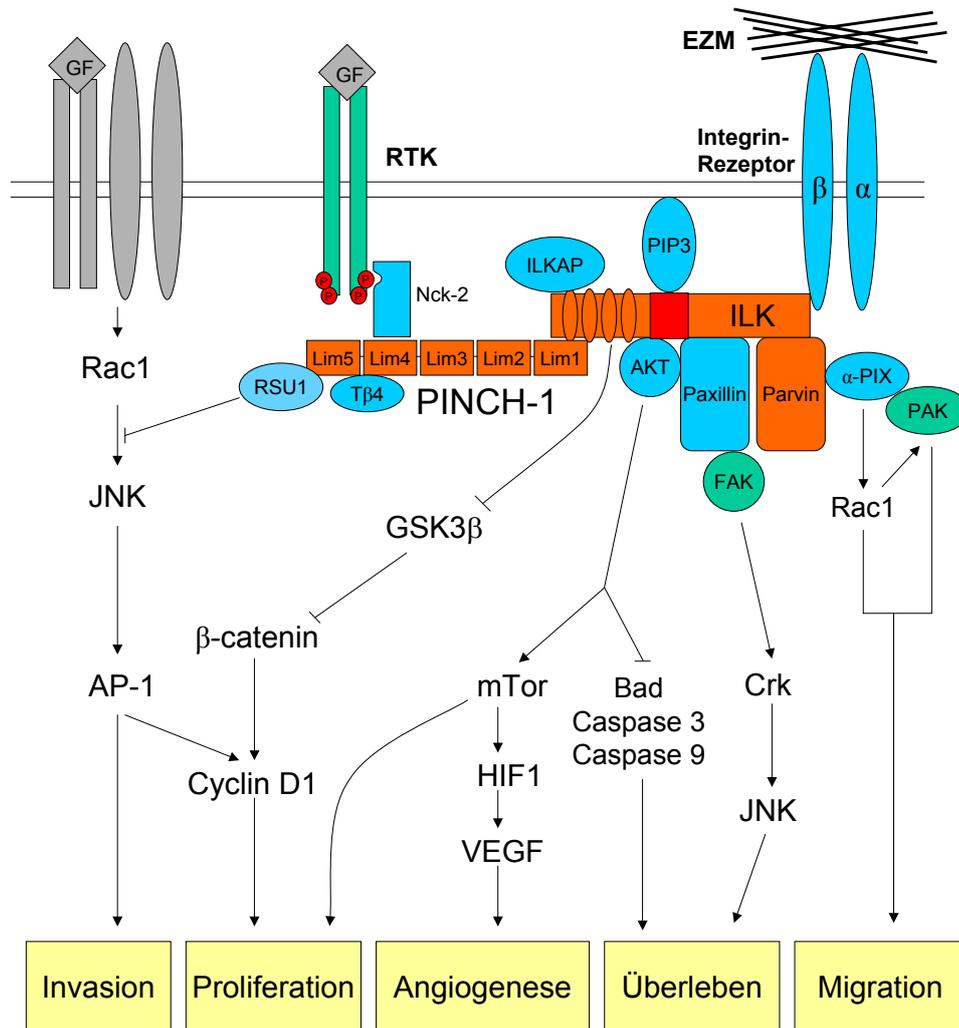
Nach Geiger et al. [64] lassen sich die Bestandteile der fokalen Adhäsionen vereinfachend — und teilweise überlappend — klassifizieren. Eine Gruppe von Proteinen stellt eine direkte mechanische Verbindung zwischen Integrinen und Zytoskelett her, erfüllt also eine strukturelle Funktion. Hierzu zählen Talin,  $\alpha$ -Aktinin, Tensin und Filamin.

Andere Proteine binden an Integrine, nicht aber an zytoskelettale Proteine. Beispiele sind Paxillin, FAK, ILK, DRAL (Downregulated in RhAbdomyosarcoma Lim Protein), 14-3-3 $\beta$  oder Caveolin. Viele dieser Proteine haben signalübertragende Funktion (ILK, FAK) oder interagieren mit weiteren Proteine. Eine dritte Gruppe stellen Proteine dar, die an Aktin binden aber keine Verbindung zu den Integrinen herstellen. Beispiele sind Vinculin, ERM und VASP. Insbesondere Vinculin kommt eine Rolle als universelles Verbindungsmolekül zu, da es neben Aktin viele andere Proteine wie z. B.  $\alpha$ -Aktinin, VASP, Talin und Phospholipide bindet.

Eine große Zahl der Proteine fungiert in diesem Netzwerk als Adapter. Diese Adapterproteine besitzen neben ihrer Fähigkeit Bindungen mit mehreren Partnern einzugehen häufig enzymatische Aktivität wie z. B. die Tyrosinkinase FAK, Src, die Serin/Threoninkinase PKC, ILK, p21-activated Kinase (PAK), die Tyrosinphosphatasen SHP und LAR, die G-Protein Modulatoren ASAP1 und DOCK180 und andere Proteine wie Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und die Protease Calpain.

### **Der ILK-Parvin-Pinch-Komplex (IPP-Komplex)**

Durch Untersuchungen an den fokalen Adhäsionen ergaben sich weitere Einblicke in die Funktion von Pinch-1. Hierbei zeigte sich, daß Pinch-1 in einem Komplex mit ILK und einem Protein der Parvin Familie vorkommt (IPP-Komplex) [180,187]. Dieser Komplex spielt eine wichtige Rolle bei der Organisation fokaler Adhäsionskomplexe und somit bei der integrinvermittelten Zelladhäsion. IPP-Komplexe binden interessanterweise sowohl an membranständige als auch an zytoplasmatische Bestandteile der fokalen Adhäsionskomplexe und sind somit an einer Schlüsselstelle dieser Komplexe lokalisiert. Zentraler Bestandteil eines IPP-Komplexes ist ILK. Diese Kinase bindet mit einer ihrer Ankyrinrepeats Pinch-1 über dessen LIM1 Domäne, während Parvine mit ILK an der Kinasedomäne interagieren. Parvine stellen eine Proteinfamilie dar, zu der neben  $\alpha$ -Parvin auch  $\beta$ -Parvin,  $\gamma$ -Parvin und CH-ILKBP (Calponin-Homologie ILK bindendes



**Abbildung 2.4:** Der ILK–Pinch–Parvin–Komplex (IPP-Komplex) ist bei unterschiedlichen Signalwegen von Bedeutung. Orange ist der IPP-Komplex dargestellt, blau die direkt assoziierten Proteine. Letztlich werden über JNK und GSK3β Proliferation, über mTOR Angiogenese, über AKT Überleben und über Rac das Aktinzytoskelett reguliert.

Protein) zählen. Sie binden an ILK über deren CH-Domäne, wobei diese Interaktion zumindest bei α-Parvin über Phosphorylierung durch MAPK moduliert werden kann [104]. Wahrscheinlich können so in einer Zelle verschiedene IPP-Komplexe bestehen, die in ihrer Zusammensetzung einerseits bei den verschiedenen Parvinen, andererseits bei den zwei Pinch Homologen differieren.

Der IPP-Komplex setzt sich nicht erst während des Adhäsionsprozesses zusammen, sondern bildet sich schon vorher im Zytoplasma. Fehlt ein Bestandteil, so entsteht

der Komplex nicht und die anderen Bindungspartner sind nur noch in reduzierter Menge nachweisbar. Möglicherweise findet ein Abbau der Proteine über Proteasomen statt [62]. Durch Expression der LIM1-Domäne von Pinch-1 oder der Expression der Ankyrin-Repeats von ILK lässt sich der Abbau verhindern [104].

Eine Übersicht über die Zellfunktionen, die der IPP-Komplex moduliert und die daran beteiligten Signalwege ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Im Folgenden soll auf die einzelnen Bindungspartner des IPP-Komplexes eingegangen werden.

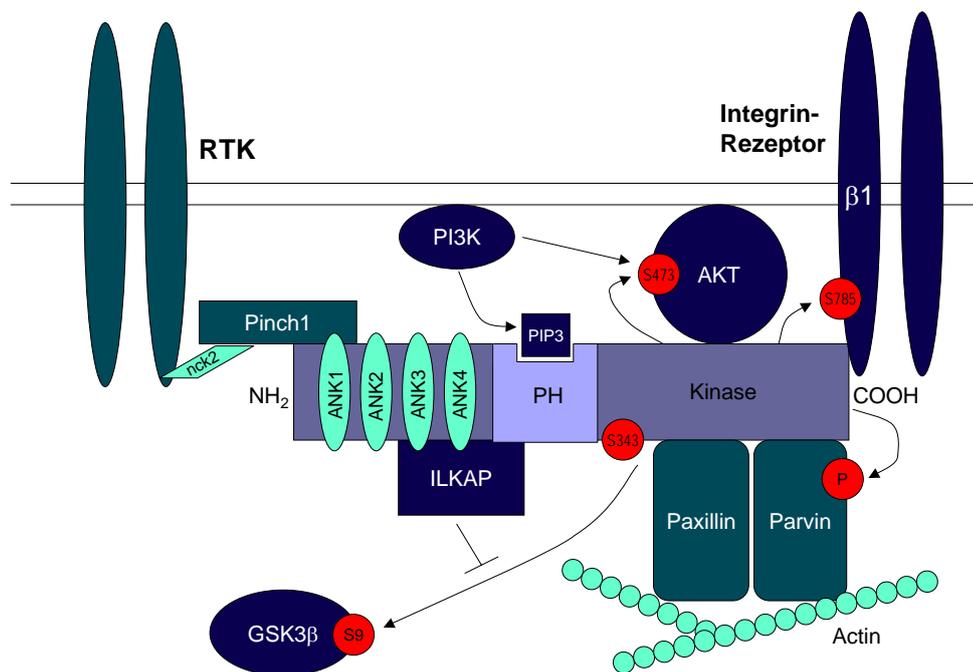
**Pinch-1** Pinch-1 interagiert mit weiteren Proteinen, so bindet es *in vitro* über seine LIM4 Domäne das Sh2/Sh3 Adapterprotein Nck-2. Nck-2 ist in Signalwegen der Wachstumsfaktorrezeptoren involviert und ist ebenso wie Nck-1 in der Lage, an den PDGF- $\beta$ -Rezeptor (Thrombozyten assoziierter Wachstumsfaktor Rezeptor  $\beta$ , platelet derived growth factor  $\beta$  receptor), den EGF-Rezeptor und an IRS-1, einem Effektor des Insulinrezeptors und des insulinartigen Wachstumsfaktorrezeptors (insulin like growth factor receptor, IGFR) zu binden [124, 161, 167], wobei die Assoziation mit EGFR und PDGF abhängig von deren Aktivierungszustand ist.

Ob diese Interaktionen *in vivo* von Bedeutung sind ist unklar. So sind Nck-1<sup>-/-</sup> und auch Nck-2<sup>-/-</sup> Mäuse ohne offensichtliche Defekte vital, obwohl der Nck-1/2<sup>-/-</sup> Genotyp bereits in der Embryonalperiode letal ist. Defekte von Migration und Zytoskelettorganisation bei murinen Nck-1<sup>-/-</sup> Nck-2<sup>-/-</sup> Fibroblasten lassen sich durch Wiederherstellen der Nck-1 Expression aufheben, obwohl Nck-1 nicht mit Pinch-1 interagiert.

Rsu-1 ist ein weiteres Protein, das mit Pinch-1 interagiert, wobei gezeigt werden konnte, dass es sowohl in humanen Zellen als auch in *Drosophila melanogaster* an die LIM5 Domäne bindet [94]. Die LIM5 Domäne zeigt eine nur 75 prozentige Homologie zwischen Pinch-1 und Pinch-2, weshalb die Interaktion von Rsu-1 und LIM5 spezifisch für Pinch-1 ist [53]. Rsu-1 kann die maligne Transformation von Zellen durch das v-Ras-Onkogen, nicht aber die durch v-Src und v-Raf hemmen und ist in der Lage adhäsionsunabhängiges Wachstum von Tumorzellen zu unterbinden. In einer humanen Glioblastomzelllinie in der keine Rsu-1 Expression nachweisbar war, führte die Wiederherstellung der Rsu-1 Expression durch Transfektion mit einem Rsu-1 exprimierenden Vektor zum Verlust des tumorigenen Potentials der Zellen in Mäusen [165]. Rsu-1 inhibiert die Stimulation von c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminaler Kinase (JNK, Stress aktivierte Protein Kinase SAPK) möglicherweise über eine GTPase vermittelten Hemmung des JNK Modulators Rac [114]. C-Jun bildet zusammen mit c-Fos den Transkriptionsfaktor AP-1 und beeinflusst hierdurch Prozesse

wie Zellüberleben, Migration, und Tumorgenese [43].

Thymosin-β4 interagiert mit Pinch-1 an LIM4 und LIM5. Ob dies auch für Pinch-2 zutrifft, ist nicht bekannt. Außerdem wurde eine schwächere, aber hiervon unabhängige Verbindung zur N-terminalen Ankyrin-Domäne von ILK nachgewiesen. In Kardiomyozyten moduliert Thymosin-β4 über noch unbekannte Mechanismen Überleben und Migration [13].



**Abbildung 2.5:** Übersicht ILK Struktur, Bindungspartner und potentielle Zielphosphorylierungen der Kinase. ILK beinhaltet 4 Ankyrin-Repeats (ANK 1-4), eine Pleckstrin-Homologie (PH) und die Kinase-Domäne. Die Ankyrin-Sequenz ist wichtig für die Verbindung über Pinch-1 zum EGF-Rezeptor sowie für die Interaktion mit ILKAP, welche die Aktivität von ILK reduzieren kann. Die PH-Domäne ermöglicht die Bindung von PIP<sub>3</sub> und könnte so für einen PI3K-abhängige Regulation von ILK sprechen. Die Kinaseeinheit phosphoryliert *in vitro* sich selbst, AKT, β-Parvin, β<sub>1</sub>-Integrin und GSK3β (rot). Inwieweit diese Interaktionen *in vivo* relevant sind ist bis jetzt noch nicht ausreichend geklärt.

**ILK (Integrin linked kinase)** Die Serin/Threonin-Kinase ILK besteht aus 452 Aminosäuren und besitzt am aminoterminalen Ende vier Ankyrin-Repeats, eine zentrale Pleckstrin-Homologie Domäne und carboxyterminal eine katalytische Kinase Domäne.

Mit der Ankyrin-Domäne von ILK besteht neben der Verbindung zu Pinch-1 auch Kontakt zu einer Serin/Threonin Phosphatase (ILK assoziierte Phosphatase, ILKAP). Über

den Wirkmechanismus und Zielproteine von ILKAP ist wenig bekannt, doch scheint ILKAP als Inhibitor von EZM-stimulierter ILK-Signalwirkung zu fungieren [102, 105].

Die Sequenzanalyse von ILK zeigt außerdem eine strukturelle Basis für eine Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) abhängige Regulation auf. So existiert eine Domäne die Ähnlichkeit zu einer Pleckstrin-Homologie besitzt [67]. Außerdem zeigen Zellen mit konstitutiv aktiver PI3K eine verstärkte katalytische Aktivität von ILK, während PI3K-Inhibitoren diese abschwächen [47]. Verallgemeinernd ist jedoch zu bemerken, daß eine Reihe an Untersuchungen darauf hinweist, dass die Akkumulation von  $PIP_3$  an der Zellmembran zur lokalen Rekrutierung miteinander interagierender Proteine führt und dadurch verschiedene Signalkaskaden in Gang gesetzt werden [163].

Antagonistisch zu PI3K agiert «Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten» (PTEN), eine 3'Inositol-Lipidphosphatase, die  $PIP_3$  zu  $PIP_2$  dephosphorylieren kann. Mutationen von PTEN lassen sich in Tumoren von Prostata, Mamma und Gehirn finden. In  $PTEN^{-/-}$  Glioblastomzellen ist eine vermehrte ILK-Aktivität nachweisbar, welche durch Transfektion mit PTEN antagonisiert werden kann [126].

Die carboxyterminal gelegene Kinaseeinheit beinhaltet neben der Bindungsregion für  $\beta_1$ - und  $\beta_3$ -Integrine, Paxillin, Proteinkinase  $B_\alpha$ /AKT (AKT),  $\alpha$ - und  $\beta$ -Parvin [77] den Serinrest 343 als mögliche Autophosphorylierungsstelle.

Trotzdem ILK *in vitro* sich selbst und zahlreiche Proteine phosphorylieren kann, wurde ihre katalytische Funktion von einigen Autoren angezweifelt [112]. Ein Grund hierfür ist die Tatsache, dass bestimmte für Serin/Threonin-Kinasen als essentiell erachtete Aminosäuresequenzen in ILK verändert sind. Insgesamt überwiegen allerdings die Hinweise darauf, dass ILK nicht nur als Adapterprotein fungiert, sondern ihre katalytische Aktivität entscheidende Relevanz für die Signalwirkung besitzt [48].

Auch Glykogen-Synthase-Kinase-3- $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) wird von rekombinanter ILK phosphoryliert, wobei die Phosphorylierung an Serin 9 die katalytische Aktivität der Kinase inhibiert. Hierdurch kommt es zur Reduktion von E-Cadherin und mittels Aktivierung von  $\beta$ -Catenin und den Transkriptionsfaktoren Lef1/Tcf [11] zu erhöhter Expression von Zellzyklus-Regulatoren wie den Cyclinen [125, 162]. Diese sind in der Lage «cyclin dependent kinases» (cyklinabhängige Kinase, CDK) zu binden und beeinflussen so DNA-Synthese und Proliferation [60]. Die verminderte Synthese von E-Cadherin kann zum einen direkt durch den  $\beta$ -Catenin-Lef/Tcf-Komplex ausgelöst werden [125], zum anderen induziert ILK möglicherweise die Transkription des E-Cadherin-Repressors snail [9, 160]. E-Cadherin wird als Vermittler von Zell-Zell-Interaktionen unter anderem

auch deswegen eine wichtige Rolle bei der Transformation und Invasion zugeschrieben [120], da eine Mutation in diesem Gen ein Risiko von 70 – 80 % beinhaltet, an einem diffusen Magenkarzinom zu erkranken [69].

Als weiteres mögliches Zielprotein von ILK wird AKT diskutiert. Kopräzipitationsversuche haben gezeigt, dass in intakten Zellen beide Proteine einen Komplex bilden, wobei es zu einer Phosphorylierung von AKT kommt [130]. AKT ist ebenfalls wie ILK eine Serin/Threonin-Kinase, die sich über Bad [42] und Caspase-9 [23] auf Apoptose, Überleben und Proliferation auswirkt.

AKT aktiviert die Kinase mTor (mammalian Target of Rapamycin), die einerseits durch Aktivierung des Transkriptionsfaktor eIF4E (eukaryotischer Translations Initiations Faktor 4E)<sup>1</sup>, andererseits über die Stimulation der Transkription ribosomaler RNA die Proliferation moduliert. Außerdem kann mTor den Transkriptionsfaktor Hypoxie induzierbaren Faktor 1 (hypoxia inducible factor 1, HIF1) induzieren, der wiederum die Expression von VEGF stimuliert und somit mit der Gefäßneubildung auch in Tumorgewebe in Zusammenhang steht [19].

Gegenüber genotoxischem Stress mittels ionisierender Strahlen scheint ILK einen sensibilisierenden Effekt zu besitzen. So zeigten sowohl mit ILK-DNA-Konstrukten transfizierte A549 Bronchialkarzinomzellen [29] als auch humane Leukämiezellen [83] ein reduziertes Überleben nach Bestrahlung, wobei eine Interaktion von ILK mit Caspase 8 und 9 nachgewiesen werden konnte. Duxbury et al. hingegen beobachteten bei ILK überexprimierenden Pankreaskarzinomzellen verminderte Apoptose nach Behandlung mit dem Nukleosidanalogen Gemcitabin [54]. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese widersprüchlichen Ergebnisse zu erklären.

**Parvine** Ebenfalls in der Kinase-Domäne von ILK befindet sich die Bindungsregion für die Familie der Parvine.  $\alpha$ -Parvin kann filamentöses Aktin (f-Aktin) sowohl direkt, als auch indirekt über Paxillin binden und stellt somit eine Verbindung zum Zytoskelett her [122].

Auch  $\beta$ -Parvin unterhält Verbindungen zum Zytoskelett. Einerseits kann es f-Aktin und  $\alpha$ -Aktinin binden, andererseits besteht eine Beziehung zu  $\alpha$ -PIX (PAK interaktiver Austausch-Faktor  $\alpha$ ), einem Protein, das die Rho-GTPasen Rac und CDC42 reguliert<sup>2</sup>. Diese GTPasen spielen eine Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts und bei der

---

<sup>1</sup>Dies erfolgt durch Phosphorylierung von 4E-BP1 (humanen Eukaryotischer Translations Initiations Faktor 4E bindendes Protein 1), das im unphosphorylierten Zustand eIF4E bindet und inaktiviert

<sup>2</sup> $\alpha$ -PIX ist ein «guanine nucleotide exchange factor», der bei GTPasen GDP durch GTP ersetzt

Zellmotilität, wobei Rac die Zellausbreitung und die Bildung von Zell-Zell-Kontakten begünstigt [24].  $\alpha$ -PIX beeinflusst diese Vorgänge auch über seine Bindungspartner Calpain-4 und PAK1, welches wiederum ein Effektorprotein von Rac/CDC42 ist [113]. Calpain-4 baut Talin ab und ist am Turnover der fokalen Adhäsionen beteiligt.

Über  $\gamma$ -Parvin und seine Bindungspartner ist bisher wenig bekannt. Es unterscheidet sich von den anderen Parvinen durch sein auf hämatopoetische Zellen beschränktes Expressionsmuster. Kürzlich konnte allerdings gezeigt werden, daß  $\gamma$ -Parvin in diesen Zellen keine essentielle Rolle spielt [25].

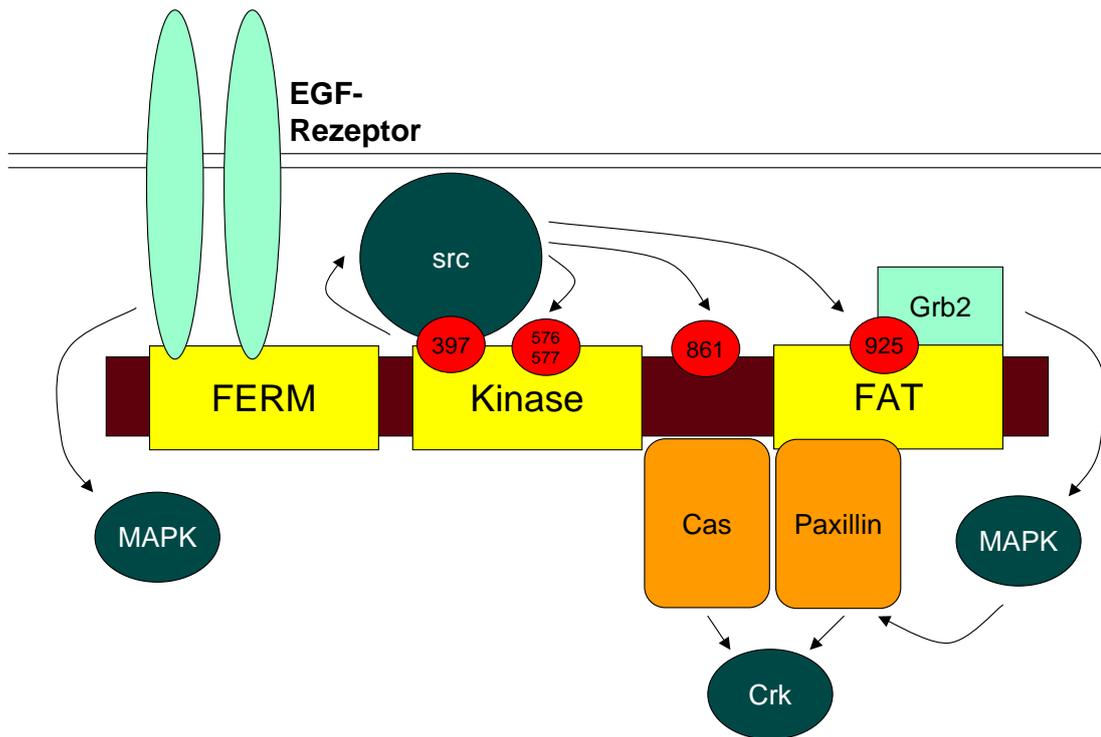
Die Parvine können die Signalwirkung von ILK modulieren. Während  $\alpha$ -Parvin verstärkend wirkt [7], besitzt  $\beta$ -Parvin eher einen hemmenden Einfluss. Interessanterweise bewirken sowohl die Störung der ILK- $\alpha$ -Parvin-Bindung als auch eine Überexpression von  $\beta$ -Parvin eine Zunahme der Apoptose [188].

**FAK, fokale Adhäsionskinase** Die fokale Adhäsionskinase (FAK) ist ein weiterer wichtiger Mediator von integrinvermittelten Signalen. Diese rezeptorungebundene Tyrosinkinase ist wichtig für Zellmotilität und Überleben. Sie beinhaltet eine zentrale Tyrosinkinase, N-terminal die FERM-Domäne und C-terminal die Prolin-reiche focal adhesion targeting (FAT) Sequenz.

Durch integrinvermittelte Adhäsion kommt es zur Phosphorylierung von sechs verschiedenen Tyrosin-Resten: 397, 407, 576, 577, 861 und 925. Phosphorylierung an Tyrosin 397, der Autophosphorylierungsstelle, schafft ein Motiv, welches von zahlreichen Proteinen mit SH2 Domänen, wie Kinasen der Src-Familie (Src family kinases, SFK), Phospholipase- $C\gamma$  (PLC $\gamma$ ), growth-factor-receptor-bound protein 7 (GRB7), dem Adapterprotein Nck2 und der p85 Untereinheit von PI3K, erkannt wird. Inwiefern diese verschiedenen Signalproteine aufgrund bestimmter Zellstimuli getrennt oder gleichzeitig binden, ist allerdings noch unklar. Während der Verlust der Adhäsion zu verminderter Phosphorylierung an Tyrosin 397 führt, bewirken ionisierende Strahlen eine Zunahme der Autophosphorylierung [12], was im Hinblick auf die Radiotherapie bei Tumorerkrankungen von Interesse ist.

Als wichtiger Bindungspartner von FAK fungiert Src, eine weitere bedeutende Tyrosinkinase der fokalen Adhäsionen. Beide Proteine bilden einen sich gegenseitig stimulierenden Komplex, wodurch es zu Konformationsänderung und Aktivierung von Src kommt, welches wiederum FAK an den verschiedenen Tyrosinresten phosphoryliert. Auf diese Weise könnten selbst initial schwache Signale amplifiziert werden [76].

Phosphorylierung an Tyrosin 576 und 577, welche sich innerhalb der Kinase-Domäne



**Abbildung 2.6:** Übersicht FAK Struktur und Bindungspartner: FAK beinhaltet eine FERM-Domäne, die Kinaseeinheit und die focal-adhesion-targeting (FAT) Sequenz. Durch Autophosphorylierung von Tyrosin 397 wird Src gebunden und aktiviert. Src phosphoryliert dann wiederum FAK an den verschiedenen Tyrosinresten (Pfeile). Phosphorylierung von FAK an Tyrosin 861 fördert die Interaktion mit p130<sup>Cas</sup>. Da sich die Bindungsstellen von Paxillin und Grb2 partiell überschneiden, können die Proteine nicht gleichzeitig mit FAK interagieren. Phosphorylierung von FAK an Tyrosin 925 erhöht die Affinität zu Grb2. Grb2 steht in Verbindung zum MAPK-Signalweg. MAPK phosphoryliert Paxillin, wodurch Paxillin verstärkt an FAK bindet und diese aktiviert.

von FAK befinden, sind für die maximale katalytische Aktivität notwendig. Dementsprechend zeigen Mutanten mit kombinierter Phenylalanin Substitution eine 2-3 fach reduzierte Kinaseaktivität verglichen mit Wildtyp-FAK [21]. Interessanterweise scheinen diese Phosphorylierungen auch einen positiven Effekt auf Migration und Zellausbreitung zu besitzen [127].

In der FAT-Domäne ist der Tyrosinrest 925 gelegen. Phosphorylierung dieses Aminosäurerestes stellt die Verbindung zum MAPK-Signalweg über den Komplex von Grb2/SOS und die GTPasen Ras und Raf her. Interessanterweise haben Strukturanalysen von FAK ergeben, dass Grb2 und Paxillin, welches bei der Platzierung von FAK eine wichtige Rolle spielt [156], nicht gleichzeitig mit FAK interagieren können. Grund ist ein partielles Überschneiden der Bindungsstellen der beiden Proteine [79,111]. Damit

übereinstimmend haben NMR-Untersuchungen gezeigt, dass die FAT-Domäne eine Konformationsänderung eingehen kann, welche entweder Phosphorylierung an Tyrosin 925 und damit die Bindung von Grb2 oder die Interaktion mit Paxillin zulässt [134]. Dies könnte die Beobachtung erklären, weshalb Phosphorylierung von Tyrosin 925 zum Ausschluss von FAK aus den fokalen Adhäsionen führt [98].

Dagegen beeinflusst die Phosphorylierungsstelle Tyrosin 861 die Interaktion von FAK mit Crk assoziiertem Substrat (p130<sup>Cas</sup>). Zum einen kommt es durch Phosphorylierung zu einer verbesserten Bindung der beiden Proteine *in vitro*, zum anderen zeigen Zellen mit an Tyrosin 861 unphosphorylierbarer FAK eine verminderte Aktivierbarkeit von JNK [109], einem möglichen Effektor von p130<sup>Cas</sup>. Die Phosphorylierung von p130<sup>Cas</sup> ermöglicht die Assoziation mit Crk, wodurch es über die GTPase Rac Einfluss auf Migration und Invasion der Zellen nimmt [49, 87].

Molekulare Analysen verschiedener Tumore weisen auf eine zentrale Rolle von FAK in einer Vielzahl von humanen Neoplasien hin. So findet sich in Plattenepithelkarzinomen [6], Bronchial- [123, 170], Leber- [90], Mamma- [175], Schilddrüsen- [99], Ovarialtumoren [68] und Astrozytomen [72] eine vermehrte Expression und Phosphorylierung von FAK, was die Vermutung nahe legt, dass sich die Kinase als therapeutisches Zielprotein, prognostischer Marker oder Indikator für maligne Transformation einsetzen lässt. Kasahara et al., die als erstes die Funktion von FAK bei der zellulären Reaktion auf genotoxischem Stress untersuchten, beobachteten nach Bestrahlung humaner Leukämiezellen eine verminderte DNA-Fragmentierung sowie eine geringere Aktivität von Caspase 3 und 8 bei FAK Überexpression [96]. Gleichzeitig fand sich eine Induktion des AKT Signalweges und der Apoptoseinhibitoren (inhibitor of apoptosis, IAP) «cellular IAP-2» (cIAP-2) und «X-linked IAP» (XIAP). Neben einer reduzierten Radiosensibilität besaßen HL-60 Zellen mit erhöhter FAK Expression eine vermehrte Resistenz gegenüber zytotoxischen Substanzen wie Wasserstoffperoxid oder Etoposid [159]. Studien an adhärent wachsenden A549 Bronchialkarzinomzellen zeigten interessanterweise eine Induktion der FAK-Phosphorylierung an den Tyrosinresten 397 und 925, nachdem die Zellen bestrahlt worden waren [12]. Als mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte die strahleninduzierte Entstehung von Sauerstoffradikalen dienen [140], unter deren Einfluss Zent et al. eine verstärkte Phosphorylierung von Proteinen der fokalen Adhäsionen beobachteten [184].

### 2.2 Extrazelluläre Matrix

Erworbene oder bestehende Resistenzen von Tumoren gegen genotoxische Einflüsse, wie ionisierende Strahlen oder zytotoxische Medikamente, sind ein weit verbreitetes klinisch äußerst relevantes Phänomen. Untersuchungen haben ergeben, dass hierbei Zell-Matrix-Interaktionen eine wichtige Rolle spielen.

Unter der extrazellulären Matrix (EZM) versteht man die Gesamtheit der Makro- und Mikromoleküle, die sich im Zellzwischenraum befindet. Sie bildet nicht nur ein mechanisches Gerüst und gewährleistet so die strukturelle Integrität von Geweben und letztlich des Gesamtorganismus, sondern ist auch für das Mikromilieu der Einzelzelle, also für Faktoren wie Wasseranteil, Ionenkonzentrationen, Nährstoffe und Signalmoleküle verantwortlich. Zwischen der EZM und den Zellen besteht eine wechselseitige Beziehung [75]. Während durch Mikromilieu und Zell-Matrix-Kontakt verschiedene essentielle Vorgänge wie Differenzierung, Zellzyklusprogression, Migration, Adhäsion und Überleben der Zellen moduliert werden, verändern diese durch Sezernierung von Matrixproteinen die Beschaffenheit der EZM.

Hinsichtlich der Makromoleküle unterscheidet man zwischen Faserproteinen wie Kollagen, Laminin oder Elastin, die der EZM eine mechanische Stabilität verleihen sowie Proteoglykanen und Hyaluronsäure, die aufgrund ihres sehr hohen Hydratisierungsgrades für die gelartige Beschaffenheit der EZM wichtig sind. Fibronektin, ein aus zwei sehr ähnlichen Polypeptiduntereinheiten bestehendes dimeres Protein, stellt eine Verbindung zwischen den Matrixstrukturproteinen und den in der EZM eingebetteten Zellen her, und spielt somit eine entscheidende Rolle für die Signalübertragung. Interessanterweise zeigen Versuche an Fibronektin-defizienten Mäusen, dass der Verlust dieses Proteins bereits in der frühen Embryonalperiode zum Tod führt [65].

Klinisch ist die EZM bei einer Vielzahl von Krankheiten von Bedeutung. So ist beispielsweise die Erkrankung Osteogenesis imperfecta, auch bekannt als Glasknochenkrankheit, durch eine Störung in der Prokollagen-I-Synthese charakterisiert. Während die milden meist heterozygoten Ausprägungsformen mit quantitativ reduziertem aber normalem Kollagen I einhergehen, kommt es bei Mutationen, die zu einem strukturellen Defekt in einer der Proteinketten führen, zu schweren oft schon perinatal letalen Verlaufsformen mit intrauterinen Knochenfrakturen und intrakraniellen Hämorrhagien [137].

Beim Ehlers-Danlos-Syndrom, eine Gruppe hereditärer Erkrankungen, liegt eine Reduktion und gestörte Architektur von Kollagenfaser-Bündeln vor. Je nach dem welcher Kollagentyp betroffen ist, kommt es zu verschiedenen dominierenden Symptomen. So ist

der klassische Typ mit Defekt von Kollagen V überwiegend durch starke Dehnbarkeit der Haut und Hypermobilität der Gelenke geprägt. Dagegen führt eine Mutation im Kollagen-III-Gen zu Fragilität von Arterien und inneren Organen mit der Gefahr von Ruptur großer Gefäße und gastrointestinaler Perforationen [59].

Doch auch für Tumorerkrankungen spielt die EZM eine wichtige Rolle, da hier das Gleichgewicht verschiedener Zellgruppen und der EZM gestört ist [110]. Zwischen Tumorzellen, Stromazellen und der EZM besteht eine wechselseitige Beziehung. Deutlich wird dies bei grundlegenden Prozessen wie Angiogenese, Invasion, Metastasierung und bei der Reaktion auf zytotoxische Substanzen oder Bestrahlung [71]. Tumoren benötigen viel Energie und Nährstoffe, aus diesem Grund sind sie auf eine gute Vaskularisierung angewiesen [8]. Dies spiegelt sich in einer gesteigerten Gefäßneubildung wieder, die ein Ansatzpunkt für eine Therapie darstellt. Weidner et al. konnten zeigen, dass eine vermehrte Vaskularisierung bei Mammatumoren mit schlechterer Prognose korreliert [177].

Bei der Angiogenese exprimieren Endothelzellen  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine [18]. Angiogenesehemmer, die dieses Integrin inhibieren und somit das Wachstum von Gefäßen hemmen befinden sich in der klinischen Evaluation [121]. So z. B. Cilengitide, das in Studien zum Glioblastom oder Pankreaskarzinom eingesetzt wird und für das auch ein synergistischer Effekt in Kombination mit Radiotherapie beim Mammakarzinom der Maus gezeigt werden konnte [20]. Vitaxin, ein weiterer  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antagonist befindet sich in der klinischen Erprobung und scheint eine geringe Toxizität zu besitzen [73].

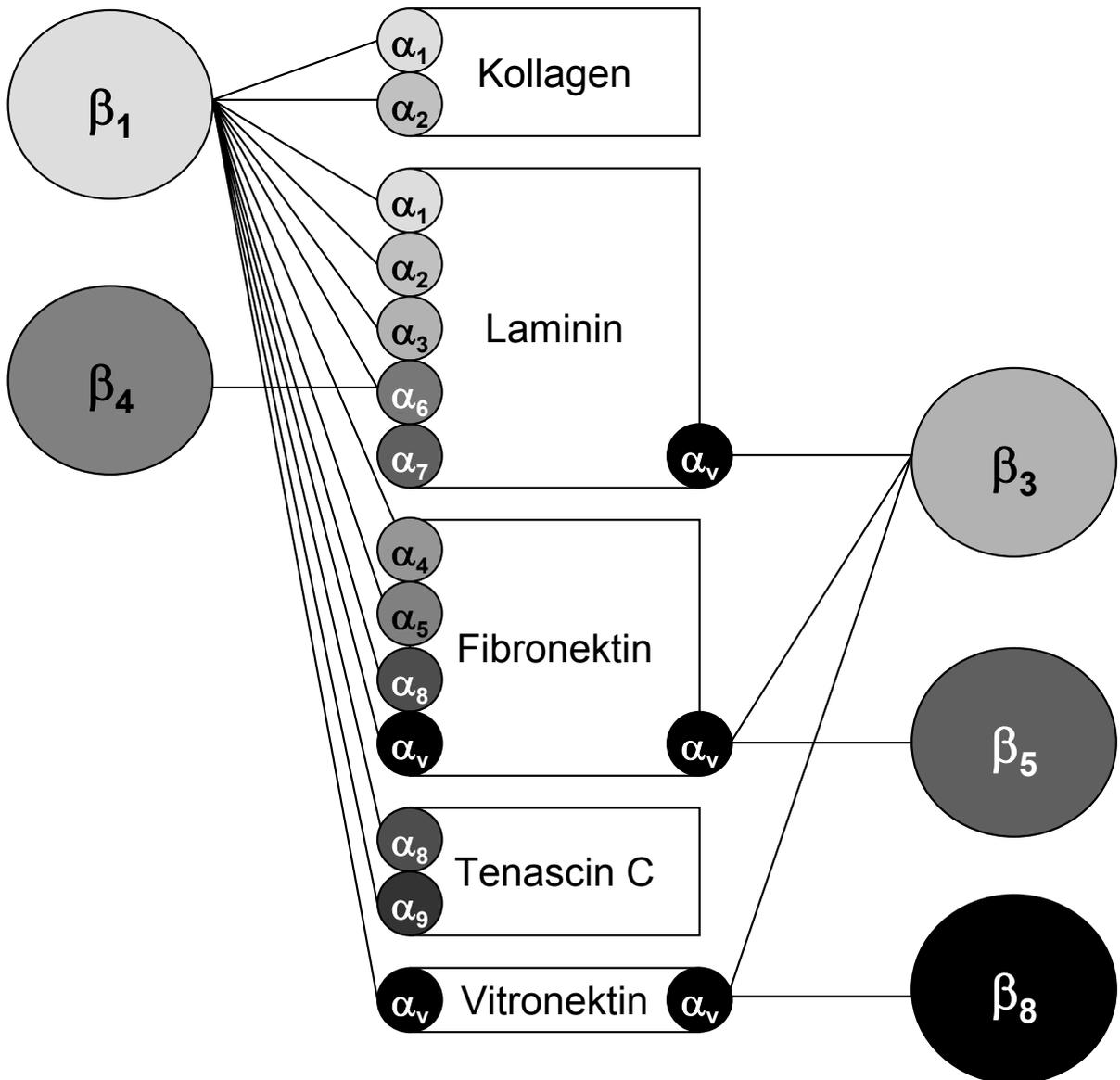
Insbesondere bei der Invasion ist ein Umbau der EZM nötig. Ausgehend von den häufigsten Tumoren des Menschen, den Karzinomen, muss bei der Invasion zuerst die Basalmembran überwunden werden, bei weiterem Wachstum dringt der Tumor in die stromale extrazelluläre Matrix ein. Die EZM wird durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Serin-Proteinasen (z. B. Tissue Plasminogen Activator, Plasmin, Thrombin und Urokinase) abgebaut. Bei der Invasion muss dieser Abbau gerichtet verlaufen, dies ist möglich, da die Proteasen nicht nur sezerniert werden, sondern auch von membranständigen Proteinen gebunden werden. So wird beispielsweise Urokinase von dem Rezeptor uPAR (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor) gebunden [110], was einen räumlich begrenzten EZM-Abbau ermöglicht.

Sowohl die gewebespezifische Zusammensetzung der EZM als auch die unterschiedliche Ausstattung an Integrinen ist beim Tumorwachstum von Bedeutung. Verlässt eine Zelle ihre Umgebung, so ändert sich das Muster der EZM-Proteine, möglicherweise

existieren hier weniger Liganden für die Integrine der Zelle. Durch Rekrutieren von Caspase-8 können die ungebundenen Integrine zur Apoptose führen und die abberante Migration unterbinden. Dieser Mechanismus kann auch den klinisch wohlbekanntesten Sachverhalt organspezifischer Metastasierung bestimmter Tumoren erklären [86, 154].

Die EZM moduliert auch die zelluläre Resistenz gegenüber genotoxischen Einflüssen wie Chemotherapeutika oder ionisierenden Strahlen. So besitzen viele klinisch verwendete Zytostatika eine geringere Wirksamkeit, wenn die Zellen an Matrixproteinen adhären sind. Kleinzellige Bronchialkarzinomzellen zeigen in Matrigel genauso wie auf Laminin eine verminderte Zytotoxizität gegenüber Etoposid, Cisplatin und Doxorubicin [57], während auf Fibronectin wachsende Pankreaskarzinom-, Glioblastom-, Bronchialkarzinom- und Melanomzellen unabhängig von Differenzierungsgrad und Ursprungsgewebe eine reduzierte Radiosensibilität aufweisen [34]. Auch in Kolon-, Ovarial- [115], Mamma- [118], Gehirn- [168] und Lebertumoren [185] wurden vermehrt Therapieresistenzen durch integrinvermittelte Adhäsion an EZM-Proteine gefunden. Interessanterweise zeigen an Fibronectin gebundene Leukämiezellen nach Bestrahlung [40, 83] sowie nach Fludarabin-Exposition [45] eine verminderte Apoptoserate.

Untersuchungen zur Identifizierung der zugrunde liegenden Mechanismen erbrachten eine Vielzahl von potentiellen Proteinen, die für diese klinisch relevanten Effekte verantwortlich sein könnten, darunter insbesondere Integrine und Integrin-Signalmediatoren wie «integrin linked kinase» (integrin gebundene Kinase, ILK), «focal adhesion kinase» (fokale Adhäsionskinase, FAK), p53, Proteinkinase B $\alpha$ /AKT (AKT) oder B-Zell Lymphom Protein-2 (Bcl-2) [29, 30, 36, 44, 81, 96]. Aufgrund der großen Anzahl von Integrinrezeptoren, der komplexen intrazellulären Vernetzung und der Kooperation von Integrin- und Wachstumsfaktorrezeptorsignalwegen, lässt sich eine integrinvermittelte Modifikation aller wichtigen Signalwege für die zelluläre Antwort auf genotoxischen Stress vermuten. Die Integrin-Expression und -Signalgebung wie auch die EZM-Zusammensetzung scheinen wiederum von der Tumor-Stroma-Interaktion beeinflusst zu werden. So weist schnell wachsendes neoplastisches Gewebe eine hohe Umbildungsrate der EZM innerhalb und in unmittelbarer Umgebung des Tumors auf [142, 179], wobei auch die massive Freisetzung von Wachstumsfaktoren sowie die Neovaskularisation für die Resistenzentwicklung von Malignomen gegenüber Therapiemaßnahmen von Bedeutung sein könnten.



**Abbildung 2.7:** Integrine sind membranständige Dimere, die sich aus einer  $\alpha$  und einer  $\beta$  Untereinheit zusammensetzen. Dargestellt sind die bekannten Kombinationen mit ihren Substratspezifitäten.

## 2.3 Integrine

Integrine sind membranständige Glykoproteine und bilden eine eigenständige Gruppe von Oberflächenrezeptoren, die nur bei Vielzellern zu finden sind. Sie vermitteln Zell-Matrix-Kontakte und über Bindung von ICAMs (Inter Cellular Adhesion Molecules)

Integrin	Phänotyp (Maus)
$\alpha_3$	perinatal letal, Defekte der Nierenentwicklung
$\alpha_4$	embryonal letal, Defekte der Plazenta- und Herzentwicklung
$\alpha_5$	embryonal letal, Defekte der Mesodermentwicklung
$\alpha_6$	perinatal letal, Hautablösung, Defekte in Kortex und Retina
$\alpha_7$	lebensfähig, Muskeldystrophie
$\alpha_8$	perinatal letal, gestörte Nierenentwicklung, Defekt der Haarzellen des Innenohrs
$\alpha_9$	Tod nach 10 Tagen, Chylothorax bei Defekt des Ductus lymphaticus
$\alpha_v$	perinatal letal, rupturierte cerebrale Gefäße
$\alpha_{IIb}$	Hämorrhagien, keine Thrombozytenaggregation
$\alpha_M$	Defekte der Phagozytose bei Neutrophilen
$\alpha_E$	stark reduzierte Anzahl intraepithelialer Lymphozyten
$\beta_1$	letal im Stadium der Blastocyste
$\beta_2$	Leukozytose, gestörte Entzündungsreaktion, Hautinfektionen
$\beta_3$	Hämorrhagien, keine Thrombozytenaggregation, Osteosklerose, Hypervaskularisation von Tumoren
$\beta_4$	Hautblasen, Defekte der epithelialen Gewebe
$\beta_7$	gestörte Immunität im Darmbereich, keine Peyer'schen Plaques

**Tabelle 2.1:** Übersicht der integrindefizienten Phänotypen der Maus. Obwohl die Bindungsspezifitäten der Integrine sich teilweise überschneiden, sind die einzelnen Integrine für verschiedene Prozesse essentiell. Integrine spielen bei so unterschiedlichen Vorgängen wie embryonalen Entwicklungsprozessen, Thrombozytenaggregation oder Lymphozytenfunktion eine Rolle.

auch Zell-Zell-Kontakte [26] und bestehen als Heterodimere aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten. Sie können EZM-Proteine wie z. B. Laminin, Fibronectin, lösliche Faktoren wie Fibrinogen oder auch spezifische Oberflächenproteine der Ig-Familie (VCAM-1) binden. Die verschiedenen Integrine besitzen hierfür unterschiedliche Affinitäten (siehe Abbildung (siehe Abb. 2.7)). Zusätzlich zu ihrer Funktion als Oberflächenrezeptor vermitteln Integrine eine mechanische Verbindung zwischen der EZM und dem Zytoskelett. Die intrazelluläre Domäne bindet u.a. Strukturproteine wie Talin oder  $\alpha$ -Aktinin und steht somit in Verbindung zum System der Aktinmikrofilamente, dessen Aufbau und Funktion auch von Integrinen moduliert wird [183].

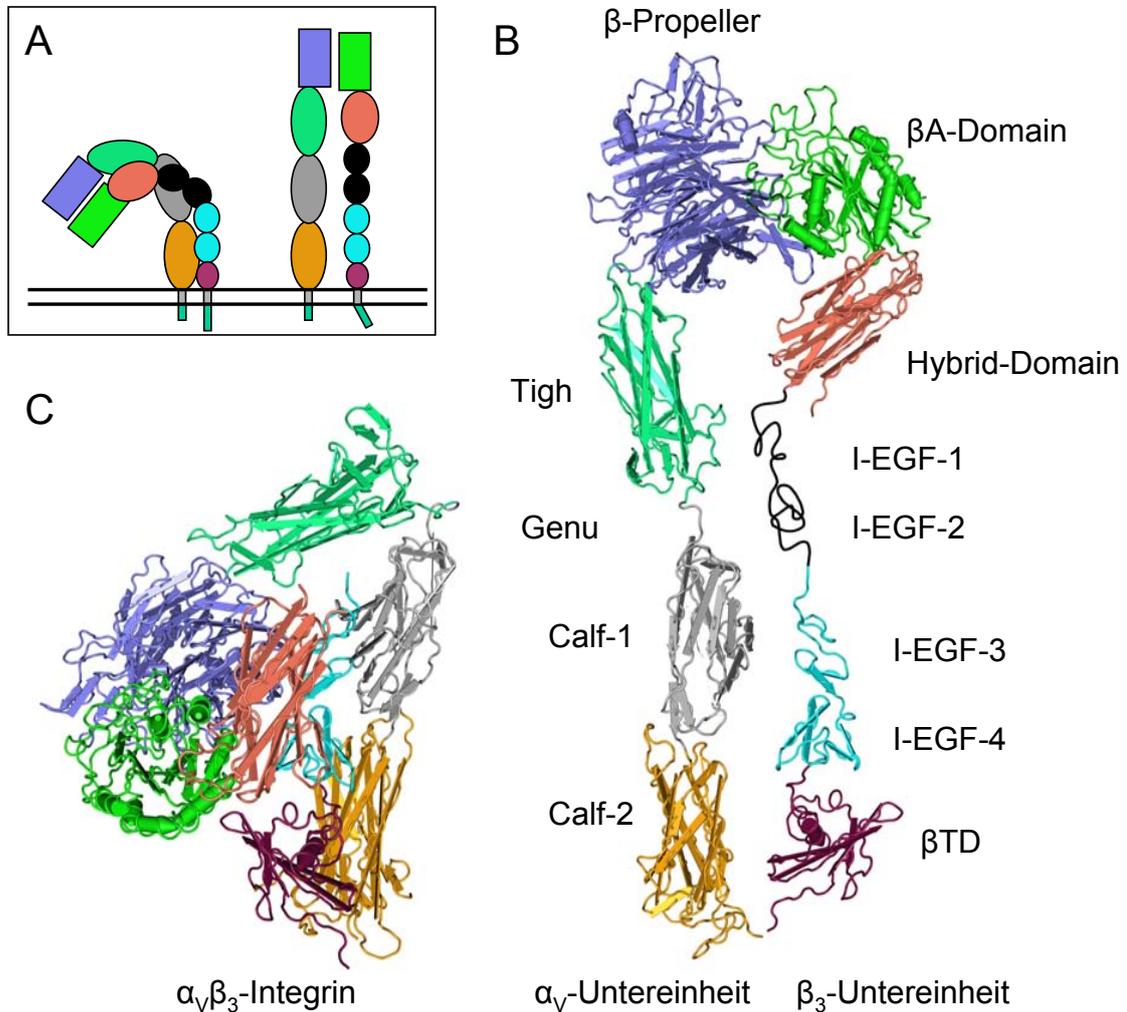
Die Bindungsaffinitäten der verschiedenen Integrine überschneiden sich teilweise. Dennoch sind die einzelnen Integrin-Rezeptoren für viele verschiedene biologische Prozesse essentiell. Dies veranschaulichen die integrindefizienten Phänotypen der Maus mit häufig embryonaler oder perinataler Letalität oder Sichtbarwerden von Defekten in unterschiedlichen Geweben im adulten Tier (siehe Tabelle 2.1 [14, 89]).

Integrine stehen möglicherweise auch mit einer erhöhten Resistenz von malignen Erkrankungen gegenüber therapeutischen Maßnahmen in Verbindung.  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin scheint als Antagonist gegen Zelltod nach Doxorubicin- oder Melphalan-Exposition in multiplen Myelomzellen zu fungieren [82], wobei dieser Effekt ebenfalls bei Mammatumoren nach Paclitaxel [5] und bei nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen nach Cisplatin oder Mitomycin-C Behandlung [31] beobachtet wurde. Studien an murinen GD25 Fibroblasten zeigen die wichtige regulatorische Funktion von  $\beta_1$ -Integrinen für die zelluläre Strahlenantwort [35, 148].

Nach Strahlenexposition zeigen humane Fibroblasten [34], Endothelzellen und Keratinozyten [117] sowie auch maligne Zellen verschiedener Tumorentitäten [32, 33, 52, 152] ein verändertes Expressionsmuster bestimmter Integrinuntereinheiten, darunter  $\beta_1$ -,  $\beta_3$ - und  $\alpha_5$ -Integrin. Hallahan et al. nutzten die Induktion von  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptoren nach Bestrahlung von Glioblastom- und Melanomzellen, um Radioisotope, welche an Integrinliganden gekoppelt waren, in die Zellen einzubringen und sie dadurch spezifisch zu schädigen [74]. Durch diese Methode könnte mit Hilfe von Integrinen eine lokale Wirkung von applizierten Zytostatika durch die Auswahl des Bestrahlungsfeldes erreicht werden. Interessanterweise lässt sich sowohl nach dreiwöchiger fraktionierter Radiotherapie als auch nach Applikation von genotoxischen Substanzen wie Cisplatin und Cyclophosphamid eine Reduktion der Integrinexpression nachweisen [152]. Kürzlich konnten Park et al. zeigen, dass die Inhibition von  $\beta_1$ -Integrin mittels monoklonaler Antikörper sowohl in 3-dimensionalen Zellkulturen als auch *in vivo* zu einer Reduktion der Proliferation und zu einer Steigerung der Apoptoserate in Mammakarzinom Tumoren führt [128].

### 2.3.1 Struktur

Integrine setzen sich aus einer  $\alpha$  und einer  $\beta$  Untereinheit zusammen, die jeweils einen extrazellulären, einen transmembranösen und einen intrazellulären Teil besitzen [88]. Es wurden bisher 18  $\alpha$  und 8  $\beta$  Untereinheiten identifiziert, es existieren aber nicht alle  $18 \times 8 = 144$  Kombinationen dieser Einheiten, bisher sind 24 verschiedene Heterodimere bekannt. Der aminoterminal gelegene «Kopf» des Integrins setzt sich aus der «Propeller»-Sequenz der  $\alpha$ -Untereinheit und der  $\beta$ A-Domäne der  $\beta$ -Untereinheit zusammen und enthält die Region, die für die Ligandenbindung verantwortlich ist (siehe Abb. 2.8). Bei der  $\alpha$ -Untereinheit folgen drei hauptsächlich  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen beinhaltende Domänen: Tigh, Calf-1 und Calf-2. Während die Untereinheiten Calf-1 und Calf-2 eine



**Abbildung 2.8:** Struktur des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins: A ist eine schematische Darstellung der beiden Untereinheiten. B zeigt den aktiven Zustand des Integrinrezeptors, der sich durch Rotation der Domänen gegeneinander ergibt. [181]. C zeigt den inaktiven Zustand. Der «Kopf» des Integrins ist für die Ligandenbindung zuständig. Er besteht aus der Propeller-Sequenz der  $\alpha$ -Untereinheit (dunkelblau) und der  $\beta$ A-Domäne der  $\beta$ -Untereinheit (hellgrün). Das «Genu» der  $\alpha$ -Untereinheit zwischen der Tigh-Region (mintgrün) und Calf-1 (grau) ist wichtig für die Konformationsänderung vom inaktiven in den aktiven Zustand. Bei der  $\beta$ -Untereinheit ist die dreidimensionale Struktur dieser für den Klappmechanismus relevanten Region aufgrund hoher Variabilität nicht ausreichend aufgelöst und entspricht hier nur einer Schätzung. (Struktur: PDB 1JV2, Software Cn3d, nach [89,181])

starre Einheit bilden, ermöglicht die Verbindung zwischen Calf-1 und Tigh die Bewegung der Domänen gegeneinander und wird ihrer Funktion nach «Genu» (Knie) genannt. Dagegen schließen sich bei der  $\beta$ -Untereinheit 4 auch im «epidermal growth factor» (EGF) vorkommende Sequenzen (I-EGF-1 bis 4) und die  $\beta$ -Tail-Domäne ( $\beta$ TD) an. Diesem mit ca. 160 Å relativ langen extrazellulären Teil folgt ein kurzer transmembranöser und zytoplasmatischer Teil.

### 2.3.2 Signalübertragung

Obwohl Integrine weder eine Kinaseaktivität noch sonst eine enzymatische Aktivität besitzen, haben sie wichtige signalübertragende Funktionen. Diese laufen über Proteine ab, die sich der zytoplasmatischen Domäne anlagern, wie Adapterproteinen, Proteinkinasen oder Proteinen die beide Funktionen ausüben. Beispiele hierfür sind die Serin/Threonin Kinase ILK und die Tyrosinkinase FAK.

Stimulation von Integrin-Rezeptoren über ein geeignetes Substrat bewirkt durch Integrin-Clustering und Rekrutierung von Wachstumsfaktorrezeptoren, Adapterproteinen, Signalproteinen und Zytoskelettbestandteilen die Bildung komplexer Strukturen an der Zellmembran. Diese werden fokale Adhäsionskomplexe genannt. Viele der Signalprozesse, die durch Integrine vermittelt werden, ähneln denen von Wachstumsfaktorrezeptoren [89]. Auch die enge räumliche Beziehung in den fokalen Adhäsionskomplexen deutet auf einen funktionellen Zusammenhang der beiden Rezeptor-Gruppen hin. Tatsächlich ist die zelluläre Reaktion auf Wachstumsfaktoren wie EGF und PDGF abhängig von der integrinvermittelten Adhäsion der Zelle auf einem Substrat. Hierin liegt der Grund für die Adhäsionsabhängigkeit von Zellüberleben und Proliferation. Den Integrinen kommt hierbei eine zentrale Bedeutung zu [147]. Über die in den fokalen Adhäsionen enthaltenen Signalproteine werden auch andere grundlegende Zellfunktionen wie Differenzierung, Migration und Apoptose moduliert. Insbesondere für das Zellüberleben nach Bestrahlung konnte gezeigt werden, dass Integrinen und der EZM eine zentrale Rolle zukommt [29,34].

Neben dieser von außen nach innen verlaufenden Signalübertragung («outside-in signaling») können Integrine auch Signale vom Inneren der Zelle nach außen vermitteln, indem sie ihre Affinität für ein Substrat verändern und so nach außen agieren («inside-out signaling») [89]. So ist für einige Integrine gezeigt worden, dass sie zwei Zustände «ON» oder «OFF» annehmen können. Ein Beispiel hierfür ist ein für Thrombozyten charakteristisches Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , besser bekannt als GP IIb/IIIa. Es befindet sich normalerweise im «OFF» Zustand, wäre dem nicht so, würde es seinen Liganden Fibrinogen

binden und so zur Thrombozytenaggregation und Thrombosierung führen. Werden die Plättchen aktiviert, wechseln die  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Integrine durch zytoplasmatische Signale in den «ON» Zustand und binden Fibrinogen, Fibronektin und von Willebrand Faktor. Sie adhären so an der Gefäßwand und bilden einen Thrombus. Wie wichtig diese Funktion ist, zeigt sich bei einem Defekt des  $\alpha_{IIb}$  oder des  $\beta_3$  Integrins, die zu einem Verlust der Thrombozytenaggregation führen [97].

Es existieren mittlerweile einige Medikamente, die diesen Mechanismen nutzen. So ist z. B. Abciximab (ReoPro™) ein Antikörper der die Bindung von Fibrinogen und von Willebrand-Faktor an das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin verhindert und somit die Thrombozytenaggregation hemmt [46]. Eptifibatid (Integrilin™), ein zyklisches Peptid wird nun ebenfalls als Thrombozytenaggregationshemmer eingesetzt [131]. Tirofiban (Aggrastat™) ist ein nichtpeptidischer Integrinantagonist, der wie Eptifibatid in der Kardiologie verwendet und ebenfalls parenteral verabreicht wird.

Eine weitere Funktion der Integrine zeigt sich beim  $\beta_2$ -Integrin auf Leukozyten. Bei Aktivierung bindet es Oberflächenrezeptoren der Ig-Klasse wie ICAM und vermittelt die Adhäsion am Gefäßendothel. Patienten mit einem Defekt des  $\beta_2$  Integrins leiden an der Krankheit LAD (Leukozyten Adhäsions Defekt), die mit Leukozytose und der Unfähigkeit der Leukozyten den Ort von Entzündungen zu erreichen einhergeht. Therapeutisch lässt sich dieses Phänomen bei Krankheiten mit überschießender Immunreaktion nutzen, so wurde ein Inhibitor für  $\beta_4$ -Integrin (das bei Leukozyten eine ähnliche Funktion wie  $\beta_2$ -Integrin hat) entwickelt und mit Erfolg bei Multipler Sklerose und auch Morbus Crohn eingesetzt [119, 144].<sup>3</sup>

Es wird vermutet, dass auch bei den anderen Integrindimeren ein aktiver und ein inaktiver Zustand existiert. Der Mechanismus dieser Aktivierung ist noch unklar, wahrscheinlich handelt es sich um eine Konformationsänderung des Dimers. Schon 1992 wurde durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt, dass ligandengebundene Integrine eine gestreckte Form einnehmen [178]. Eine röntgenkristallographische Strukturanalyse zeigte jedoch eine zusammengeklappte Form des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins [181]. Dies stellt wahrscheinlich die inaktive Form dar [158]. Der Übergang in die aktive Form erfolgt durch einen Aufklappvorgang («switchblade»-Mechanismus, siehe Abb. 2.8).

Die Konformationsänderung der extrazellulären Domäne geht mit einer Veränderung im zytoplasmatischen Teil einher. So sind in der aktiven Form die zytoplasmatischen Domänen voneinander getrennt, während sie bei der inaktiven Form Kontakt haben.

---

<sup>3</sup>Der Inhibitor Natalizumab (Tysabri™) ist in Europa zugelassen. Als gefährliche Nebenwirkung ist die PML (Progressive multifokale Leukoenzephalopathie) zu beachten [103].

Takagi et al. stellten ein  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin her, bei dem der zytoplasmatische und transmembranöse Teil beider Untereinheiten entfernt und durch zwei kurze mit einer Disulfidbrücke verbundene Peptide ersetzt worden war. Hierbei war das resultierende lösliche Integrin inaktiv und zeigte keine Affinität zu seinem Liganden Fibronectin. Durch Spaltung der Disulfidbrücke entstand die aktive Form, die wieder Ligandenbindung zeigte. Elektronenmikroskopisch war eine Separierung der carboxyterminalen Peptide sichtbar [157].

## 3 Material

### 3.1 Zelllinien

Untersucht wurden embryonale Mausfibroblasten, die entweder als Pinch-1<sup>fl/fl</sup> oder als Pinch-1 defizienter Genotyp Pinch-1<sup>-/-</sup> vorlagen. Diese Zelllinien wurden uns in einer Kooperation mit Prof. Fässler<sup>1</sup> dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung dieser Zellen wurde in embryonale Stammzellen ein Konstrukt (PINCH – 1<sup>fl</sup>) eingebracht, das das Gen für Pinch-1, die angrenzenden Regionen und eine Neo-TK Kassetten (Neomycin Resistenz und die Herpes Thymidinkinase) enthielt. In diesem Konstrukt waren LoxP-Sequenzen eingebracht, vor und nach einem Exon und der Neo-TK Kassetten. Diese LoxP-Sequenzen ermöglichen es, das Exon oder die Resistenz zu einem späteren Zeitpunkt durch die Cre-Rekombinase (Cyclization REcombination) zu entfernen<sup>2</sup>.

Die Zellen mit erfolgreicher Integration des Konstrukts wurden durch Selektion mit Neomycin gefunden. Nach Entfernung der Neomycinresistenz<sup>3</sup> wurden aus diesen embryonalen Stammzellen, die sich von den ursprünglichen Zellen nur durch die LoxP-Sequenzen unterscheiden, Mäuse herangezüchtet.

Um die Zelllinie Pinch-1<sup>fl/fl</sup> zu erhalten, wurden embryonale Fibroblasten isoliert und mittels eines Adenovirus mit SV40 largeT-Antigen immortalisiert. Um die Zelllinie Pinch-1<sup>-/-</sup> herzustellen, wurden diese Zellen mit einem Cre-exprimierenden Adenovirus infiziert und somit das Exon im Gen von Pinch-1 entfernt.

Die ILK<sup>fl/fl</sup> und ILK<sup>-/-</sup> wurden in einem ähnlichen Verfahren hergestellt (beschrieben in [143, S. 927]).

In den Pinch-1<sup>rekon</sup> Zelllinien ist die Pinch-1 Expression durch Transfektion der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zelllinie mittels eines Pinch-1 exprimierenden, retroviralen Vektors wiederhergestellt

---

<sup>1</sup>Abteilung für Molekulare Medizin, Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried

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

<sup>3</sup>Dazu wurden die Zellen mit einem Cre-Rekombinase Expressionsplasmid transfiziert. Die Zellen, bei denen die Neo-TK Cassette dadurch entfernt wurde, sind resistent gegen FIAU (1-(2-deoxy-2-fluoro-[beta]-D-arabinofuranosyl)-5-iodouridine, eine Substanz mit antiviraler Wirkung), denn FIAU tötet nur Zellen, in denen die Herpes Thymidinkinase (negativer Selektionsmarker) aktiv ist.

(Pinch-1 rekonstituiert Pinch-1<sup>rekon</sup>) [153].

Außerdem wurden vergleichende Untersuchungen mit nichtmalignen menschlichen Zelllinien und mit verschiedenen humanen Tumorzelllinien durchgeführt (siehe Tabelle 3.1).

Zelllinie	Ursprung	Medium	Bezugsquelle
Pinch-1 <sup>fl/fl</sup>	embryonale Mausfibroblasten	DMEM	Prof. Fässler
Pinch-1 <sup>-/-</sup>	embryonale Mausfibroblasten	DMEM	Prof. Fässler
Pinch-1 <sup>rekon</sup>	embryonale Mausfibroblasten	DMEM	Prof. Fässler
ILK <sup>fl/fl</sup>	murine Nierenfibroblasten	DMEM	Prof. Fässler
ILK <sup>-/-</sup>	murine Nierenfibroblasten	DMEM	Prof. Fässler
A172	Glioblastom	DMEM	ATCC CRL-1620
U138MG	Glioblastom	MEM	ATCC HTB-16
A549	Lunge, Adenoca.	DMEM	DMSZ ACC-107
SKMES1	Lunge, Plattenepithelca.	DMEM	DMSZ ACC-353
CLL-221	Colon, Adenoca.	RPMI	ATCC CLL-221
HTB-35	Cervix, Plattenepithelca.	DMEM	SiHa
HTB-43	Pharynx, Plattenepithelca.	DMEM	FaDu
MDA-MB-231	Mamma, Adenoca.	DMEM	ATCC HTB-26
PA-TU-8902	Pankreas, Adenoca.	DMEM	DMSZ ACC-179
Jurkat	ALL	RPMI	DMSZ ACC-282
HL60	AML FAB M2	RPMI	DMSZ ACC-3
CCD32	Lungenfibroblasten	DMEM	Prof. Rodemann
HSF-1	Hautfibroblasten	DMEM	Prof. Rodemann
HSF-2	Hautfibroblasten	DMEM	Prof. Rodemann

**Tabelle 3.1:** Verwendete Zelllinien (DMSZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, Braunschweig; ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, USA; Prof. Fässler: Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried; Prof. Rodemann, Universität Tübingen)

## 3.2 Geräte und Hilfsmittel

### 3.2.1 Zellkultur

<i>Sterilbank</i>	Hera safe (Heraeus Kendro Laboratory Products, Hanau)
<i>Brutschrank</i>	BBD 6220 (Heraeus Kendro Laboratory Products, Hanau)
<i>Wasserbad</i>	TW 8 (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach)
<i>Umkehrmikroskop</i>	Axiovert 10 (Zeiss, Oberkochen)
<i>Neubauer Zählkammer</i>	(Baacklab, Schwerin)
<i>Zellzähler</i>	Z2 Particle Analyzer (Beckman Coulter, Krefeld)

<i>Zellkulturflaschen</i>	25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> (Becton Dickinson, Heidelberg)
<i>Falcon Röhrchen</i>	15 ml, 50 ml (Becton Dickinson, Heidelberg)
<i>Kryoröhrchen</i>	1 ml (Nalgene, Hereford, United Kingdom)
<i>Abkühlbehälter</i>	Freezing Container (Nalgene, Hereford, United Kingdom)

### 3.2.2 Bestrahlung

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

### 3.2.3 Koloniebildungsassay

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

### 3.2.4 Western-Blot

<i>ELISA-Spektrometer</i>	SpectraMax 190 (Molecular Devices, Ismaning)
<i>Zentrifuge</i>	Sigma 202-MK (Sigma, Osterode)
<i>Zentrifuge</i>	Labofuge 400R (Heraeus Kendro Laboratory Products, Hanau)
<i>Waage</i>	PT 600 (Sartorius, Göttingen)
<i>Heizplatte</i>	MR 3001 (Heidolph, Schwabach)
<i>Vortexer</i>	REAX 2000 (Heidolph, Schwabach)
<i>Schwenktisch</i>	Polymax 2040 (Heidolph, Schwabach)
<i>Rüttler</i>	KL 2 (Edmund Bühler, Tübingen)
<i>Elektrophoresesystem</i>	SE 600 (Hoefer, San Francisco, USA)
<i>Transferapparat</i>	Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech, Frankfurt)
<i>Stromquelle</i>	EPS 3500 (Amersham Pharmacia Biotech, Frankfurt)
<i>Scanner</i>	ScanJet (C6270, Epson, Meerbusch)
<i>Software</i>	SoftMax Pro 3.01 (Molecular Devices, Ismaning)
<i>Software</i>	ImageQuant 5.0 (Molecular Dynamics, Krefeld)
<i>Zellschaber</i>	Costar cell scraper 3010 (Corning, Niederlande)
<i>Nadel</i>	25-Gauge Nadel (Braun, Meisungen)
<i>Eppendorf Röhrchen</i>	1,5 ml, 2 ml (Eppendorf AG, Hamburg)

<i>Mikrotiterplatte</i>	96-Well (Becton Dickinson, Heidelberg)
<i>Chromatographie Papier</i>	3MM Chr (Whatman, Cambridge, UK)
<i>Nitrocellulosemembran</i>	Protran BA 83 (Schleicher & Schuell, Dassel)
<i>Film</i>	Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences Europe, Freiburg)
<i>Filmkassette</i>	Hypercassette (Amersham Biosciences Europe, Freiburg)
<i>Beads</i>	Protein G Agarose (Sigma-Aldrich, Hamburg)

### 3.2.5 Immunfluoreszenz

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

## 3.3 Reagenzien

### 3.3.1 Reagenzien für Zellkultur

<i>DMEM</i>	Dulbecco Modified Eagle Medium, (Gibco, Karlsruhe)
<i>RPMI</i>	Roswell Park Memorial Institute, Gibco RPMI 1640 (Invitrogen, Karlsruhe)
<i>MEM</i>	Minimum Essential Medium, (Invitrogen, Karlsruhe)
<i>FKS</i>	fetales Kälber Serum Gold (PAA, Pasching, Österreich)
<i>NEA</i>	nichtessentielle Aminosäuren (Gibco, Karlsruhe)
<i>Trypsin</i>	(Gibco, Karlsruhe)
<i>DMSO</i>	Dimethyl-Sulfoxid (HybriMax, CR1194, Sigma-Aldrich, Steinheim)

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

### 3.3.2 Reagenzien für Western Blot

<i>NaCl</i>	Natrium-Chlorid, MW 58,44 g/mol (Merck, Darmstadt)
<i>KCl</i>	Kalium-Chlorid, MW 74,56 g/mol (Merck, Darmstadt)

### 3 Material

---

$Na_2HPO_4$	Di-Natrium-Hydrogenphosphat, MW 141,96 g/mol (Merck, Darmstadt)
$KH_2PO_4$	Kalium-Hydrogenphosphat, MW 136,09 g/mol (Merck, Darmstadt)
<i>Tween</i>	Tween 20, USB (Amersham Biosciences Europe, Freiburg)
<i>Tris-HCl</i>	Tris-HCl (pH 7,4, MW 157,6 g/mol, Merck, Darmstadt)
<i>NP-40</i>	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
<i>Sodium deoxycholate</i>	414,56 g/mol (Merck, Darmstadt)
<i>EDTA</i>	Ethylendiamintetraacetat (Sigma Chemical CO, St. Louis, USA)
<i>Complete</i>	Proteaseinhibitor (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
<i>BCA-Reagenz</i>	BC Assay Reagent (Interchim, Montluçon, Frankreich)
<i>Tris-Base</i>	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
<i>Acrylamidlösung</i>	Acrylamid/bis-Acrylamid 30% (Sigma-Aldrich, Steinheim)
<i>SDS</i>	n-Dodecylsulfat Natriumsalz (Merck, Darmstadt)
<i>APS</i>	PlusOne Ammonium Persulfat (Amersham Biosciences, Freiburg)
<i>TEMED</i>	PlusOne TEMED (Amersham Biosciences, Freiburg)
<i>Isopropanol</i>	(Merck, Darmstadt)
<i>Marker</i>	BenchMark Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)
<i>Glycerol</i>	(Merck, Darmstadt)
<i>Mercaptoethanol</i>	(Merck, Darmstadt)
<i>Bromphenolblau</i>	(Serva, Heidelberg)
<i>Glycin</i>	75.07 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim)
<i>Borsäure</i>	(Merck, Darmstadt)
<i>Methanol</i>	(Merck, Darmstadt)
<i>Ponceau-Lösung</i>	Ponceau S (Serva, Heidelberg)
<i>Milchpulver</i>	Magermilchpulver (Merck, Darmstadt)
<i>ECL</i>	ECL™ Western Blot Detection Reagent (Amersham Biosciences, Freiburg)
<i>Entwickler</i>	GBX Developer (Kodak, Stuttgart)
<i>Fixierer</i>	GBX Fixer (Kodak, Stuttgart)

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

<i>Natriumchlorid</i>	80 g
<i>Kaliumchlorid</i>	2 g
$Na_2HPO_4$	11 g
$KH_2PO_4$	2 g

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

### Waschpuffer

<i>1×PBS</i>	2000 ml
<i>Tween</i>	2 ml

Lagerung bei 4°C.

### RIPA-Lysepuffer

<i>Tris-HCL (pH 7,4)</i>	50 mM
<i>NP-40</i>	1 %
<i>Sodium deoxycholate</i>	0,25 %
<i>Natriumchlorid</i>	150 mM
<i>EDTA</i>	1 mM

ad 50 ml Aqua bidest. Lagerung bei 4°C. Vor Gebrauch 957 µl dieser Lösung folgende Zusätze zugeben: 40 µl einer Lösung von einer Tablette Complete ad 2 ml Aqua dest., 1 µl einer 200 mM Lösung von  $Na_3VO_4$  und 1 µl einer 200 mM Lösung von NaF.

### BCA (Bicinchoninsäure)-Protein Assay

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

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

Lagerung bei Raumtemperatur, lichtgeschützt.

### Trenngelpuffer

*Tris-Base* 18,17 g

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

### Sammelgelpuffer

*Tris-Base* 6,06 g

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

### Trenngel

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

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

### Sammelgel

<i>Sammelgelpuffer</i>	1,8 ml
<i>Aqua bidest.</i>	4,5 ml
<i>Acrylamidlösung</i>	1,12 ml
<i>SDS-Lösung 10%</i>	75 µl
<i>APS-Lösung 10%</i>	150 µl
<i>TEMED</i>	7,5 µl

### Ladepuffer

<i>Glycerol</i>	2 ml
<i>10% SDS-Lösung</i>	2 ml

<i>Sammelgelpuffer</i>	2,5 ml
<i>β-Mercaptoethanol</i>	0,5 ml
<i>Bromphenolblau</i>	1 mg

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

#### **Laufpuffer**

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

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

#### **Anodenpuffer**

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

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

#### **Kathodenpuffer**

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

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

#### **Blocking Puffer**

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

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

### **ECL™ Western Blot Detection Reagent**

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

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

#### **Entwickler**

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

#### **Fixierer**

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

### **3.3.3 Reagenzien für Koloniebildungsassay**

<i>Cisplatin</i>	Platinex™ (Bristol-Myers Squibb, München)
<i>Mitomycin-C</i>	Mitomycin medac (Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Wedel)
<i>Coomassie</i>	G250 Brilliantblau (Merck, Darmstadt)
<i>Eisessig</i>	(Merck, Darmstadt)
<i>Ethanol vergällt</i>	Ethanol (Carl Roth , Karlsruhe)
<i>Formaldehyd</i>	4 % (Merck, Darmstadt)

#### **Coomassie-Blau-Lösung**

<i>Methanol</i>	200 ml
<i>Eisessig</i>	75 ml
<i>Coomassie</i>	0,5 g

ad 1l Aqua bidest. Lagerung lichtgeschützt bei Raumtemperatur.

### **3.3.4 Reagenzien für Immunfluoreszenz**

<i>DAPI</i>	4',6-Diamidino-2-phenylindol-2 HCl (Serva, Heidelberg)
<i>Phalloidin, FITC konj.</i>	1 mg/ml Ethanol (Sigma-Aldrich, Hamburg)

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

### 3.3.5 Reagenzien für $\gamma$ -H2AX-Färbung

<i>Formaldehyd säurefrei</i>	1 % Formaldehyd acid free (Merck, Darmstadt)
<i>TX-100</i>	Triton X-100 (Merck, Darmstadt))
<i>Gelatine</i>	

### PBS/Glycin Waschlösung

<i>Glycin</i>	0,5 ml
<i>1×PBS</i>	ad 100 ml

### PBTG Waschlösung

<i>Tween20</i>	0,05 ml
<i>Gelatine</i>	0,5 ml
<i>1×PBS</i>	ad 100 ml

### DAPI-Vectashield-Mischung

<i>Vectashield</i>	0,7 ml
<i>DAPI</i>	0,3 ml

### Triton-X Lösung

<i>TX-100</i>	0,025 ml
<i>1×PBS</i>	ad 10 ml

## 3.4 Substrate

<i>Fibronektin</i>	1 mg/ml (Becton Dickinson, Heidelberg)
--------------------	--

*Poly-L-Lysin* 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, Hamburg)

### 3.5 Antikörper

#### 3.5.1 Primärantikörper

<i>ILK</i>	monoklonal, Maus IgG <sub>1</sub> , (Becton Dickinson, Heidelberg) WB 1:500 MiPu, IF 1:100 BSA
<i>Pinch-1</i>	polyklonal, Hase IgG, (Prof. Fässler, MPI, Martinsried) WB 1:4000 1% PBS Tween MiPu, IF 1:500 BSA
<i>α-Parvin</i>	polyklonal, Hase IgG, (Acris, Hiddenhausen) WB 1:1000 MiPu, IF 1:250 BSA
<i>FAK</i>	monoklonal (Cl. 77), Maus IgG <sub>1</sub> , (Becton Dickinson, Heidelberg) WB 1:1000 MiPu
<i>phospho-FAK Y<sup>925</sup></i>	polyklonal, Ziege, (Santa Cruz, Heidelberg) WB 1:200 MiPu
<i>phospho-FAK Y<sup>397</sup></i>	polyklonal, Hase, (Calbiochem, Darmstadt) WB 1:250 MiPu
<i>AKT</i>	polyklonal, Hase IgG, (Cell Signaling, Frankfurt a.M.) WB 1:500 MiPu, IF 1:100 BSA
<i>phospho-AKT Ser<sup>473</sup></i>	polyklonal, Hase IgG, (Cell Signaling, Frankfurt a.M.) WB 1:250 MiPu
<i>GSK3β</i>	monoklonal (Cl. 7), Maus IgG <sub>1</sub> , (Becton Dickinson, Heidelberg) WB 1:500 MiPu
<i>phospho-GSK3β Ser<sup>9</sup></i>	polyklonal, Hase IgG, (Cell Signaling, Frankfurt a.M.) 1:250 MiPu
<i>Paxillin</i>	monoklonal, Maus IgG <sub>1</sub> , (Sigma, Steinheim) WB 1:500 MiPu
<i>phospho-Paxillin Tyr<sup>31</sup></i>	polyklonal, Hase, (Sigma, Steinheim) WB 1:500 MiPu

<i>p130<sup>Cas</sup></i>	monoklonal, Maus IgG <sub>2a</sub> , (Upstate, Lake Placid) WB 1:250 MiPu
<i>phospho-p130<sup>Cas</sup> Y<sup>410</sup></i>	polyklonal, Hase, (Cell Signaling, Frankfurt a.M.) WB 1:250 Tween MiPu
<i>phospho-Tyrosin</i>	monoklonal (Cl. 4G10), Maus IgG <sub>2bκ</sub> , (Upstate, Lake Placid) WB 1:500 MiPu
<i>Fibronektin</i>	monoklonal, Maus IgG, (Becton Dickinson, Heidelberg) 1:2000 MiPu
<i>Src</i>	monoklonal (Cl. GD11), Maus IgG <sub>1</sub> , (Upstate, Lake Placid) WB 1:500 MiPu

### 3.5.2 Sekundärantikörper

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

## **4 Methoden**

### **4.1 Zellkultur**

#### **4.1.1 Subkultivierung**

Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 10 % (DMEM, MEM) oder 5 % (RPMI) kultiviert. Als Medium diente DMEM, MEM oder RPMI mit einem Anteil von 10% FKS und 1% NEA. Bei einer Konfluenz von 70-90% wurden die Zellen einmal mit Trypsin gespült, anschließend abtrypsiniert und im Verhältnis 1 : 4 – 1 : 10 in eine neue Zellkulturflasche umgesetzt.

#### **4.1.2 Einfrieren**

Zellen wurden abtrypsiniert, mittels Zellzähler gezählt, zentrifugiert und in Einfriermedium (Standardmedium mit 20% FKS und 5% DMSO) resuspendiert. Die Suspension wurde in Kryoröhrchen mit einer Abkühlgeschwindigkeit von ca. 1°C/min auf –80°C abgekühlt. Die Lagerung erfolgte bei –130 °C.

#### **4.1.3 Auftauen**

Die gefrorene Zellsuspension erwärmt und der in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 12 ml Medium gegeben. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

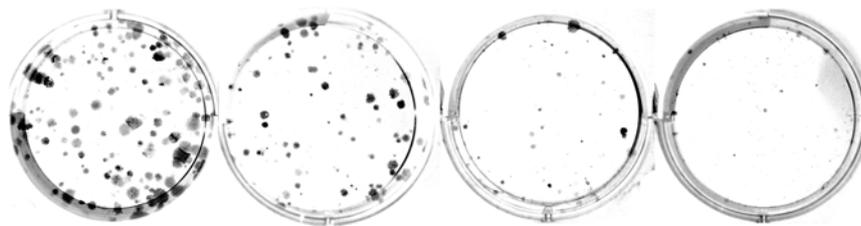
#### **4.1.4 Suspension**

Um die Zellen in Suspension zu halten wurden Petrischalen mit 10 ml 1%-iger Lösung von Agarose in Aqua dest. befüllt und die Zellen nach dem Erkalten hierauf ausgebracht. Das Agarosegel am Boden der Schale verhinderte effektiv ein Anheften der Zellen.

## 4.2 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte bei 20 °C Umgebungstemperatur mit einer Röntgenröhre. Die Anodenspannung betrug 240 kV, der Anodenstrom 13 mA. Zwischen Röhre und Probe bestand ein Abstand von 22 cm, wobei die Strahlung mittels einer 3 mm dicken Berylliumplatte gefiltert wurde. Die applizierte Dosis wurde mit einem Dosimeter, das zuvor anhand eines Prüfstrahlers kalibriert worden war, gemessen. Bei Erreichen der gewünschten Dosis wurde die Bestrahlung automatisch beendet. Die Bestrahlung erfolgte innerhalb der 95% Isodose.

## 4.3 Koloniebildungsassay



**Abbildung 4.1:** Beispielhafte fotografische Aufnahmen eines Koloniebildungsassays der  $ILK^{fl/fl}$  Zelllinie. Es wurde mit 0 (links), 2, 4 oder 6 Gy (rechts) bestrahlt. Deutlich zu sehen ist die Abnahme der Kolonienzahl bei höherer Dosis, außerdem sind die Kolonien bei höherer Dosis kleiner.

Der Koloniebildungsassay, welcher das klonogene Überleben erfaßt, dient der Bestimmung der Sensibilität verschiedener Zellen gegenüber genotoxischen Einflüssen. Es wird eine definierte Zellzahl ausgesät und nach entsprechendem Protokoll behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen werden die Kolonien angefärbt und gezählt (vergleiche [135], Abbildung 4.1). Diese Methode zur Bestimmung des Zellüberlebens gilt als Goldstandard in der Strahlenbiologie.

### 4.3.1 Ansatz

Die 6er-Platten wurden mit Fibronectin, Kollagen oder dem Kontrollsubstrat Poly-L-Lysin ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) eine Stunde bei Raumtemperatur beschichtet. Als weitere Kontrolle wurden unbeschichtete Platten verwendet.

Behandlung	Dosis	Pinch-1 <sup>fl/fl</sup>	Pinch-1 <sup>-/-</sup>	ILK <sup>fl/fl</sup>	ILK <sup>-/-</sup>	Pinch-1 <sup>rekon</sup>
keine		500	500	500	500	500
IR	2	500	500	500	500	500
IR	4	1000	1000	1000	1000	1000
IR	6	3000	5000	3000	3000	3000
Cisplatin	0,1	500	500	500	500	
Cisplatin	1	1000	1000	1000	1000	
Cisplatin	10	3000	3000	3000	3000	
Mitomycin-C	0,1	500	500			
Mitomycin-C	1	1000	1000			
Mitomycin-C	10	3000	5000			

**Tabelle 4.1:** Beim Koloniebildungsassay verwendete Zellzahlen (Zellen pro Vertiefung) für Bestrahlung (IR [Gy]), Cisplatinbehandlung [ $\mu$ M] und Mitomycin-C Behandlung [ $\mu$ M]

#### 4.3.1.1 Bestrahlung in Adhäsion

Für die Versuche wurden subkonfluent wachsende Zellen abtrypsiniert. Je nach Bedingung wurden verschiedene Zellzahlen ausgesät und für 24 Stunden kultiviert (siehe Tab. 4.1). Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit 2 – 6 Gy. Die Platten wurden bei 37 °C, 10% CO<sub>2</sub> 8 Tage belassen.

#### 4.3.1.2 Bestrahlung in Suspension

Es wurden 10 ml einer Zellsuspension mit  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml angesetzt und in eine mit Agar vorbereitete Schale gegeben (siehe 4.7). Nach einer Zeitdauer von 0-300 Minuten erfolgte die Bestrahlung mit 2 – 6 Gy, danach wurden die Zellen mit den in Tabelle 4.1 angegebenen Zellzahlen in 6-er Platten ausgesät. Hierzu wurde die Suspension erst durchmischt und um den Faktor 5 verdünnt.

#### 4.3.1.3 Bestrahlung in Suspension unter Serumentzug

Die Zellen wurden trypsiniert und anschließend mit 1×PBS gewaschen, zentrifugiert und in Medium ohne FKS resuspendiert. Es wurden daraus 10 ml einer Zellsuspension mit  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml angesetzt und in eine mit Agar vorbereitete Schale gegeben (siehe 4.1.4). Nach einer Stunde erfolgte die Bestrahlung mit 2 – 6 Gy, danach wurden die Zellen in mit Fibronectin beschichtete 6-er Platten ausgesät (1000 Zellen je Vertiefung). Bei einem Teil der Zellen wurde sofort nach dem Aussäen serumhaltiges Medium zugegeben. Bei

einem anderen Teil wurde serumfreies Medium verwendet, hier wurde nach 6 Stunden 10% FKS zugegeben.

### 4.3.1.4 Behandlung mit Zytostatika

Die Zellen wurden mit den in Tabelle 4.1 angegebenen Zellzahlen auf die 6-er Platten ausgebracht und in DMEM (+1%NEA +10%FKS) kultiviert. Nach 24 oder 48 Stunden wurde das Medium abgenommen und Medium mit Cisplatin (Konzentrationen 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) oder Mitomycin-C (Konzentrationen 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) zugegeben und für eine Stunde belassen. Anschließend wurde das Cisplatin enthaltende Medium durch Spülen mit 2 ml Medium gründlich entfernt und wieder 2 ml Standardmedium zugegeben. Der Koloniebildungsassay wurde 8 Tage nach Ansatz fixiert.

### 4.3.2 Fixierung

Nach Entfernung des Mediums wurden die Vertiefungen mit 2 ml 1×PBS gespült. 1 ml von 4%-iger Formaldehydlösung wurde pro Vertiefung zugegeben und für 30 Minuten belassen. Anschließend wurden die Platten für 30 Minuten mit 1 ml 70% Ethanol behandelt, mit Wasser gespült und die Zellen mit Coomassie gefärbt.

### 4.3.3 Auswertung

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

## 4.4 Proliferationsbestimmung mittels Zellzählung

### 4.4.1 Ansatz

Hierfür wurden 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit Fibronectin für eine Stunde bei Raumtemperatur beschichtet. Nach Abtrypsinierung wurden  $4 \cdot 10^4$  Zellen je Kulturflasche ausgesät. Die Kultivierung erfolgte über 8 Tage in DMEM (+1% NEA +10 % FKS) bei 10 % CO<sub>2</sub>.

#### 4.4.2 Zählung

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

#### 4.4.3 Auswertung

Die Zellzahlen wurden relativ zur jeweiligen Kontrolle ermittelt und als Mittelwert aus drei Experimenten angegeben. Zur graphischen Darstellung diente Sigma-Plot.

### 4.5 SDS-Elektrophorese und Western Blot

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

#### 4.5.1 Versuchsabläufe

##### 4.5.1.1 Gesamtzellysat nach 24 h Adhäsion

Es wurden Petrischalen mit Fibronectin beschichtet. Ein Teil der Zellen wurde auf diese Petrischalen ausgesät, andere Zellen wurden auf unbeschichtete Petrischalen ausgebracht. Die Zellzahl wurde so gewählt, dass nach 24 h eine Konfluenz von 70-90% erreicht wurde.

### 4.5.1.2 Gesamtzellysat nach 1 h Suspension

Die Zellen wurden in einer 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche angesetzt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen trypsiniert und anschließend direkt in eine mit Agar vorbereitete Petrischale gegeben (Gesamtvolumen 10 ml) oder mit Medium ohne Serumzusatz gewaschen und ohne Serum in eine solche Petrischale überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C eine Stunde in Suspension belassen, anschließend wurde das Gesamtzellysat hergestellt.

### 4.5.2 Herstellung der Gesamtzellysate

**Zellen in Adhäsion** Vor der Lyse wurden die Zellkulturschalen auf 4 °C gekühlt, das Medium abgenommen und zweimal mit 1×PBS gespült. Dann wurden 200 µl Lysepuffer zugegeben und mittels eines Zellschabers die Zellen abgeschabt. Das Lysat wurde in ein Probenröhrchen überführt. Nach 15 Minuten wurde das Lysat fünfmal durch eine 25-Gauge Nadel passiert. Nach weiteren 15 Minuten wurde mit 13000 r/min 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Probenröhrchen überführt. Falls nicht gleich verwendet, wurde das Lysat bei –130 °C gelagert.

**Zellen in Suspension** Die Suspension wurde durchmischt und in ein Probenröhrchen überführt. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Probe auf 4 °C gekühlt. Nach dem Zentrifugieren für 5 Minuten mit 800 rpm wurde das Medium abgenommen, 5 ml 1×PBS zugegeben und nochmals mit 800 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 50 – 150 µl Lysepuffer aufgenommen. Nach 15 Minuten auf Eis wurde das Lysat 5× durch eine 25-Gauge Nadel passiert. Nach weiteren 15 Minuten wurde mit 13000 r/min 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfröhrchen überführt. Falls nicht gleich verwendet, wurde das Lysat bei –130 °C gelagert.

### 4.5.3 Proteinbestimmung

Um die Expression einzelner Proteine in verschiedenen Lysaten miteinander vergleichen zu können, wurde von jeder Probe die gleiche Menge an Gesamtprotein verwendet. Hierzu wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt<sup>1</sup>.

Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA (2 mg/ml) verwendet, die in vier Schritten jeweils um den Faktor 2 mit RIPA-Lysepuffer (ohne Zusätze) verdünnt wurde.

---

<sup>1</sup>Dieser Assay basiert auf der Reduktion von  $Cu^{2+}$  zu  $Cu^+$ , das in einem weiteren Schritt mit BCA (Bicinchoninsäure) einen blauvioletten Komplex bildet (Biuret-Reaktion [145])

Als Leerwert diente unverdünnter RIPA-Lysepuffer. Von allen Werten wurden je zweimal 10 µl auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend mit 200 µl BCA-Reagenz vermischt.

Die Absorption wurde mittels eines ELISA-Spektrometers bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen.

### 4.5.3.1 Vorbereitung der Proben

Es wurden anhand der Proteinbestimmung 20 µg Protein mit Ladepuffer ad 15 µl vermischt. Die Proben wurden 5 Minuten gekocht und mit 4000 rpm herunterzentrifugiert.

### 4.5.3.2 Elektrophorese

Die Proben wurden der Reihe nach auf das entsprechende Gel aufgetragen, wobei ein Slot für den Marker blieb. Nachdem das befüllte Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt war, wurde Laufpuffer aufgefüllt und die Elektrophorese gestartet (Einstellung: 5 mA pro Gel,  $U_{max} = 350$  V bei 10°C).

### 4.5.4 Western Blotting

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

### 4.5.5 Detektion

Die Membran wurde für 5 Minuten in 1×PBS und anschließend für weitere 60 Minuten in 5% Milchpulver 1×PBS geblockt<sup>2</sup>. Der gemäß Kapitel 3.5 verdünnte Primärantikörper inkubierte auf dem Schwenktisch für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Danach wurde die Membran dreimal 5 Minuten mit PBST gewaschen. Nach

---

<sup>2</sup>Durch diese Lösung werden unspezifische Bindungsstellen der Membran besetzt und so eine Abschwächung des Hintergrundsignals erreicht

Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur, wurde die Membran erneut sechsmal 5 Minuten mit PBST gewaschen. Zur Detektion wurde gleichmäßig ECL aufgetragen und die entstehende Lumineszenz auf Film festgehalten.

### 4.5.6 Auswertung

Eine densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageQuant, die Filme wurden hierzu mit einem Scanner eingelesen. Es erfolgte die Bestimmung der Schwärzung<sup>3</sup> (oder «Volumen») der Banden des zu untersuchenden Proteins und eines «housekeeping»-Proteins, das einen relativ konstanten Anteil am Gesamtprotein einer Zelle hat. Hierzu verwendeten wir  $\beta_1$ -Aktin. Die Expression des untersuchten Proteins wurde dann als Quotient

$$Expression_{Protein} = \frac{Volumen_{Protein}}{Volumen_{\beta_1-Aktin}}$$

berechnet.

## 4.6 Dotblot

Um die Wirksamkeit der Beschichtung mit Fibronectin zu untersuchen wurde ein Dotblot angefertigt. Dazu wurde eine Petrischale mit Fibronectin beschichtet, das Beschichtungsmedium abgenommen, einmal mit 1×PBS gespült und mit 300  $\mu$ l RIPA-Puffer und einem Plastikschaber die Beschichtung abgeschabt. Mit dem vorher abgenommenen Beschichtungsmedium wurde wiederum eine Petrischale beschichtet und ebenso verfahren. Dies wurde nochmals wiederholt. Mit den so gewonnenen Proben wurde ein Dotblot durchgeführt. Hierzu wurde die Probe direkt auf eine Nitrozellulosemembran aufgeträufelt. Nach dem Trocknen der Membran wurde wie in 4.5.5 beschrieben mittels Antikörpern gegen Fibronectin eine Detektion durchgeführt.

---

<sup>3</sup>Hierzu wurde mit ImageQuant das «Volumen» der Banden bestimmt. Volumen bedeutet hier der Raum unterhalb einer gedachten Fläche, die entsteht, wenn man sich die gescannten Schwarzwerte als z-Werte über einem zweidimensionalen Koordinatensystem vorstellt. Vereinfacht stellt dies die «Gesamtschwärze» der Bande dar.

## 4.7 Immunfluoreszenz

### 4.7.1 Ansatz

#### 4.7.1.1 Ansatz

Falls erforderlich wurden die Objektträger mit 1 ml Fibronectinlösung (4 mg/ml in Medium) für eine Stunde beschichtet. Es wurden die Zellen auf Objektträgern mit Kulturkammer angesetzt.

**Pinch-1 Darstellung** Die Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen wurden nach 24 Stunden Kultivierung auf dem Objektträger fixiert.

**Adhäsionsassay** Die Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen wurden nach einer Stunde in Suspension unter Serumeinfluss auf mit Fibronectin beschichtete Objektträger aufgebracht und nach jeweils nach 5 Minuten, 15 Minuten, 60 Minuten und 6 Stunden fixiert.

#### 4.7.1.2 Fixierung

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

#### 4.7.1.3 Färbung

Nach einer Blocking-Zeit von 30 Minuten in BSA-Lösung (2 mg/ml in Aqua dest.) schloß sich eine einstündige Inkubation des Primärantikörpers (Verdünnung siehe 3.5) an. Die Zellen wurden danach viermal für 5 Minuten mit NaCl gewaschen und mit dem Sekundärantikörper für eine weitere Stunde inkubiert. Je nach Färbung wurde auch FITC (1:100) oder TRITC (1:2000) zugegeben. Zur Anfärbung des Zellkerns diente DAPI (1:100) in BSA. Nachdem die Zellen erneut sechsmal mit NaCl gespült worden waren, wurde die Kammer entfernt und die gefärbten Zellen mit Vectashield und Deckgläschen eingedeckt.

#### 4.7.1.4 Aufnahme der Bilder

Zur Visualisierung der Immunfluoreszenzen diente ein Laserscanningmikroskop. Es wurden 3 Bilder bei verschiedenen Wellenlängen aufgenommen und mittels TCS Software

kombiniert.

### 4.7.2 $\gamma$ H2AX-Färbung

Ein maßgeblicher Faktor für die zytotoxische Wirkung von ionisierenden Strahlen ist die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen. Ein solcher Doppelstrangbruch (Abk. DSB) kann von der Zelle repariert werden. Gelingt dies nicht, so dieses Ereignis letal für die Zelle.

ATM und DNA-Proteinkinasen sind Proteine, die an der Erkennung von DSB beteiligt sind. Unter anderem phosphorylieren sie bestimmte Histone (H2AX) in der Umgebung des Bruchs, was zur Rekrutierung weiterer DNA-Reparaturmoleküle führt. 53BP1 wird ebenfalls phosphoryliert und zu Doppelstrangbrüchen relokalisiert [91, S. 36487]. Bei der Immunfluoreszenzfärbung lassen sich diese Proteine in ihrer phosphorylierten Form darstellen. Es zeigen sich punktförmige Anhäufungen, auch Foci genannt, die jeweils einem Doppelstrangbruch entsprechen.

Es wurde untersucht, ob Unterschiede bei der Reparatur von DSB in den Zelllinien Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> vorliegen.

#### 4.7.2.1 Ansatz

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen ausgesät, parallel wurde eine Kontrolle auf Chamberslides ausgebracht (Pinch-1<sup>fl/fl</sup>  $6 \cdot 10^4$ , Pinch-1<sup>-/-</sup>  $8 \cdot 10^4$  Zellen pro Kammer). Nach 24 Stunden wurden die Zellen trypsiniert und mit oder ohne FCS-Zusatz in mit Agar vorbereitete Petrischalen gebracht

Nach einer Stunde Suspension wurden ein Teil der Zellen mittels Zytozentrifugation auf Objektträger gebracht. Ein Teil der Zellen wurde mit 4 Gy in Suspension bestrahlt und auf Chamberslides ausgesät (Zellzahlen Pinch-1<sup>fl/fl</sup>:  $1,2 \cdot 10^5$  Zellen pro Kammer, Pinch-1<sup>-/-</sup>:  $1,6 \cdot 10^4$  Zellen pro Kammer). Nach 6 Stunden wurde den serumfrei kultivierten Zellen FCS zugegeben (10% FCS, nur 24h und 48h Werte). Nach 6,24 und 48 Stunden wurden die Zellen fixiert.

#### 4.7.2.2 Färbung

Die Zellen wurden 5 min mit 1×PBS 1% Formaldehyd fixiert, mit PBS/Glycin gewaschen. Es wurde 10 min mit 0,25% Triton X-100 in 1×PBS extrahiert (bei 0 °C) und mit PBGT gewaschen. Der Primärantikörper wurde für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Der Sekundärantikörper wurde in PBGT verdünnt. Nach 45 Minuten Inkubation wurde mit PBGT gewaschen. Nach einer weiteren Fixierung mit 1×PBS 1%Formaldehyd wurde mit PBS/Glycin gewaschen. Auf die Präparate wurden DAPI-Vectashield gegeben und ein Deckglas aufgebracht.

### 4.8 Bestimmung der Apoptose

4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) bindet stochiometrisch an DNA. Bei Apoptose zeigt sich hier im UV-Licht (365 nm) das charakteristische Bild des zerfallenden Zellkerns.

#### 4.8.1 Fixierung

Die Fixierung wurde nach Trypsinierung und Zentrifugation der Zellen mit 70% Ethanol (−20 °C) durchgeführt.

#### 4.8.2 Präparation

Es wurden 50 – 150 µl dieser Suspension mittels der Zytocentrifuge als Einzelzellsuspension auf Objektträger aufzentrifugiert. DAPI-Lösung (1:100) wurde aufgeträufelt. Nach Trocknung wurde Einbettflüssigkeit und ein Deckglas aufgebracht. Die Präparate wurden unter 365 nm UV-Licht im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

### 4.9 Statistik

Für die Bestimmung der Mittelwerte und Standardabweichungen wurde Microsoft Excel verwendet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels ANOVA. Für die grafische Darstellung wurde die SigmaPlot verwendet.

#### 4.9.1 Lineare Korrelation

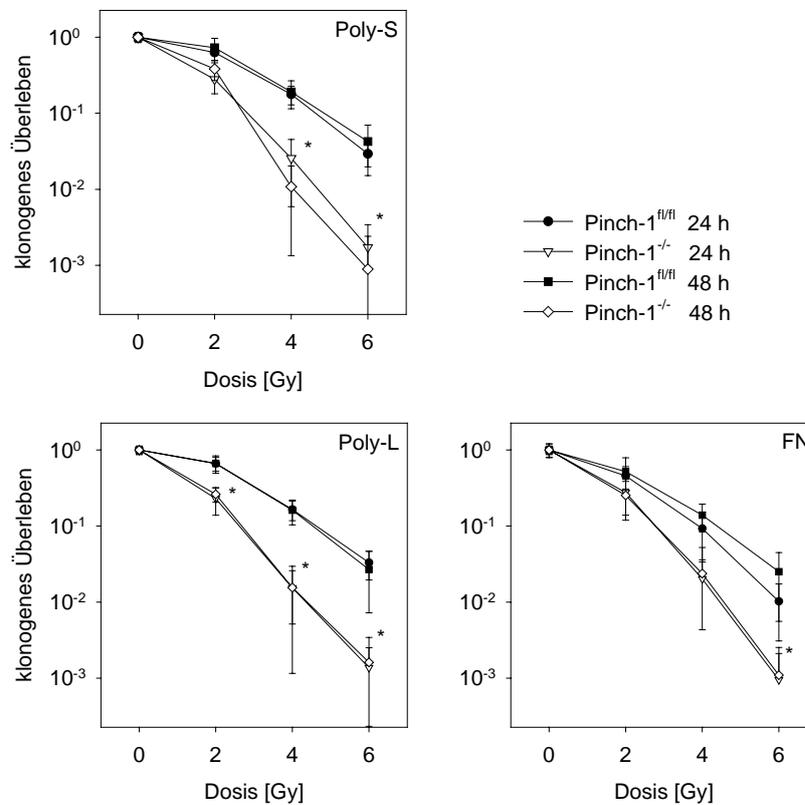
Zur Bestimmung der Korrelation zwischen Expressionsdaten der in 3.1 aufgelisteten Zelllinien wurde die Daten von jeweils zwei Proteinen verglichen. Es wurde ein Diagramm erstellt, in dem jede Zelllinie als Punkt (bzw. Symbol) repräsentiert war, wobei die Abszisse der relativen Expression des einen Proteins und die Ordinate der relativen Expression des anderen Proteins entsprach. Somit entsteht eine Punktwolke, durch die eine Regressionsgerade gelegt wurde (Formel der Regressionsgeraden:  $y = mx + c$ ).

Der Korrelationskoeffizient dieser Regression stellt ein Maß für den Zusammenhang der beiden Merkmale dar.

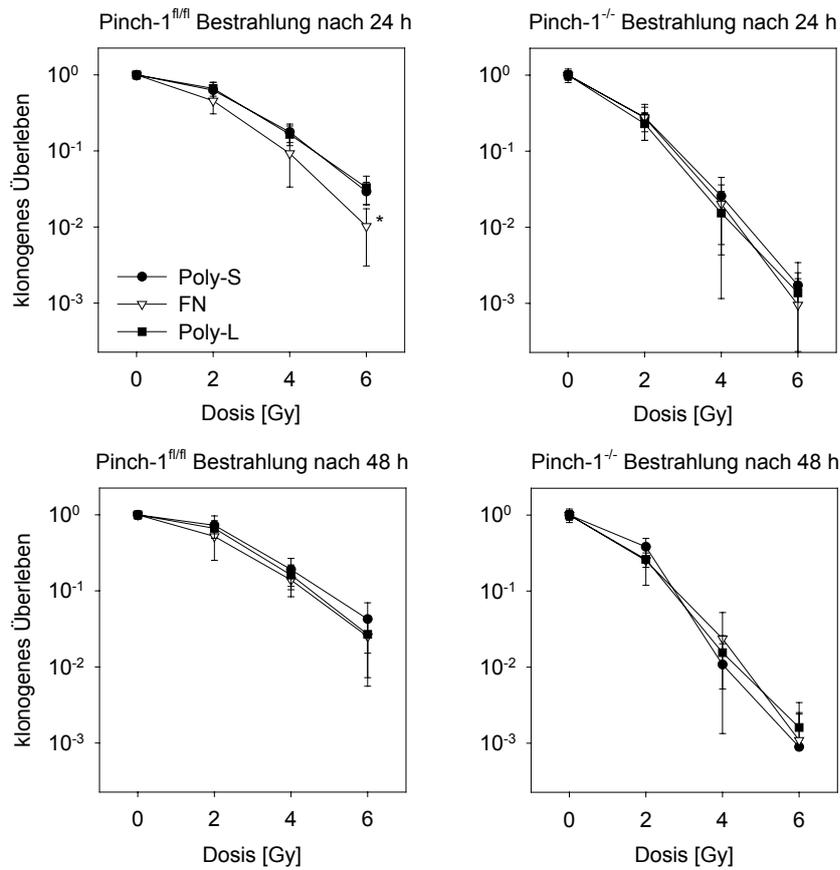
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Koloniebildungsassay

#### 5.1.1 Pinch-1 Zelllinie, Bestrahlung 0-6 Gy in Adhäsion



**Abbildung 5.1:** Die Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zelllinien wurden nach 24 bzw. 48 Stunden Adhäsion auf den Substraten Polystyrol (Poly-S), Poly-L-Lysin (Poly-L) und Fibronektin (FN) bestrahlt. Auf allen drei Substraten zeigt sich ein signifikant vermindertes klonogenes Überleben der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen im Vergleich zu Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen ( $p < 0,02$ ). Der Zeitpunkt der Bestrahlung (24 oder 48 h) hat keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Zellen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei der statistischen Auswertung wurden die Überlebensfraktionen der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen verglichen. \* $p < 0,02$



**Abbildung 5.2:** Das klonogene Zellüberleben von bestrahlten Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen wurde nach 24 bzw. 48 Stunden Adhäsion bestimmt. Aufgetragen ist das Zellüberleben jeweils einer Zelllinie auf den Substraten Polystyrol (Poly-S), Poly-L-Lysin (Poly-L) und Fibronektin (FN). Bei den Substraten Poly-S und Poly-L zeigen sich keine signifikanten Unterschiede, während bei FN ein Trend zu einem verminderten Überleben der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen sichtbar ist. Bei einer Dosis von 6 Gy ist hier ein signifikanter Unterschied festzustellen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei der statistischen Auswertung wurde ein Vergleich der Überlebensfraktionen der Zellen auf den drei untersuchten Substraten durchgeführt. \* $p < 0,05$

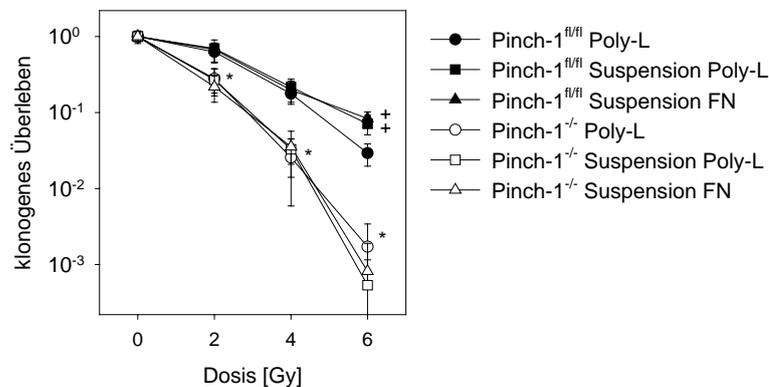
Die Bestimmung des klonogenen Zellüberlebens der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen nach Bestrahlung erfolgte wie in 4.3.1.1 beschrieben. Die Zellen wurden nach 24 oder 48 Stunden in Adhärenz bestrahlt. Im Folgenden soll der Einfluss von Bestrahlungszeitpunkt und Substrat auf das zelluläre Überleben der zwei Zelllinien untersucht werden.

Abbildung 5.1 zeigt für die Pinch-1<sup>-/-</sup> Zelllinie sowohl auf Polystyrol und dem unspezifischen Kontrollpeptid Poly-L-Lysin als auch auf dem Substrat Fibronektin ein signifikant schlechteres Überleben als für die Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen ( $p < 0,02$ ). Bei Bestrahlung 24 oder 48 Stunden nach Adhäsion zeigen sich dagegen keine signifikanten Unterschiede innerhalb

einer Zelllinie.

Zur besseren Vergleichbarkeit ist das Überleben der Zellen nach Bestrahlung auf verschiedenen Substraten in Abbildung 5.2 jeweils für eine Zelllinie je Diagramm aufgetragen. Der Einfluss des Substrats auf das Überleben ist hier gering. Die Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen zeigen auf dem Substrat Fibronectin bei Bestrahlung nach 24 Stunden ein tendenziell schlechteres Überleben als die Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen. Bei einer Dosis von 6 Gy ist dieser Unterschied signifikant ( $p < 0,05$ ), während bei Bestrahlung nach 48 Stunden kein Unterschied mehr erkennbar ist.

### 5.1.2 Pinch-1 Zelllinie, Bestrahlung 0-6 Gy in Suspension

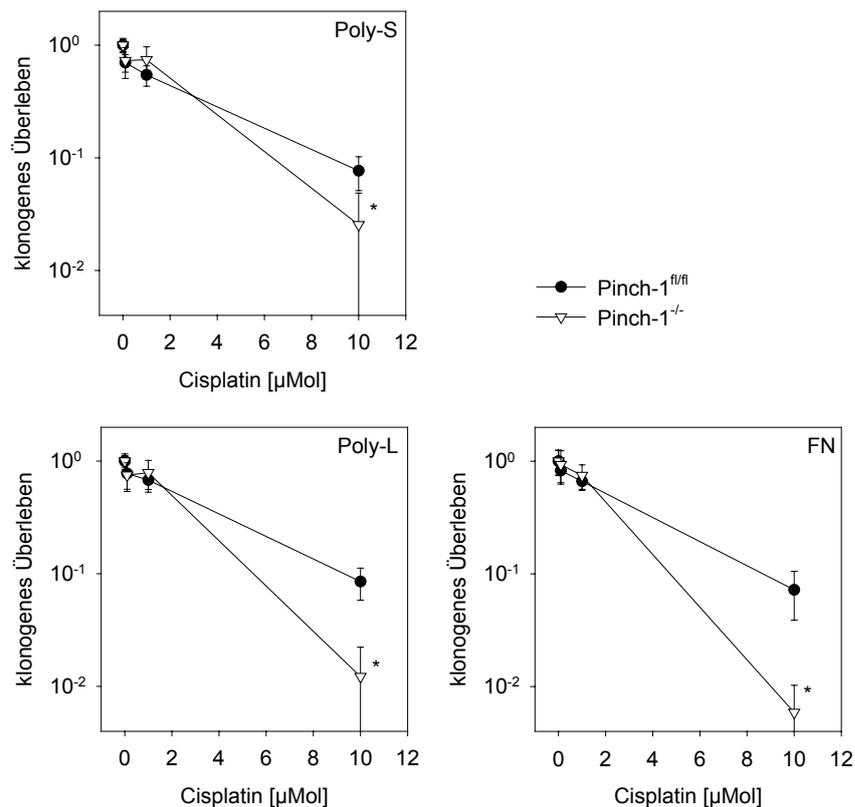


**Abbildung 5.3:** Die Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen wurden nach 1 h in Suspension bestrahlt und anschließend auf Fibronectin (FN) oder Poly-L-Lysin (Poly-L) ausgesät. Zum Vergleich ist eine Überlebenskurve für die Bestrahlung in Adhäsion auf Poly-L aufgetragen (●○). Es zeigt sich unter allen Bedingungen ein signifikant schlechteres Zellüberleben der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen im Vergleich zu Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen (\* $p < 0,01$ ). Für die Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen ergibt sich ein geringfügig besseres Überleben bei Bestrahlung mit 6 Gy in Suspension im Vergleich zu Adhäsion (+ $p < 0,01$ ). Dieser Unterschied ist bei Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen nicht nachweisbar. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei der statistischen Auswertung wurden die Überlebensfraktionen der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen miteinander verglichen (\*). Zusätzlich wurde ein Vergleich des Zellüberlebens einer Zelllinie auf den verschiedenen Substraten durchgeführt (+). \*/+  $p < 0,01$

Nach einer Stunde in Suspension wurden die Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen bestrahlt und wie in 4.3.1.2 beschrieben auf den Substraten Poly-L-Lysin oder Fibronectin ausgebracht. Abbildung 5.3 zeigt die resultierenden Dosis-Effekt-Kurven. Bis zu einer Dosis von 4 Gy ist das klonogene Überleben unabhängig von Adhäsions- bzw. Suspensionszustand oder Substrat. Bei 6 Gy ergibt sich für in Suspension bestrahlte Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen ein signifi-

signifikant verbessertes Überleben im Vergleich zu in Adhäsion bestrahlten Zellen ( $+p < 0,01$ ). Wie schon bei den Untersuchungen des Zellüberlebens nach Bestrahlung in Adhäsion zeigte sich auch bei Bestrahlung in Suspension ein deutlich geringeres Überleben der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen im Vergleich zur Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zelllinie (\* $p < 0,01$ ).

### 5.1.3 Pinch-1 Zelllinie, Behandlung mit Cisplatin



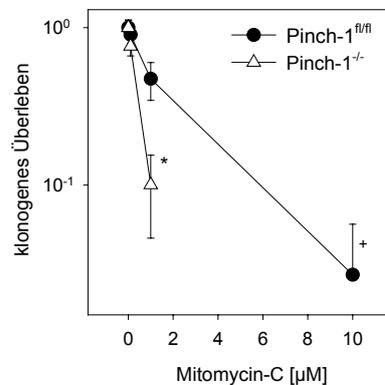
**Abbildung 5.4:** Die Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen wurden für 24 h auf Polystyrol (Poly-S), Fibronectin (FN) und Poly-L-Lysin (Poly-L) kultiviert und anschließend für 1 h mit Cisplatin behandelt. Die resultierenden Überlebenskurven zeigen insbesondere auf Fibronectin und Poly-L-Lysin bei einer Cisplatin-Konzentration von 10 µM ein signifikant schlechteres Überleben der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen ( $p < 0,05$ ). Bei den Konzentrationen 0,1 µM und 1 µM ergibt sich kein signifikanter Effekt des Zytostatikums auf das Zellüberleben. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei der statistischen Auswertung wurden die Überlebensfraktionen der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen verglichen. \* $p < 0,05$

In Abbildung 5.4 sind Dosiseffektcurven adhärenter Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen unter Exposition mit dem Zytostatikum Cisplatin zu sehen (siehe 4.3.1.4), wobei die

Substrate Polystyrol, Poly-L-Lysin und Fibronectin verwendet wurden.

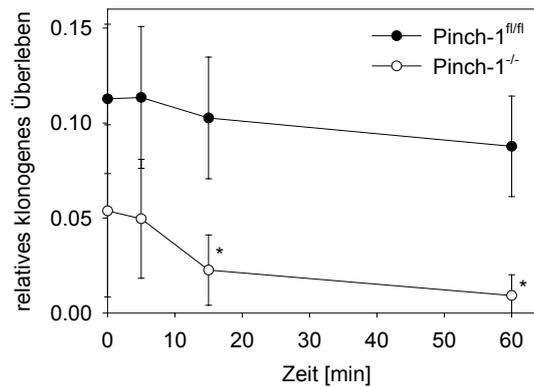
Während bei den Konzentrationen 0,1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  kein signifikanter Effekt zu erkennen ist, zeigt sich bei einer Cisplatinkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  ein im Vergleich zu den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen deutlich reduziertes Überleben der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen ( $p < 0,05$ ). Bezüglich der verschiedenen Substrate ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

#### 5.1.4 Pinch-1 Zelllinie, Behandlung mit Mitomycin-C



**Abbildung 5.5:** Pinch-1<sup>-/-</sup> und Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen wurden nach 24 h Kultivierung in Adhäsion für 1 h mit Mitomycin-C behandelt. Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  ist ein signifikant schlechteres Überleben der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen zu erkennen ( $p < 0,02$ ). Bei 10  $\mu\text{M}$  Mitomycin-C sind bei den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen im Gegensatz zu den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen keine Kolonien mehr nachweisbar, somit ist dieser Wert in der logarithmischen Auftragung nicht darstellbar (+). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei der statistischen Auswertung wurden die Überlebensfraktionen der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen verglichen. \* $p < 0,02$

In Abbildung 5.5 ist das klonogene Überleben der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen nach Behandlung mit Mitomycin-C dargestellt (siehe 4.3.1.4). Während bei einer Mitomycinkonzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  kein signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien festzustellen ist, zeigt sich bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Mitomycin-C ein signifikant schlechteres Überleben der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen im Vergleich zu den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen ( $p < 0,02$ ). Bei 10  $\mu\text{M}$  Mitomycin-C sind bei der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zelllinie im Gegensatz zu den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen keine Kolonien mehr nachweisbar, somit ist bei logarithmischer Auftragung kein Wert darstellbar.



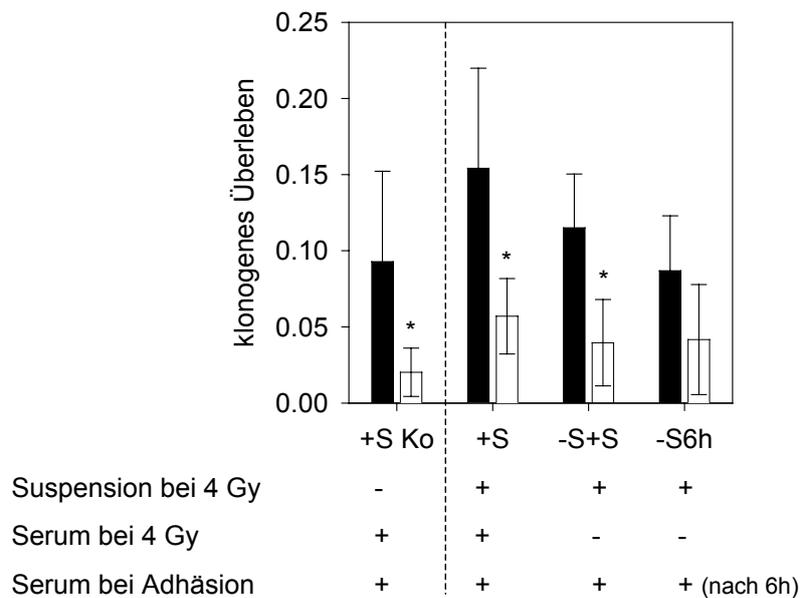
**Abbildung 5.6:** Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen wurden nach 1 h in Suspension mit 4 Gy bestrahlt und nach verschiedenen Zeitintervallen auf Fibronectin ausgesät. Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen weisen eine signifikant höhere Strahlensensibilität auf als Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen ( $p < 0,05$ ). Die Zeit in Suspension nach Bestrahlung hat einen geringen, nicht signifikanten Einfluss auf das Zellüberleben ( $p=0,066$ ). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei der statistischen Auswertung wurden die Überlebensfraktionen der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen verglichen. \* $p < 0,05$

### 5.1.5 Pinch-1 Zelllinie, Bestrahlung 0-6 Gy in Suspension, Zeitwerte

Um zu untersuchen, ob Adhäsionsvorgänge nach erfolgter Bestrahlung das Zellüberleben modulieren, wurden Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen nach einer Stunde Suspension mit 4 Gy bestrahlt und nach verschiedenen Zeitintervallen auf Fibronectin ausgesät. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.6 dargestellt. Die Zeit nach Bestrahlung, nach der die Zellen aus der Suspension auf ein Substrat plattiert wurden, hat keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben. Bei Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen zeigt sich ein nicht signifikanter Trend zu schlechterem Überleben bei einer Verweildauer von einer Stunde in Suspension nach Bestrahlung.

### 5.1.6 Pinch-1 Zelllinie, Bestrahlung 0-6 Gy in Suspension unter Serumentzug

Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen wurde wie in 4.3.1.3 beschrieben in Abwesenheit von Serum in Suspension mit 4 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.7 dargestellt, wobei hier zum Vergleich auch das Zellüberleben in Adhäsion auf Fibronectin aufgetragen ist (+S Ko). Es ist ein signifikant besseres Überleben der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen in Suspension unter Serumeinfluss zu sehen (+S) ( $p < 0,05$ ). Bei Serumentzug unter Bestrahlung und Serumpräsenz bei der Ausplattierung (-S+S) ist das Überleben der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen

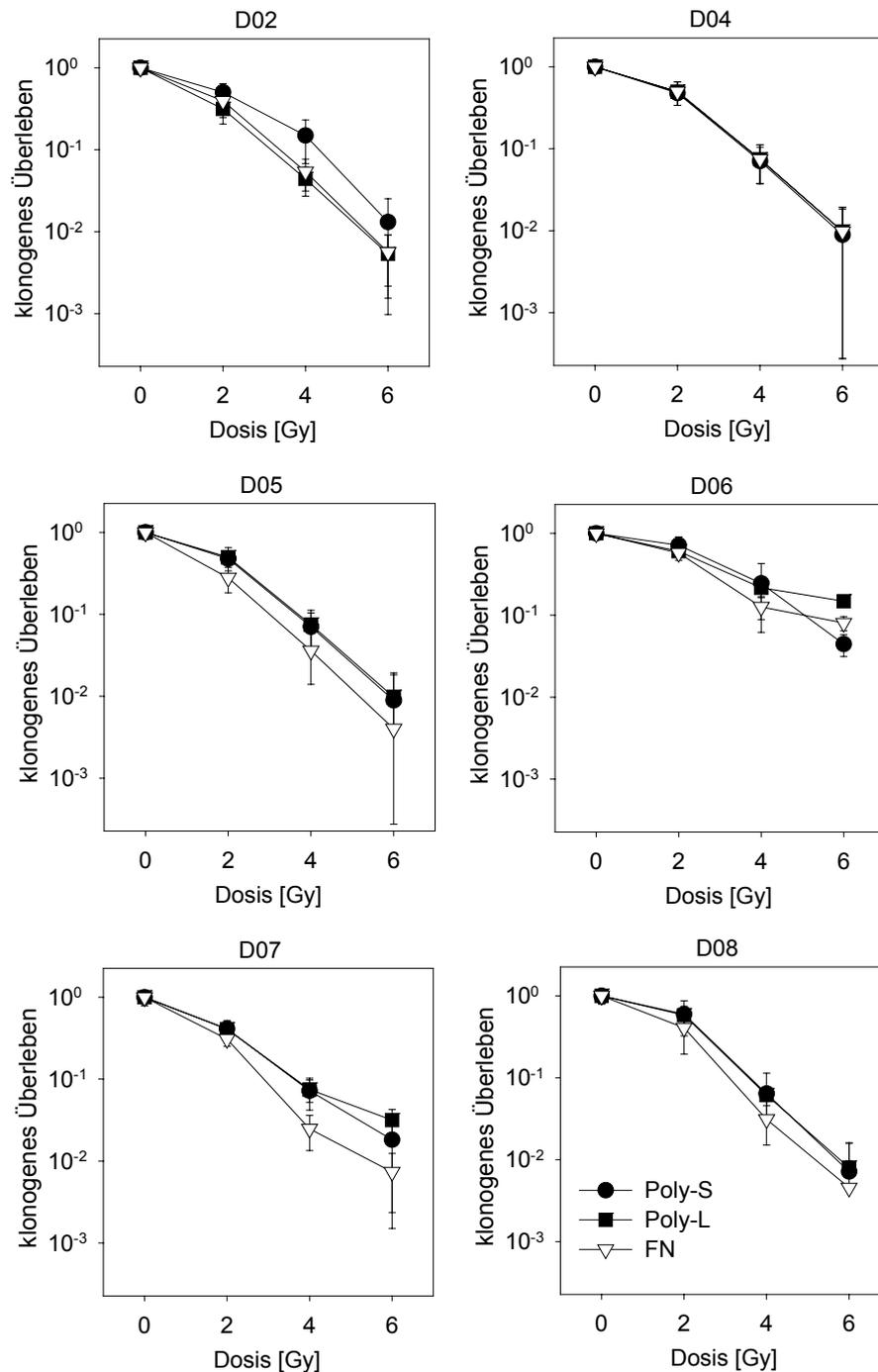


**Abbildung 5.7:** Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen wurden für 1 h in Suspension gehalten bevor die Bestrahlung mit 4 Gy erfolgte. Während der Suspension wurde einem Teil der Zellen das Serum entzogen, bei Adhäsion wurde entweder sofort (-S+S) oder erst nach 6 Stunden Serum zugegeben (-S6h). Es ist zu erkennen, dass das Überleben der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen abhängig von Suspension und Serumeinfluss ist, während bei den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen keine Unterschiede auszumachen sind. Bei den Bedingungen +S und -S+S bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien ( $p < 0,05$ ), während unter Serumentzug vor und nach Bestrahlung (-S6h) kein signifikanter Unterschied feststellbar ist. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei der statistischen Auswertung wurde jeweils die Überlebensfraktionen der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen verglichen (\*). \* $p < 0,05$

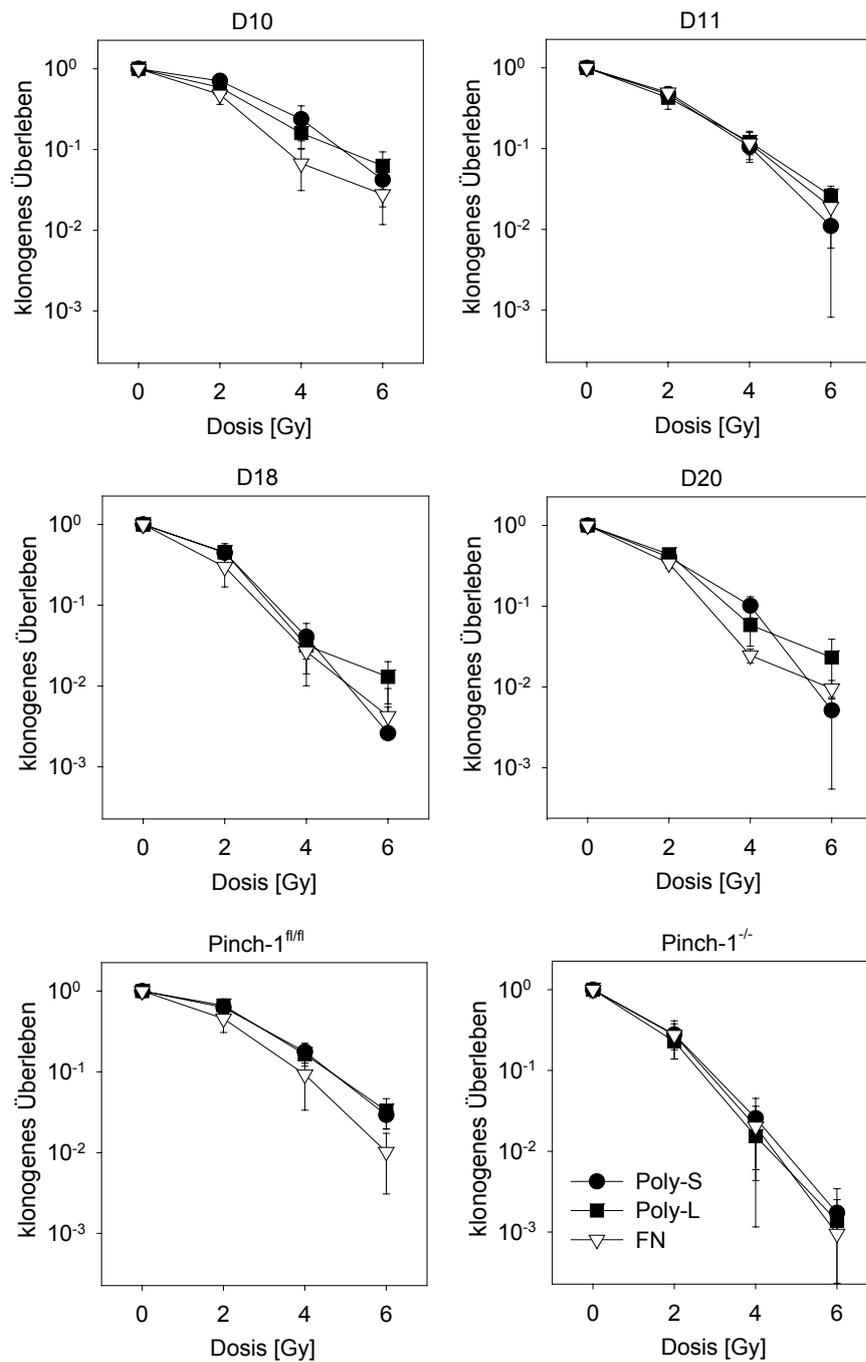
reduziert. Bei Serumentzug während der Suspension und den ersten 6 Stunden der Adhäsion (-S6h) nimmt das Überleben der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen weiter ab. Unter diesen Bedingungen besteht kein signifikanter Unterschied zu den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen mehr. Die Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen zeigen demgegenüber kaum Unterschiede im Überleben nach Bestrahlung unter den verschiedenen Bedingungen. Insbesondere der Serumentzug während und nach Bestrahlung führt bei den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen zu keiner Reduktion des klonogenen Zellüberlebens.

### 5.1.7 Pinch-1<sup>rekon</sup> Zelllinien, Bestrahlung 0-6 Gy in Adhäsion

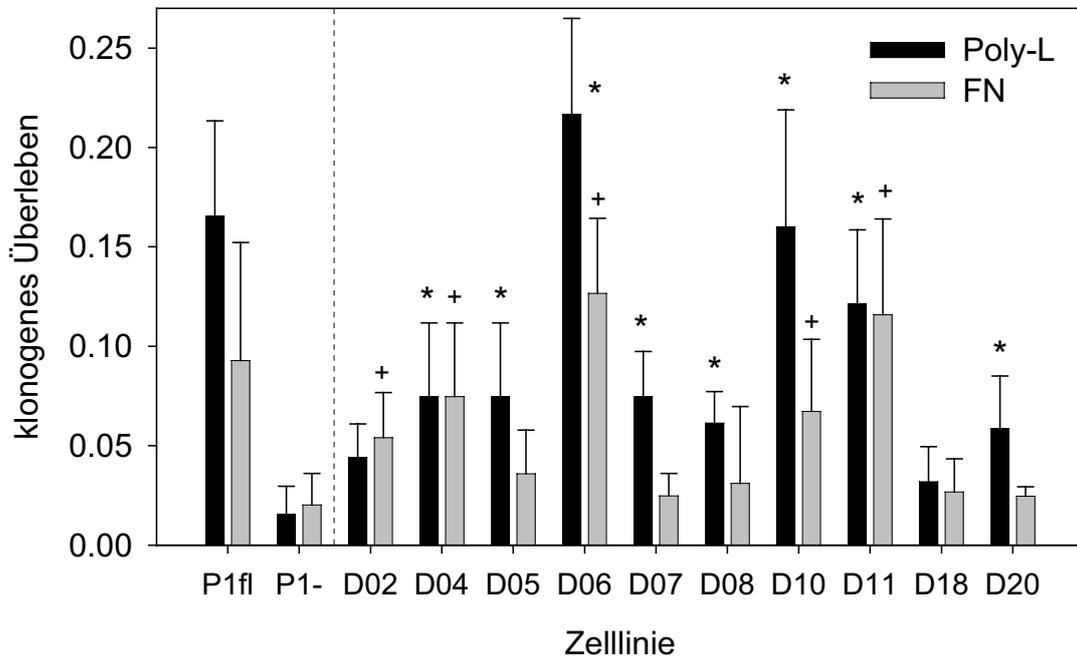
Die mittels eines Pinch-1 exprimierenden retroviralen Vektors stabil infizierten Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen [153] wurden nach 24 Stunden Adhäsion auf den Substraten Polystyrol, Poly-L-Lysin und Fibronectin bestrahlt (siehe 4.3.1.1). Die resultierenden Überlebenskurven in



**Abbildung 5.8:** Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen, in denen die Expression von Pinch-1 mittels stabiler retroviraler Infektion rekonstituiert wurde (Pinch-1<sup>rekon</sup>), wurden nach 24 h Adhäsion auf Fibronektin (FN), Polystyrol (Poly-S) oder Poly-L-Lysin (Poly-L) bestrahlt. Das klonogene Zellüberleben wurde bestimmt. Bezüglich der verschiedenen Substrate zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei der statistischen Auswertung wurde ein Vergleich der Überlebensfraktionen der Zellen auf den drei untersuchten Substraten durchgeführt.



**Abbildung 5.9:** Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen, in denen die Expression von Pinch-1 mittels retroviraler Infektion rekonstituiert wurde (Pinch-1<sup>rekon</sup>), wurden nach 24 h Adhäsion auf Fibronectin (FN), Polystyrol (Poly-S) oder Poly-L-Lysin (Poly-L) bestrahlt. Das klonogene Zellüberleben wurde bestimmt. Zum Vergleich sind nochmals die Daten der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zelllinien dargestellt. Bezüglich der verschiedenen Substrate zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei der statistischen Auswertung wurde ein Vergleich der Überlebensfraktionen der Zellen auf den drei untersuchten Substraten durchgeführt.

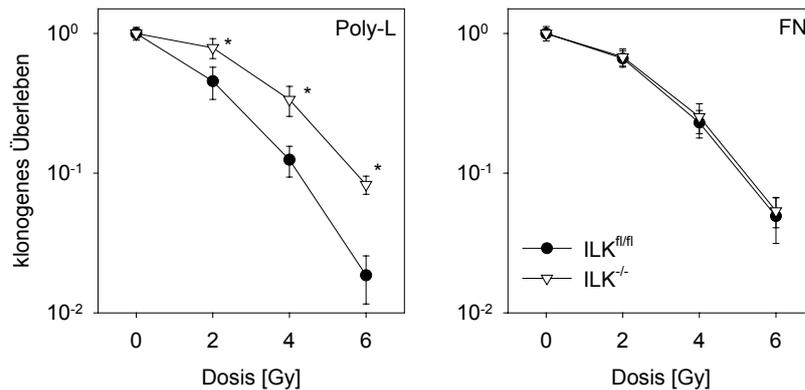


**Abbildung 5.10:** Das klonogene Zellüberleben verschiedener Klone von Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen, in denen die Expression von Pinch-1 mittels retroviraler Infektion wiederhergestellt, zeigt bei einer Dosis von 4 Gy deutliche Unterschiede. Die Klone D04, D05, D06, D07, D08, D10, D11 und D20 weisen bei Bestrahlung auf dem Substrat Poly-L-Lysin (Poly-L) einen signifikanten Unterschied zur Ursprungszelllinie Pinch-1<sup>-/-</sup> auf (\*). Die Klone D02, D04, D06, D10, D11 zeigen auf dem Substrat Fibronectin (FN) ein signifikant besseres Überleben als Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen (+). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei der statistischen Auswertung wurde ein Vergleich der Überlebensfraktionen der jeweiligen Zelllinie mit der Ursprungszelllinie Pinch-1<sup>-/-</sup> durchgeführt. Hierbei wurde unterschieden zwischen Überleben auf dem Substrat Poly-L (\*) und FN (+). \*/+ p < 0,02. Abkürzungen: P1fl: Pinch-1<sup>fl/fl</sup>, P1-Pinch-1<sup>-/-</sup>

Abbildung 5.8 und 5.9 zeigen, dass das im Vergleich zu den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen schlechtere Überleben der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen durch Wiederherstellung der Pinch-1 Expression in verschiedenem Ausmaß verbessert wird. In Abbildung 5.10 ist das Zellüberleben nach Bestrahlung mit 4 Gy aufgetragen. Hier zeigt sich, dass bei keinem der Klone das Überleben geringer ist als das der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen. Insbesondere die Klone D10 und D06 weisen ein stark verbessertes Überleben auf, dass auf dem Niveau der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen liegt (p < 0,02) (Abbildung 5.10). Bezüglich des Überlebens auf den verschiedenen Substraten

zeigen in den Abbildungen 5.8 und 5.9 nur geringe, nicht signifikante Unterschiede bei den Klonen.

### 5.1.8 ILK Zelllinien, Bestrahlung 0-6 Gy in Adhäsion

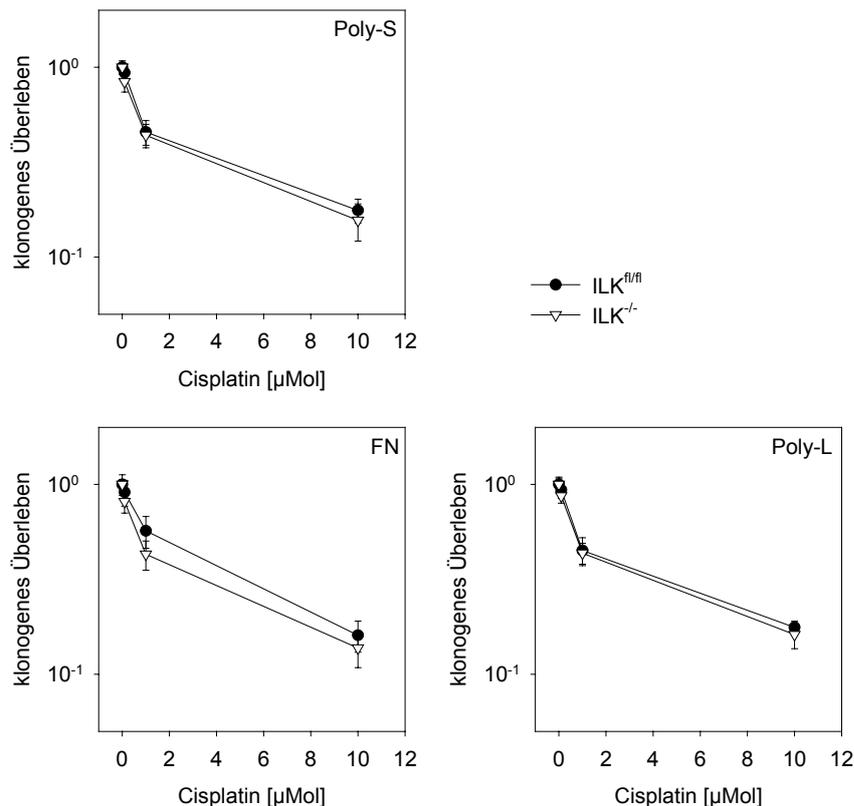


**Abbildung 5.11:** ILK<sup>fl/fl</sup> und ILK<sup>-/-</sup> Zellen wurden 24 h auf Poly-L-Lysin (Poly-L) und Fibronektin (FN) kultiviert und anschließend bestrahlt. Auf dem Substrat Poly-L zeigen die ILK<sup>-/-</sup> Zellen ein signifikant besseres Überleben als die ILK<sup>fl/fl</sup> Zellen ( $p < 0,02$ ). Im Gegensatz hierzu weisen beide Zelllinien auf dem Substrat FN ein sehr ähnliches Überleben auf. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei der statistischen Auswertung wurden die Überlebensfraktionen der ILK<sup>fl/fl</sup> und ILK<sup>-/-</sup> Zellen verglichen (\*). \* $p < 0,02$

Das klonogene Überleben von murinen ILK<sup>fl/fl</sup> und ILK defizienten Fibroblasten ILK<sup>-/-</sup> wurde auf Poly-L-Lysin und Fibronektin bei Bestrahlung nach 24 Stunden bestimmt. In Abbildung 5.11 zeigt sich auf Poly-L-Lysin ein signifikant schlechteres Zellüberleben der ILK<sup>fl/fl</sup> Zellen im Vergleich zu ILK<sup>-/-</sup> Zellen ( $p < 0,02$ ). Auf dem Substrat Fibronektin ist kein Unterschied im Überleben der beiden Zelllinien erkennbar. Hier ist im Vergleich zum Substrat Poly-L-Lysin das Überleben der ILK<sup>fl/fl</sup> Zellen verbessert.

### 5.1.9 ILK Zelllinien, Behandlung mit Cisplatin

Das klonogene Überleben von ILK<sup>fl/fl</sup> und ILK<sup>-/-</sup> Zellen wurde in adhärentem Zustand nach Behandlung mit dem Zytostatikum Cisplatin bestimmt (Abbildung 5.12). Als Substrat wurde Polystyrol, Poly-L-Lysin oder Fibronektin verwendet. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede im Überleben der untersuchten Zelllinien. Bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  Cisplatin zeigt sich nur eine geringe Reduktion des Zellüberlebens

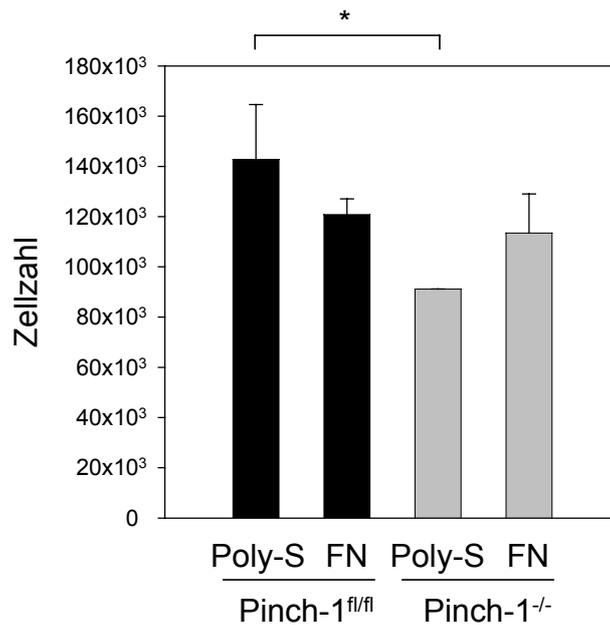


**Abbildung 5.12:** ILK<sup>fl/fl</sup> und ILK<sup>-/-</sup> Zellen wurden 24 h auf Polystyrol (Poly-S), Fibronektin (FN) und Poly-L-Lysin (Poly-L) kultiviert und anschließend für 1 h mit Cisplatin behandelt. Eine Konzentration von 0,1 μM Cisplatin zeigt keinen signifikanten Effekt, während höhere Konzentrationen zu einer Reduktion des Zellüberlebens führten. Die Überlebenskurven zeigen auf keinem der verwendeten Substrate signifikante Unterschiede zwischen ILK<sup>fl/fl</sup> und ILK<sup>-/-</sup> Zelllinien. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei der statistischen Auswertung wurden die Überlebensfraktionen der ILK<sup>fl/fl</sup> und ILK<sup>-/-</sup> Zellen verglichen.

beider Zelllinien gegenüber der Kontrolle. Bei einer Konzentration von 1 μM und 10 μM Cisplatin ist das Überleben beider Zelllinien in gleichem Maße reduziert. Bezüglich der Substrate zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Zellüberleben.

## 5.2 Proliferationsbestimmung mittels Zellzählung

Um den Einfluss von Pinch-1 auf die Proliferation der Zellen zu untersuchen, wurde eine definierte Zellzahl von Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen ausgesät und nach 8 Tagen Kultivierung eine Zellzählung durchgeführt (Abbildung 5.13). Bei der Proliferationsbe-



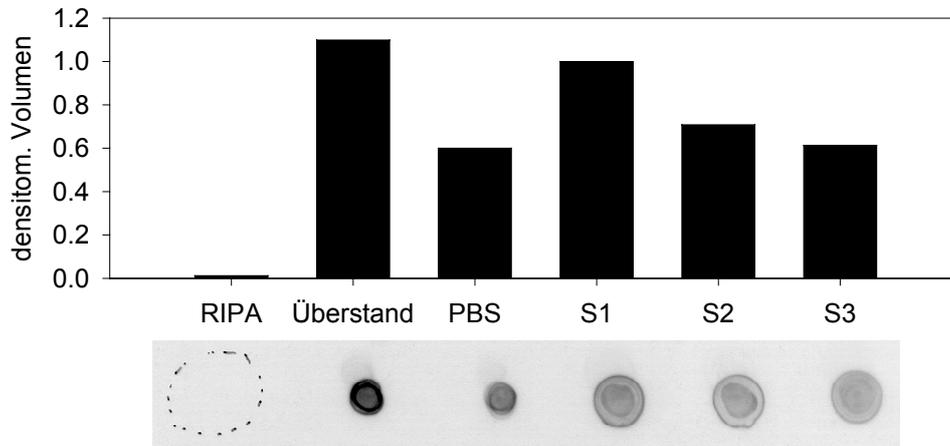
**Abbildung 5.13:** Die Proliferation von Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen wurde bestimmt. Die Zellen wurden auf den Substraten Polystyrol (Poly-S) oder Fibronectin (FN) ausgesät, über 8 Tage in Standardmedium kultiviert und anschließend gezählt. Hier zeigt sich eine leicht, aber signifikant reduzierte Proliferation der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen auf dem Substrat Polystyrol im Vergleich zu Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen ( $p < 0,05$ ). Interessanterweise sind auf dem Substrat Fibronectin keine signifikanten Unterschiede der Proliferation der beiden Zelllinien festzustellen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. \* $p < 0,05$

stimmung zeigt sich auf dem Substrat Polystyrol eine signifikant stärkere Proliferation der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen, während sich auf dem Substrat Fibronectin kein signifikanter Unterschied mehr zeigt ( $p < 0,05$ ).

## 5.3 Western-Blot

### 5.3.1 Dotblot zur Fibronectinbeschichtung

Wie in 4.6 beschrieben wurde ein Dotblot angefertigt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.14 dargestellt. Es zeigt sich, dass auch nach Beschichtung Fibronectin im Überstand des Beschichtungsmediums vorhanden ist. Wurde dieser Überstand zur erneuten Beschichtung verwendet, so konnte auch nach mehreren Durchgängen (S1, S2, S3) in durch Schaben auf der beschichteten Oberfläche gewonnenen Proben Fibronectin nachgewiesen werden.

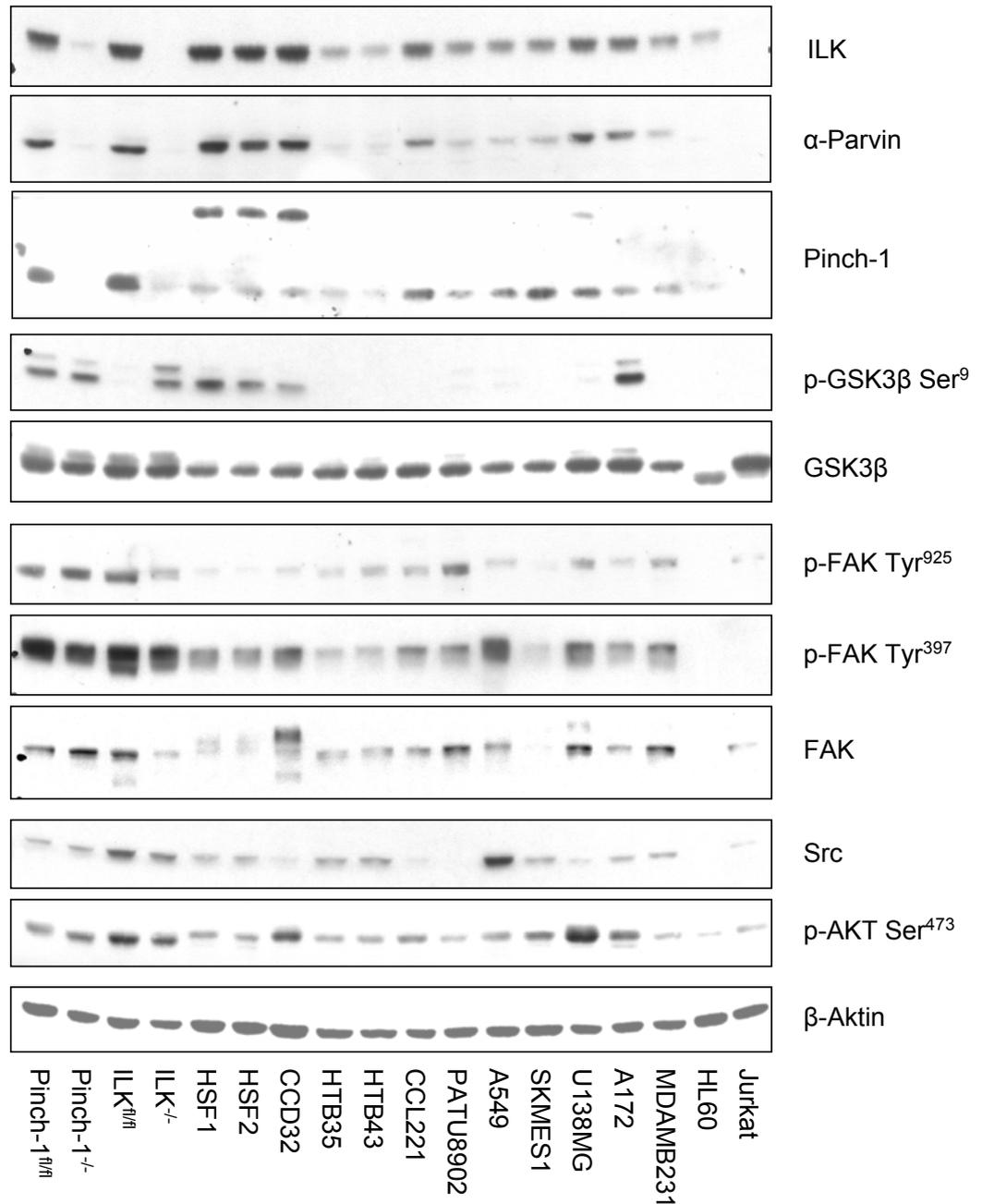


**Abbildung 5.14:** Es wurde ein Dotblot durchgeführt, um die Effizienz der Fibronektinbeschichtung zu bestimmen. Überstand: Beschichtungsmedium (Standardmedium mit Fibronektinzugabe), PBS: Spülflüssigkeit nach Beschichtung, Durchgang S1, S2, S3: Probe die mit RIPA und Plastikschaber vom Boden der Petrischale nach dem jeweiligen Durchgang gewonnen wurde. Nach mehrmaligem Beschichten mit derselben Flüssigkeit ist in einer durch Schaben gewonnenen Probe weiterhin Fibronektin nachweisbar, was den Schluß zuläßt, daß sich Fibronektin im Überstand befindet

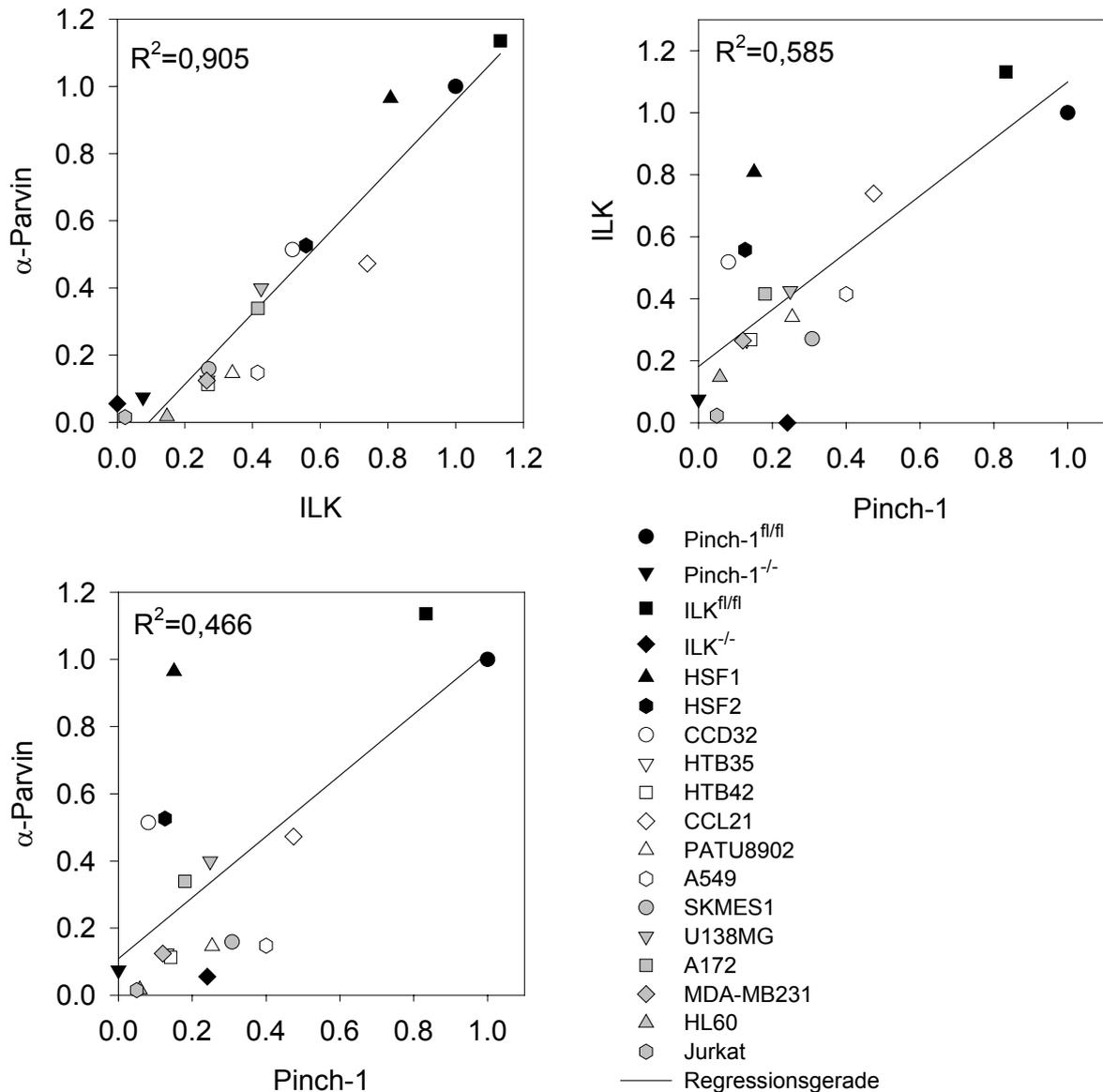
Eine wiederholte Beschichtung mit demselben Medium führt folglich weiterhin zu einer effektiven Beschichtung.

### 5.3.2 Proteinexpression in verschiedenen Zelllinien

Um einen Überblick über die Expression von Pinch-1 und anderen funktionell assoziierten Proteinen wie ILK,  $\alpha$ -Parvin oder FAK zu erhalten, wurden wie in 4.5.2 beschrieben Gesamtzellsate der in Tabelle 3.1 aufgeführten Zelllinien hergestellt. Darunter sind die murinen Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> sowie die ILK<sup>fl/fl</sup> und ILK<sup>-/-</sup> Zelllinien. Desweiteren wurden etablierte Zelllinien humaner solider und hämatopoetischer Malignome sowie humaner normaler Haut- und Lungenfibroblasten untersucht. In Abbildung 5.15 ist zu sehen, dass – wie zu erwarten – die Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen im Gegensatz zu den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen kein Pinch-1 enthalten. Desweiteren ist festzustellen, dass die Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen sehr wenig ILK und  $\alpha$ -Parvin enthalten. Analog gilt dies auch für die ILK Fibroblasten. Die ILK<sup>-/-</sup> Zellen enthalten wesentlich weniger Pinch-1 und  $\alpha$ -Parvin als die ILK<sup>fl/fl</sup> Zellen. Ein Vergleich der Expression zwischen den murinen Fibroblasten und den humanen Zellen ist sicher nur eingeschränkt möglich. Im Western Blot zeigen die Mauszelllinien Pinch-1<sup>fl/fl</sup>



**Abbildung 5.15:** Es wurden bei den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> MEFs und ILK<sup>fl/fl</sup> und ILK<sup>-/-</sup> Fibroblasten sowie bei verschiedenen etablierten humanen Tumorzelllinien und Normalzellen die Pinch-1, ILK und  $\alpha$ -Parvin Expression sowie die Expression und Phosphorylierung funktionell assoziierter Proteine nach 24 h Adhäsion auf Polystyrol bestimmt. Interessanterweise zeigen die Proteine Pinch-1, ILK und  $\alpha$ -Parvin ein ähnliches Epressionsmuster. Bei den humanen normalen Fibroblasten HSF1, HSF2 und CCD32 ist beim Nachweis von Pinch-1 eine zusätzliche Bande bei ca. 40 kDa erkennbar.



**Abbildung 5.16:** Die Expression der Proteine Pinch-1, ILK und  $\alpha$ -Parvin wurde mittels Westernblot bestimmt. Um eine Korrelation der Expression nachzuweisen, ist die densitometrisch ermittelte Expression jeweils zweier Proteine in einem Diagramm gegenübergestellt. Jede Zelllinie ist durch einen Punkt (Symbol) dargestellt (siehe Legende). Es ergibt sich insbesondere für die Proteine ILK und  $\alpha$ -Parvin eine sehr gute Korrelation von  $R^2 = 0,905$ , zwischen Pinch-1 und ILK und zwischen Pinch-1 und  $\alpha$ -Parvin zeigt sich ebenfalls eine positive Korrelation.

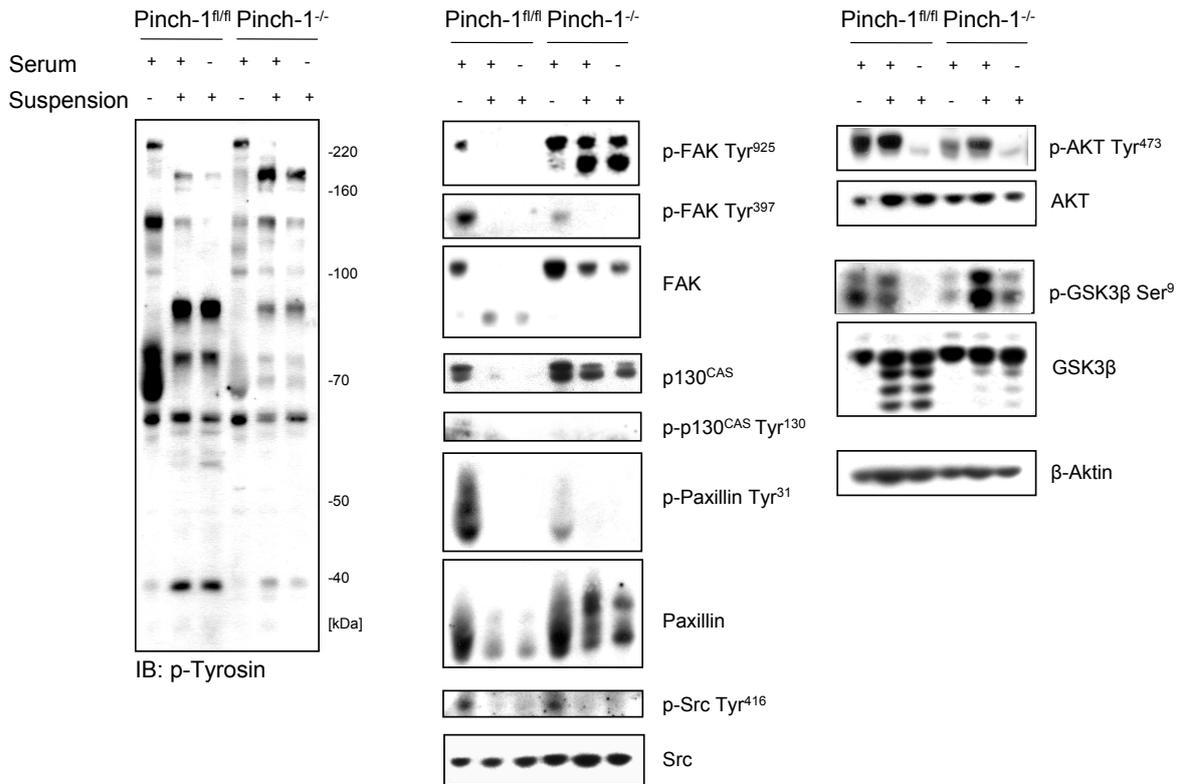
und ILK<sup>fl/fl</sup> ein wesentlich stärkeres Pinch-1 Signal als die humanen Zelllinien. Zu den humanen Zelllinien, die eine relativ hohe Pinch-1 Expression zeigen zählen CCL221, A549 und SKMES1, während die nicht malignen Zelllinien HSF1, HSF2 und CCD32 nur eine schwache Bande bei 36 kDa zeigen, während bei ca. 40 kDa ein zweites kräftiges Signal sichtbar wird. Die Identität dieses Proteins ist nicht bekannt.

Das Gesamtprotein GSK3 $\beta$  wird bei allen untersuchten Zelllinien exprimiert, die Phosphorylierung an Ser<sup>9</sup> differiert hingegen, sie ist bei A172, HSF1, HSF2 und CCD32 sowie bei den Mauszellen (außer bei ILK<sup>fl/fl</sup>) und in schwacher Aktivität bei PATU8902, A549 und U138MG nachweisbar. Bei dem Gesamtprotein FAK ergeben sich ebenfalls Unterschiede. Sowohl die in Suspension kultivierten Zelllinien HL60 und Jurkat als auch SKMES1 zeigen keine, bzw. nur eine geringe Expression von FAK. Interessanterweise ist hier bei den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen kein Unterschied auszumachen, während die ILK<sup>-/-</sup> Zellen im Vergleich zu den ILK<sup>fl/fl</sup> Zellen eine geringere FAK Expression aufweisen. Bei der Phosphorylierung der FAK an Tyr<sup>397</sup> ergibt sich bei A549 Zellen ein starkes Signal, während die Suspensionszellen HL60 und Jurkat keine Phosphorylierung aufweisen. Der Tyr<sup>925</sup>-Rest von FAK ist außer bei PATU8902 Zellen nur wenig phosphoryliert. Das Protein Src ist insbesondere bei den A549 Zellen in größerer Menge nachweisbar. Bei der AKT-Ser<sup>473</sup> Phosphorylierung ist bei CCD32, A172 und besonders U138MG ein Signal festzustellen.

Bei näherer Betrachtung von Abbildung 5.15 ergibt sich der Eindruck, dass die Expression von ILK, Pinch-1 und  $\alpha$ -Parvin in einem Zusammenhang stehen. Bei starker Expression eines der Proteine sind auch die anderen verstärkt nachweisbar. Um dies zu objektivieren, wurden die in 4.9.1 beschriebenen Analysen zur Korrelation durchgeführt. Die zugehörigen Diagramme sind in Abbildung 5.16 zu sehen. Es lässt sich erkennen, dass eine lineare Korrelation der Expression der Proteine Pinch-1, ILK und  $\alpha$ -Parvin bei den untersuchten Zelllinien besteht. Für den Zusammenhang von ILK und  $\alpha$ -Parvin ergibt sich ein Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ) von 0,905, für Pinch-1-ILK 0,585 und für Pinch-1- $\alpha$ -Parvin 0,466.

### 5.3.3 Pinch-1 Zelllinie, Proteinexpression zum Zeitpunkt der Bestrahlung

Da sich in den Koloniebildungsassays nach Bestrahlung große Unterschiede im klonogenen Überleben zwischen Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen gezeigt haben, wurde die Proteinexpression dieser Zellen untersucht. Es wurde die Expression und Phosphorylierung von funktionell mit Pinch-1 assoziierten Proteinen in Suspension und Adhäsion



**Abbildung 5.17:** Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen wurden nach 24 h Adhäsion auf Fibronektin oder nach einer Stunde in Suspension mit und ohne Serumeinfluss lysiert. Der Immunblot Phosphotyrosin zeigt den Phosphorylierungsstatus der Zelle, wobei sich hier deutliche Unterschiede zeigen. In Adhäsion ist die Phosphorylierung der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen ausgeprägter als die der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen. Im Suspensionszustand ändert sich die Phosphorylierung vieler Proteine. Insgesamt ergibt sich eine Verringerung der Phosphorylierung. Auch in Suspension zeigt sich für die Gesamtyrosinphosphorylierung bei den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen ein stärkeres Signal als bei den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen. Das in fokalen Adhäsionen vorkommende Protein FAK ist bei Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen im Gegensatz zu Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen in Suspension kaum nachweisbar. Die Expression von Paxillin und p130<sup>CAS</sup> folgt einem ähnlichen Muster, während Src weitgehend konstant exprimiert wird. Ähnlich wie die GSK3β Ser<sup>9</sup> Phosphorylierung ist die AKT Phosphorylierung Ser<sup>473</sup> in Suspension unter Serumeinfluss bei beiden Zelllinien vorhanden, während sie bei Suspension unter Serumentzug verschwindet.

bestimmt.

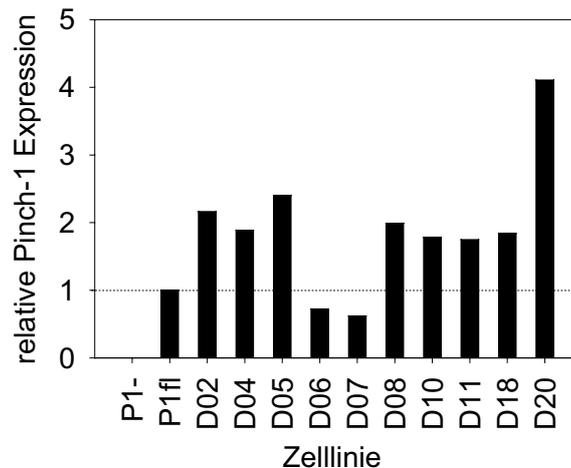
Abbildung 5.17 zeigt einen Immunblot der Tyrosinphosphorylierung. Hier sind deutliche Unterschiede der beiden Zelllinien zu sehen. Insgesamt ist der Phosphorylierungsstatus der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen wesentlich stärker, vor allem in Adhäsion. Bei ca. 70 kDa ist bei den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen ein sehr starkes Signal zu erkennen, das bei den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen in schwächerer Form ebenfalls sichtbar ist.

Auch zwischen dem Zustand Adhäsion und Suspension gibt es offensichtliche Unterschiede, so ist die Gesamtphosphorylierung in Suspension bei beiden Zelllinien geringer als in Adhäsion. Einige Proteine, beispielsweise bei ca. 180 kDa, 130 kDa, 90 kDa und 40 kDa sind allerdings in Suspension stärker phosphoryliert als in Adhäsion. Unter Serumentzug in Suspension nimmt die Phosphorylierung leicht ab, insbesondere bei 180 kDa und 130 kDa.

In Abbildung 5.17 ist auch die Expression und Phosphorylierung der Proteine FAK, Paxillin, p130<sup>Cas</sup> und Src dargestellt. Hier fällt auf, dass FAK in Suspension bei den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen praktisch verschwindet, gleichzeitig wird eine schwache Bande bei ca. 100 kDa sichtbar. Bei den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen ist FAK in Suspension nur leicht reduziert nachweisbar. Die Phosphorylierungen von FAK verhalten sich unterschiedlich. Die Autophosphorylierung Tyr<sup>397</sup> ist nur in Adhäsion detektierbar, sie ist dann bei den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen stärker, während die Phosphorylierung Tyr<sup>925</sup> bei den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen stärker und hier auch in Suspension nachweisbar ist. Das Gesamtprotein p130<sup>Cas</sup> zeigt wie auch Paxillin ein ähnliches Muster wie FAK, in Suspension ist es bei den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen deutlich reduziert nachweisbar. Die Phosphorylierung Paxillin Tyr<sup>31</sup> ist nur in Adhäsion vorhanden, bei den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen ist sie hierbei schwächer ausgeprägt. Die Expression von Src scheint hingegen unabhängig von Adhäsion bzw. Suspension zu sein; Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien erkennbar. Die Src Phosphorylierung Tyr<sup>416</sup> zeigt ebenfalls kaum Unterschiede zwischen den Zelllinien, in Suspension ist sie nicht mehr nachweisbar. Die Expression des für das Überleben wichtigen Proteins AKT zeigt wenig Unterschiede zwischen den Zelllinien und zwischen Adhäsion und Suspension, dagegen weist die Phosphorylierung Tyr<sup>473</sup> ein interessantes Verhalten auf. So ist sie in Suspension unter Serumeinfluss nachweisbar, unter Serumentzug verschwindet sie. Das Protein GSK3 $\beta$  weist ebenfalls eine Besonderheit auf, so sind in Suspension unter der Bande des Proteins bei 47 kDa weitere drei Banden im Abstand von je ca. 2 kDa. Dies ist bei den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen wesentlich ausgeprägter festzustellen. Die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  an Ser<sup>9</sup> ist in Suspension bei den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen stärker nachweisbar und wird durch Serumentzug vermindert.

### 5.3.4 Pinch-1 Expression in den Pinch-1 rekonstituierten Pinch-1<sup>rekon</sup> Zellen

In der zur Verfügung stehenden Pinch-1<sup>rekon</sup> Zelllinie (Pinch-1 rekonstituiert) ist die in Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen fehlende Pinch-1 Expression durch Infektion mit einem retroviralen Vektor wieder hergestellt worden. Die Pinch-1 Expression dieser Überexpressions-Klone

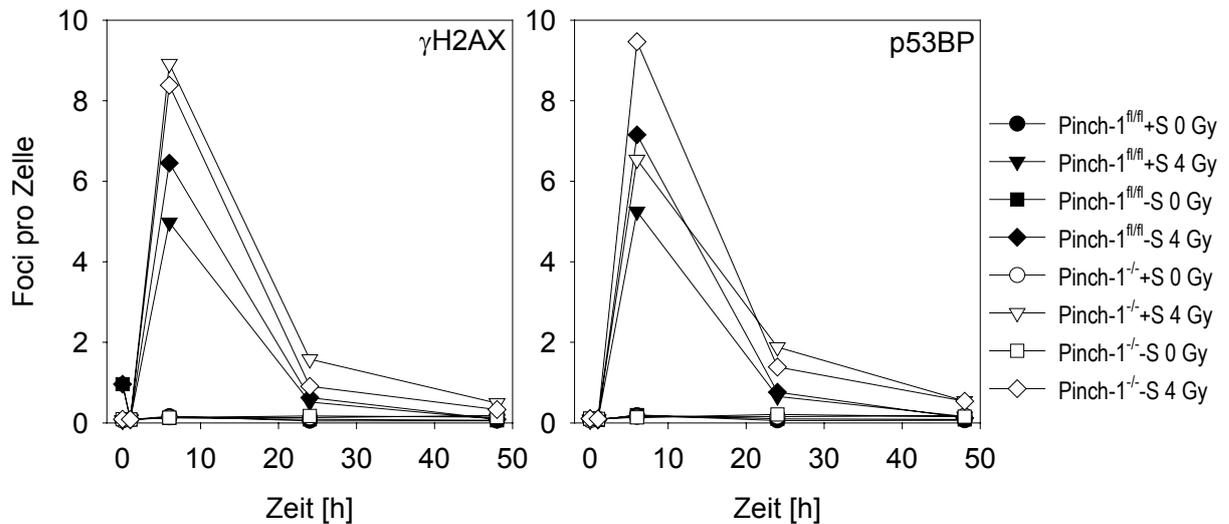


**Abbildung 5.18:** Es wurden Pinch-1<sup>rekon</sup> Zellen untersucht, die durch Infektion der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zelllinie mittels eines Pinch-1 exprimierenden, retroviralen Vektors gewonnen wurden [153]. Die Pinch-1 Expression der Klone wurde mittels Western-Blot ermittelt. Die Zellen wurden auf Polystyrol kultiviert. Es erfolgte eine densitometrische Auswertung, bei der auf  $\beta$ -Aktin abgeglichen wurde. Die Abbildung zeigt relative Werte, wobei die Pinch-1 Expression der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen als 1 definiert wurde. Im Gegensatz zu der Ursprungszelllinie Pinch-1<sup>-/-</sup> weisen alle Klone eine Expression von Pinch-1 auf. Der Klon D20 weist eine vierfache Überexpression auf, während die Klone D06 und D07 ca. die 0,6-fache Pinch-1 Expression der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen aufweisen.

wurde mittels Western-Blot bestimmt. Die relative Expression gegenüber der Zelllinie Pinch-1<sup>fl/fl</sup> ist in Abbildung 5.18 aufgetragen. In allen Klonen wird im Gegensatz zur Ursprungszelllinie Pinch-1<sup>-/-</sup> Pinch-1 exprimiert. Die Klone D02, D04, D05, D08, D10, D11, D18 zeigen eine Überexpression um den Faktor 2 im Vergleich zur Zelllinie Pinch-1<sup>fl/fl</sup>, während D06 und D07 eine Expression von ca. 65 % aufweisen. Der Klon D20 weist eine vierfache Überexpression von Pinch-1 auf.

#### 5.4 Bestimmung der Zahl $\gamma$ H2AX- und p53BP-positiver nukleärer Foci

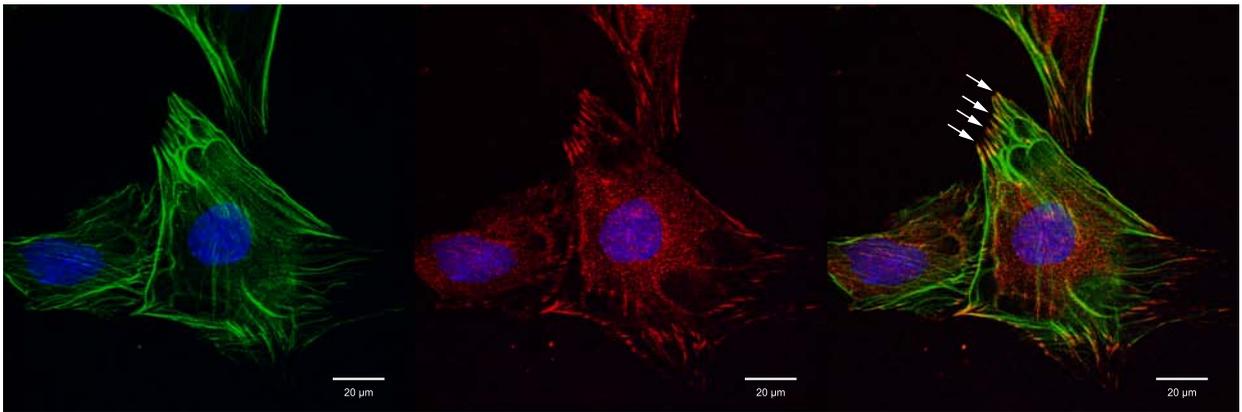
Um Ursachen der unterschiedlichen Radiosensibilität der beiden Zelllinien aufzudecken, wurden Untersuchungen zur DNA Schädigung und Reparatur nach Exposition mit ionisierender Strahlung durchgeführt. Es wurde eine Bestimmung der Anzahl an Doppelstrangbrüchen mittels Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX und p53BP durchgeführt. Die nukleären Foci wurden mikroskopisch ermittelt und stellen ein Maß für die Anzahl



**Abbildung 5.19:** Die Zellen wurden in Medium mit Serum oder in Medium ohne Serum für 1 h in Suspension kultiviert. Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit 4 Gy und die Zellen wurden auf Fibronektin ausgesät. Es ist die mittels  $\gamma$ H2AX bzw. p53BP ermittelte Zahl der Doppelstrangbrüche pro Zellkern zu den Zeitwerten 0, 6, 24 und 48 Stunden dargestellt. Die Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen (weiße Symbole) weisen vor allem zum Zeitpunkt 6 h mehr Doppelstrangbrüche als die Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen auf. Dies ist in geringerem Ausmaß auch nach 24 Stunden noch erkennbar.

der DNA-Doppelstrangbrüche dar. In Abbildung 5.19 sind die Ergebnisse gezeigt, wobei auf der Abszisse die Zeit nach Bestrahlung, auf der Ordinate die durchschnittliche Zahl der Foci pro Zelle aufgetragen ist. Diese korreliert mit der Zahl der Doppelstrangbrüche pro Zelle.

Besonders 6 Stunden nach Bestrahlung zeigen sich Unterschiede zwischen den Zelllinien. So ist festzustellen, dass zu diesem Zeitpunkt, sowohl unter Serumeinfluss als auch unter Serumentzug in den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen mehr  $\gamma$ H2AX-Foci als in den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen zu sehen sind. Für p53BP gilt ebenfalls, dass jeweils unter den Bedingungen Serumeinfluss und Serumentzug in den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen mehr Foci nachweisbar sind als in den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen. Allerdings zeigt sich hier noch ein Unterschied innerhalb der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zelllinie, die unter Serumentzug mehr Foci als unter Serumeinfluss aufweist. In den unbestrahlten Kontrollen sind keine Veränderungen in der Zahl der Foci zu den verschiedenen Zeitpunkten nachweisbar.



**Abbildung 5.20:** Nachweis von Pinch-1 in Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen. Grün: f-Aktin, Blau: Zellkern, Rot: Pinch-1. Die Abbildung zeigt mittels Laser-Scanning Mikroskopie aufgenommene Immunfluoreszenzbilder. Das Aktinzytoskelett wurde mit FITC, Pinch-1 mittels eines Antikörpers markiert. Die Zellen wurden 24 h kultiviert bevor sie fixiert wurden. Pinch-1 ist in den fokalen Adhäsionen (siehe Pfeile, hier enden die Aktinstressfasern (grün)) und im Zytoplasma lokalisiert. Balken: 20 μm

### 5.5 Apoptose

Die Zellen wurden wie in 4.8 beschrieben behandelt, fixiert und gefärbt. Bei Durchmusterung von jeweils 10 Gesichtsfeldern konnte weder in den Präparaten der adhärennten Zellen noch in der Präparation der Überstände apoptotische Zellen nachgewiesen werden.

### 5.6 Immunfluoreszenz

#### 5.6.1 Subzelluläre Lokalisation von Pinch-1 in Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen

Es wurden wie in 4.7 beschrieben Immunfluoreszenzbilder der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen mittels Pinch-1 Antikörpern hergestellt (siehe Abbildung 5.20). Es zeigt sich eine Lokalisation des Proteins in den fokalen Adhäsionen und eine Überlagerung mit den Aktinstressfasern. Hier ist es auch noch einige μm entfernt von den fokalen Adhäsionen entlang der Fasern nachweisbar. Auch im Zytoplasma ist ein Signal zu erkennen.

#### 5.6.2 Subzelluläre Lokalisation von Pinch-1 in Pinch-1<sup>rekon</sup> Zellen

Es wurden wie in 4.7 beschrieben Immunfluoreszenzbilder der Pinch-1 Überexpressionszelllinien hergestellt (siehe Abbildung 5.21). Hierbei zeigen sich sowohl Unterschiede in der Verteilung als auch in der Stärke des Signals von Pinch-1. Auch die Form der Zellen und das Aktinzytoskelett weisen Unterschiede auf. Obwohl keine quantitative

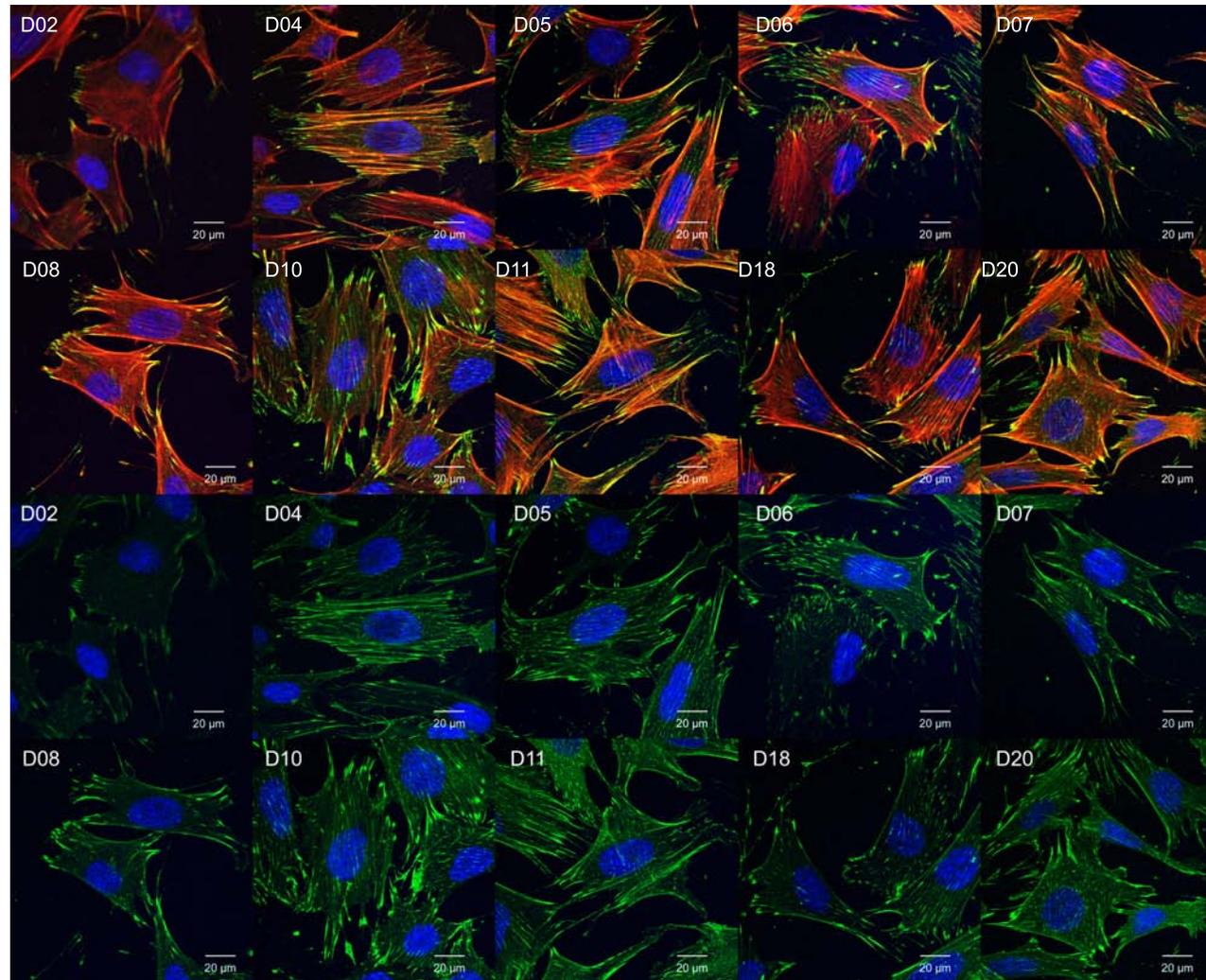
Analyse möglich ist, fällt auf, dass Klon D10 und D06 eine kräftige Expression von Pinch-1 aufweisen, während bei den Klonen D02, D07 und D08 eher eine schwächere Expression feststellbar ist.

Die Verteilung ist bei Klon D02, D08 und D18 stark auf die fokalen Adhäsionen beschränkt, während besonders bei Klon D04 auch entlang der Aktinstressfasern Pinch-1 nachweisbar ist. Bei den Klonen D20 und D11 ist die Verteilung von Pinch-1 außerhalb der fokalen Adhäsionen eher diffus.

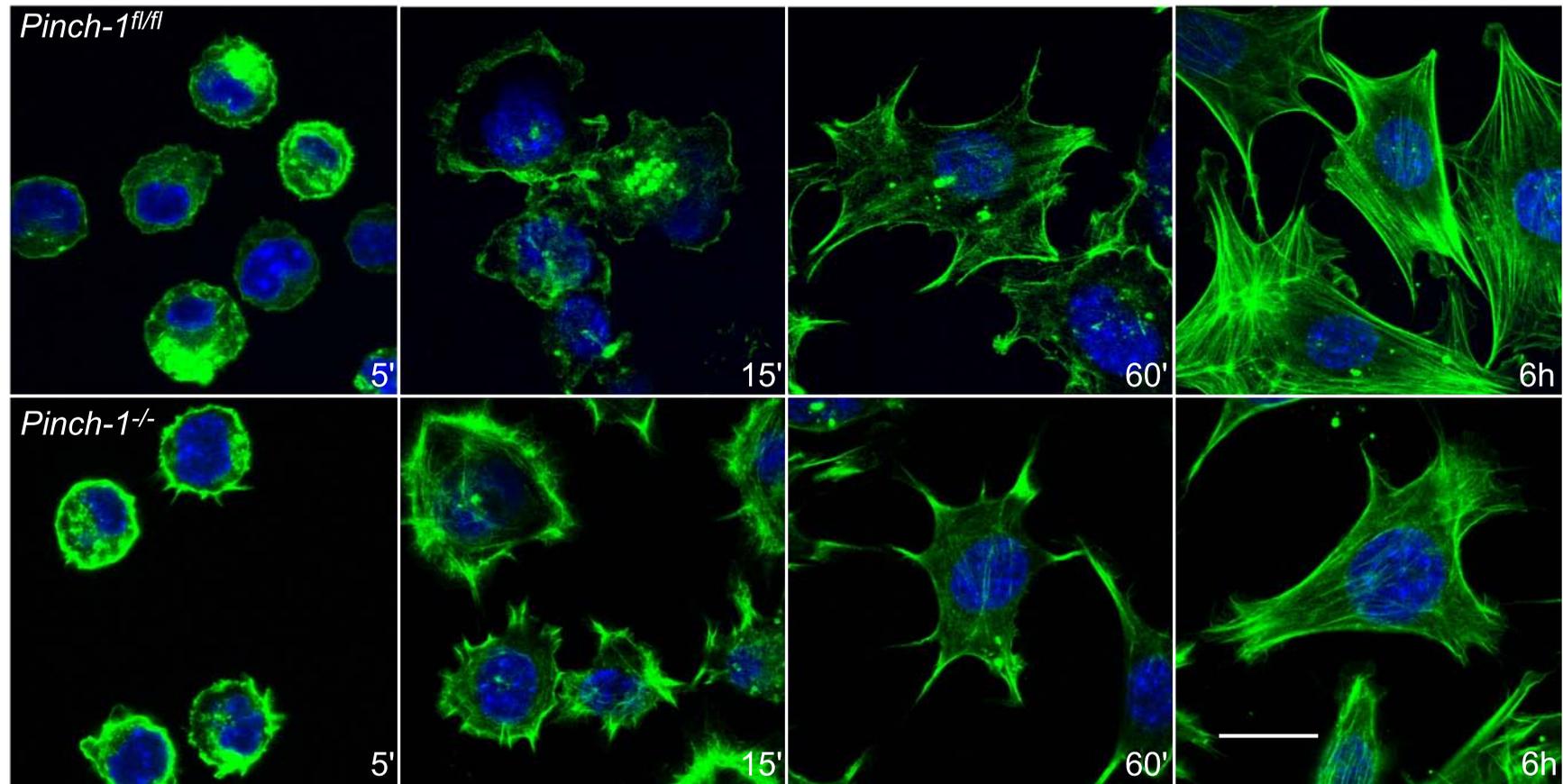
Der Aufbau des Zytoskeletts weist bei den Klonen D04 und D11 kräftige parallele Aktinstressfasern auf, während diese bei D02, D08 und D20 schwächer ausgeprägt sind.

### 5.6.3 Adhäsionsassay bei Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen

Es wurde wie in 4.7.1.1 verfahren, um den Vorgang der Zelladhäsion und des «cell spreading» zu untersuchen. In Abbildung 5.22 ist das Ergebnis für die Zelllinien Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> dargestellt. Hier sind mehrere Unterschiede bemerkenswert. Beispielsweise ist in Abbildung 5.22 bei der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zelllinie nach 60 Minuten eine ungleichmäßige Verteilung des f-Aktins mit plumper Ansammlung in den fokalen Adhäsionen festzustellen, während bei den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen schon eine gleichmäßigere Verteilung vorliegt. Nach 6 Stunden haben die Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen Aktinstressfasern ausgebildet, die Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen zeigen zu diesem Zeitpunkt immer noch ein wenig differenziertes Aktinzytoskelett. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen eine Störung der Organisation des Aktinzytoskeletts aufweisen.



**Abbildung 5.21:** Nachweis von Pinch-1 in Pinch-1 Überexpressionszelllinien Pinch-1<sup>rekon</sup>. Pinch-1 ist größtenteils in den fokalen Adhäsionen lokalisiert, doch auch entlang des Aktinzytoskeletts lässt es sich nachweisen, besonders ausgeprägt bei Klon D04. Bei Klon D02, D08 und D18 ist Pinch-1 vorwiegend in den fokalen Adhäsionen vorzufinden. Rot: f-Aktin, Blau: Zellkern, Grün: Pinch-1, Balken: 20 µm.)



**Abbildung 5.22:** *Pinch-1<sup>fl/fl</sup>* und *Pinch-1<sup>-/-</sup>* Zellen wurden eine Stunde in Suspension kultiviert und anschließend auf das Substrat Fibronectin aufgebracht. Die Zellen wurden nach verschiedenen Zeitintervallen fixiert und gefärbt. Die *Pinch-1<sup>-/-</sup>* Zelllinie weist einen Spreadingdefekt auf. Bei 60 Minuten nach Adhäsionsbeginn ergibt sich bei den *Pinch-1<sup>-/-</sup>* Zellen eine ungleichmäßige Aktinverteilung mit plumper Aktinaggregation an den fokalen Adhäsionen. Nach 6 Stunden lässt sich ein wesentlich weniger differenziertes Aktinzytoskelett bei den *Pinch-1<sup>-/-</sup>* Zellen feststellen. Grün: f-Aktin, Blau: Zellkern.

## 6 Diskussion

Die Strahlentherapie von Tumoren ist eine sehr effiziente Behandlungsmethode. So können bei bestimmten Malignomen Heilungsraten von über 90 % erreicht werden [155]. Palliativ lässt sich Überlebenszeit und Lebensqualität der Patienten verbessern, was sich zum Beispiel bei der Bestrahlung von Knochenmetastasen zur Schmerzreduktion [78] oder der Radiotherapie beim fortgeschrittenen Lungenkarzinom [164] zeigt. Problematisch ist die unerwünschte Wirkung auf gesundes Gewebe, die für den Patienten belastend und letztendlich dosislimitierend ist. Ein weiteres Problem sind Tumoren, die eine geringe Strahlensensibilität aufweisen wie z. B. das maligne Melanom, Nierenzellkarzinom, Osteosarkom oder Glioblastom sowie primär strahlensensiblen Tumoren, die sekundär Resistenzen entwickeln [176]. In den letzten Jahrzehnten wurden große Fortschritte in der Strahlentherapie erreicht. Die Bestrahlungstechnik wurde verbessert, um die gezielte Applikation einer definierten Strahlendosis auf den Tumor zu ermöglichen. So kann im Tumor eine hohe Dosis erreicht werden, während wichtige Strukturen des Normalgewebes in dessen Nähe geschont werden [155]. Zudem ist es vielfach gelungen, die Wirkung der Strahlentherapie durch eine gleichzeitig durchgeführte Chemotherapie zu verbessern [17,28]. Darüberhinaus zeigten Studien, dass die Kombination von Radiotherapie mit Androgenantagonisten beim Prostatakarzinom erfolgversprechend ist [41,141], während ein weiterer Therapieansatz die Inhibition der Wachstumsfaktorrezeptoren ist [10,133]. Auch für die Inhibition von Rezeptoren der Integrin-Familie wurden vielversprechende Ergebnisse für die Kombination mit Strahlentherapie erbracht [1,4].

Integrine sind Signalmoleküle, die Interaktionen der Zelle mit der EZM vermitteln. Integrine sind zusammen mit einer Vielzahl weiterer Signalmolekülen, wie z. B. den Wachstumsfaktorrezeptoren, in großen Multiproteinkomplexen – den fokalen Adhäsionen – lokalisiert und regulieren eine Vielzahl essentieller Zellvorgänge wie Zellüberleben, Zellzyklus und Proliferation [29–31,36,40,61,104]. Es konnte gezeigt werden, dass integrinvermittelte Zell-EZM Interaktionen die Chemo- und Radiosensibilität durch Modulation der zellulären Strahlenantwort [29,34,35,39,61,106,150,151] beeinflussen.

Die Strahlensensibilität von Zellen ist von komplexen Signalprozessen abhängig, die Apoptose, Zellüberleben, Proliferation, Zellzyklus und DNA-Reparaturvorgänge steu-

ern. Ein genaueres Verständnis dieser Prozesse könnte es ermöglichen, diese Vorgänge pharmakologisch zu beeinflussen und somit einerseits die Effekte der Bestrahlung auf Tumorzellen zu maximieren, andererseits Nebenwirkungen auf Normalgewebe zu reduzieren. Eine weitere Möglichkeit der Therapie besteht darin, Invasion und Metastasierung der Tumorzellen zu modulieren. Ein Großteil der durch maligne Erkrankungen verursachten Todesfälle wird nicht durch den Primärtumor, sondern durch dessen Metastasierung verursacht. Die Invasion, die Migration und letztlich die Absiedlung in einem anderen Gewebe werden maßgeblich durch Zell-Matrix Interaktionen gesteuert [71].

Das Protein Pinch-1 befindet sich in den fokalen Adhäsionen und interagiert mit weiteren Signalproteinen wie ILK, Paxillin und Nck-2. Diese Arbeit untersucht – unserem Wissen nach erstmalig – die Rolle von Pinch-1 für das Zellüberleben nach genotoxischem Stress.

Die Ergebnisse zeigen Folgendes: (a) Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen weisen sowohl nach Bestrahlung, als auch nach Behandlung mit Zytostatika ein signifikant schlechteres Überleben auf, wobei Apoptose keine Rolle spielt; (b) Pinch-1 hat einen vom Substrat abhängigen Einfluss auf die Proliferation; (c) Pinch-1 wird in vielen Tumorzelllinien exprimiert; (d) die Signaltransduktion der Zelle wird durch Pinch-1 moduliert; (e) die Organisation des Aktinzytoskeletts ist bei den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen dysreguliert; (f) Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen weisen nach Bestrahlung mehr Doppelstrangbrüche auf als Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen.

Die Untersuchungen der Strahlensensibilität zeigen eine signifikante Radiosensibilisierung der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen im Vergleich zu den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen. Die Unterschiede im Zellüberleben sind unabhängig von Substrat, Adhäsion und Zeitpunkt der Bestrahlung. Die Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass Pinch-1 die Prozesse Strahlenreaktion und Zellüberleben moduliert.

In den Pinch-1<sup>rekon</sup> Zellen wurde die fehlende Pinch-1 Expression der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen durch Infektion mit einem Pinch-1 exprimierenden, retroviralen Vektor rekonstituiert [153]. Diese Zellen weisen eine Pinch-1 Expression vom 0,6- bis 4-fachen der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zelllinie auf und zeigen ein deutlich verbessertes klonogenes Zellüberleben nach Bestrahlung im Vergleich zur Pinch-1<sup>-/-</sup> Zelllinie. Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass Pinch-1 eine zentrale Rolle in der Modulation der Strahlensensibilität besitzt.

Im Gegensatz zu vorherigen Studien [31, 36] zeigten die hier untersuchten murinen embryonalen Fibroblasten kein verbessertes Überleben auf dem Substrat Fibronectin. Im Gegenteil, bei den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen ist ein Trend zu schlechterem Überleben zu erkennen, während bei den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen kein Unterschied zu den anderen Substraten besteht.

Ein Protein das funktionell eng mit Pinch-1 in Beziehung steht, ist ILK. Pinch-1, ILK und Parvine bilden einen Komplex (IPP-Komplex siehe 2.1.2) und sind somit gemeinsam an der Regulation verschiedener Zellfunktionen beteiligt. Die ebenfalls untersuchten murinen Nierenfibroblasten zeigten in der ILK<sup>-/-</sup> Zelllinie ein besseres Überleben nach Bestrahlung als die ILK<sup>fl/fl</sup> Zellen. Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen bei den Pinch-1 defizienten Zellen. Eine Erklärung hierfür ist einerseits die unterschiedliche Funktion der beiden Proteine ILK und Pinch-1 innerhalb des IPP-Komplexes oder zusätzliche Funktionen außerhalb des Komplexes. ILK<sup>fl/fl</sup> Zellen zeigen nach Bestrahlung auf Fibronectin ein verbessertes Überleben im Vergleich zu Poly-L-Lysin, während bei den ILK<sup>-/-</sup> Zellen hier kein Unterschied erkennbar ist. Interessanterweise ist im Gegensatz hierzu bei Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen ein tendenziell schlechteres Zellüberleben bei Bestrahlung auf Fibronectin im Vergleich zu Poly-L-Lysin festzustellen, während bei Pinch-1<sup>-/-</sup> analog zu ILK<sup>-/-</sup> Zellen kein Unterschied festzustellen ist. ILK und Pinch-1 modulieren folglich das Zellüberleben in unterschiedlicher und in diesem Fall entgegengesetzter Weise. Hierbei ist anzumerken, dass vermutlich aufgrund von proteasomalen Abbauvorgängen [62] ILK<sup>-/-</sup> Zellen wenig Pinch-1 und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen wenig ILK enthalten. Insofern ist eine isolierte Aussage zu ILK und Pinch-1 in dem von uns benutzten Modell zur Zeit nicht möglich.

Die Unterschiede im Zellüberleben sind sowohl bei Bestrahlung in Adhäsion als auch in Suspension festzustellen. Es ist bekannt, dass Zellen in Suspension eine reduzierte p53 Expression und eine Reduktion der Strahlensensibilität aufweisen und es wurde postuliert, dass diese Vorgänge integrinvermittelt sind [106]. Auch in den hier durchgeführten Untersuchungen zum Zellüberleben nach Bestrahlung in Suspension zeigte sich bei der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zelllinie bei 6 Gy ein verbessertes Überleben in Suspension während sich bei Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen kein signifikanter Unterschied ergab. Somit kann vermutet werden, dass Pinch-1 eine Rolle bei dieser Reduktion der Strahlensensibilität spielt.

Ebenfalls von Interesse ist die Beobachtung, dass dieser Einfluss des Suspensionszustandes auf das Zellüberleben bei den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen die Anwesenheit von fetalem Kälberserum erfordert, während bei den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen der Entzug von Serum in Suspension zu keiner Veränderung des Überlebens führte. An diesen Beobachtungen sind die engen Interaktionen der Integrin und Wachstumsfaktorrezeptoren zu erkennen [132]. Eine dieser Verbindungen wird über die LIM4 Domäne von Pinch-1 vermittelt. LIM4 interagiert mit Nck-2, einem Adapterprotein, das z. B. mit dem VEGF Rezeptor in Verbindung steht [167].

Erworbene Resistenz gegen Zytostatika ist ein wohlbekanntes und schwerwiegendes klinisches Problem bei der Tumorthherapie. Mehrere Studien zeigen, dass bei der Entstehung von Resistenzen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Zell-EZM Interaktionen von Bedeutung sind [5,37,80,150].

Die Untersuchungen des Zellüberlebens nach Zytostatikabehandlung bestätigen die höhere Empfindlichkeit der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen gegenüber genotoxischem Stress. Cisplatin und Mitomycin-C wirken über unterschiedliche Mechanismen, beide induzieren aber DNA-Schäden. Bestrahlung verursacht ebenfalls DNA-Schäden beispielsweise in Form von Doppelstrangbrüchen, zusätzlich werden hier aber indirekte Schäden an Proteinen und Lipiden durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen (reactive oxygen species ROS, reactive nitrogen species NOS) induziert. Interessanterweise zeigen die untersuchten murinen Nierenfibroblasten ILK<sup>fl/fl</sup> und ILK<sup>-/-</sup> bei Behandlung mit Cisplatin im Unterschied zu diesen Ergebnissen nach Bestrahlung keine signifikanten Unterschiede im Zellüberleben. Angesichts der unterschiedlichen Wirkprinzipien der eingesetzten Noxen deuten die Ergebnisse auf ein generelles Defizit der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen bei der Antwort auf genotoxische Einflüsse hin, während bei den ILK defizienten Nierenfibroblasten insbesondere die Mechanismen der Strahlenantwort durch den Verlust von ILK moduliert werden.

Die Immunfluoreszenzaufnahmen der Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen zeigen, dass Pinch-1 in fokalen Adhäsionen lokalisiert ist [166], doch auch im Zytoplasma ist es nachzuweisen. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen an murinen NIH 3T3 Fibroblasten [189]. Ein Vorkommen von Pinch-1 im Zellkern wäre zumindest nicht überraschend, da das Protein Sequenzen enthält, die eine potentielle Funktion für Import und Export aus dem Kern besitzen [67]. Zudem werden einige andere LIM-Domänen Proteine sowohl in Zytoplasma als auch im Zellkern gefunden. Pinch-1 wurde in Schwann-Zellen [22] und in *Caenorhabditis elegans* [84] im Zellkern beobachtet, während Fässler et al. in NIH 3T3 Fibroblasten weder Pinch-1 noch Pinch-2 im Zellkern nachweisen konnten [16].

Die Interaktionen, die bewirken, dass Pinch-1 zu den fokalen Adhäsionen transloziert wird sind Gegenstand aktueller Untersuchungen. So wurde postuliert, dass sich im Zytoplasma der ILK-Pinch-Parvin-Komplex bildet, der dann in die fokalen Adhäsionen transportiert wird [187]. Dieses Modell impliziert, dass für die Lokalisierung der Proteine ILK, Pinch-1 und der Parvine in die fokalen Adhäsionen einerseits eine korrekte Assemblierung des Komplexes stattfinden muß, andererseits Interaktionen der Bindungspartner mit weiteren Proteinen stattfinden müssen. Wu et al. untersuchten Zellen, in denen

modifizierte Pinch-1 Varianten exprimiert wurden. Sie konnten zeigen, dass in Zellen deren Pinch-1 einige c-terminale Aminosäuren fehlten zwar eine normale ILK Expression aufwiesen, dass Pinch-1 hier jedoch nicht in den fokalen Adhäsionen zu finden ist [182]. Diese c-terminale Sequenz scheint also nicht für die Bildung des Komplexes selbst, sondern für Interaktionen mit weitere Proteinen eine Rolle zu spielen.

Integrine spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation des Aktinzytoskeletts [15]. Der ILK–Pinch–Parvin Komplex ist an diesen Vorgängen beteiligt, so werden zum einen über Parvine und  $\alpha$ -PIX und zum anderen über Pinch-1 und RSU1 die Rho-GTPasen Rac1 und CDC42 moduliert und so Signale an das Zytoskelett übermittelt. Dieser Einfluss zeigte sich auch im durchgeführten Adhäsionsassay, in dem die Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen einen deutlichen Defekt der Zellausbreitung und zudem ein irreguläres, wenig organisiertes Zytoskelett aufwiesen. In den Pinch-1 rekonstituierten Zellen zeigte sich eine regelhafte Organisation des Zytoskeletts und Lokalisation des Pinch-1 Proteins in den fokalen Adhäsionen. Analoge Beobachtungen wurden bei ILK defizienten Zellen gemacht [66, 136]. Es wurde bereits gezeigt, dass Pinch-1 eine wichtige Rolle für den Vorgang der Zellausbreitung auf einem Substrat spielt. Dies scheint sowohl die für die Interaktion mit ILK verantwortliche LIM1 Domäne, als auch die LIM4 und LIM5 Domänen und die c-terminale Aminosäuresequenz zu erfordern [182]. Interessanterweise führt ein Austausch der c-terminalen Aminosäuresequenz von Pinch-1 durch die entsprechende Sequenz aus Pinch-2 zu einer gestörten Zellausbreitung, jedoch ist dieses veränderte Pinch-1 Protein unverändert in den fokalen Adhäsionen lokalisiert [182]. Diese Beobachtungen zeigen, dass Pinch-1 durch seine verschiedenen Protein-Protein-Interaktionen maßgeblich an Adhäsionsvorgängen beteiligt ist.

Die fokalen Adhäsionen modulieren verschiedene Signalkaskaden, was auch den reduzierten Phosphorylierungsstatus der untersuchten Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen in Suspension im Vergleich zu Adhäsion erklärt. Unter Adhäsionsbedingungen zeigt sich zudem ein deutlich geringerer Gesamtphosphorylierungsstatus der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen im Vergleich zu Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen. Wie kann das Fehlen eines Proteins, das selbst keine Kinaseaktivität besitzt zu diesen Veränderungen führen? Eine Erklärung ergibt sich aus der Vorstellung, dass sich in fokalen Adhäsionen viele Signalproteine zusammenfinden und anschließend Signalübertragung stattfindet [104, 180]. In Untersuchungen zur Proteinphosphorylierung bei der Bildung von fokalen Adhäsionen konnte gezeigt werden, dass die Translokation verschiedene Signalproteine in die fokalen Adhäsionen der Phosphorylierung zeitlich vorausgeht [100]. Diese Assemblierung der Signalkomplexe ist bei

den Zellen die kein Pinch-1 enthalten, gestört, was sich beispielsweise an der veränderten Zusammensetzung der fokalen Adhäsionen bei den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen zeigte. Eine starke Reduktion der Proteine ILK und  $\alpha$ -Parvin war hier nachweisbar.

Die in den fokalen Adhäsionen vorkommende Tyrosinkinase FAK wurde in Zusammenhang mit Karzinogenese und Metastasierung gebracht und wird in vielen Tumoren wie z. B. Mammakarzinom, HCC (hepatozelluläres Karzinom) und Lungenkarzinom überexprimiert [58, 90, 116, 170, 175]. Bei der Strahlenreaktion der Zelle spielen FAK, Paxillin und p130<sup>Cas</sup> ebenfalls eine Rolle. Nach Bestrahlung nimmt die Phosphorylierung dieser Proteine zu [12]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass FAK Überexpression zu erhöhter Radioresistenz von HL60 Leukämiezellen führt. Bei den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen ist zwar die Src-abhängige Phosphorylierung von FAK an Tyr<sup>925</sup> verstärkt, die Autophosphorylierung an Tyr<sup>397</sup> ist jedoch vermindert. Dies spricht für eine verminderte Kinaseaktivität von FAK, da diese durch Tyr<sup>397</sup> positiv reguliert wird, während die Phosphorylierung an Tyr<sup>925</sup> zu einem verringerten Vorkommen von FAK in den fokalen Adhäsionen und somit zu einem verminderten Substratangebot führt [98]. FAK phosphoryliert unter anderem Paxillin und p130<sup>Cas</sup>. Dies erklärt, warum bei diesen Proteine in den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen ebenfalls eine verminderte Phosphorylierung nachweisbar ist.

Die Kinase GSK3 $\beta$  ist an der Regulation der zellulären Strahlenreaktion beteiligt. Einerseits moduliert GSK3 $\beta$  das Zellüberleben durch integrinvermittelte Signalwege über PKB/AKT andererseits über Interaktionen mit p53 [36, 173, 174]. In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigen sich Unterschiede in der Expression und Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  während Adhäsion und Suspension, insbesondere fallen zusätzliche Banden bei der Detektion des Gesamtproteins GSK3 $\beta$  auf. Diese Beobachtung konnte an den ILK<sup>fl/fl</sup> und ILK<sup>-/-</sup> Zellen bestätigt werden (Eke, Hehlhans, Cordes, unpublished). Diese Banden, die nur im Suspensionszustand auftreten, könnten Abbauprodukte darstellen, ihre Bedeutung ist bis jetzt jedoch unklar. Auffällig ist das vermehrte Auftreten bei den Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und ILK<sup>fl/fl</sup> Zellen im Vergleich zu Pinch-1<sup>-/-</sup> und ILK<sup>-/-</sup>, hier scheint ein Zusammenhang zu bestehen.

Pinch-1 wird in den verschiedenen untersuchten Tumorzelllinien exprimiert. Die Hypothese der durch proteasomalen Abbaus bedingten Koexpression der Proteine ILK, Pinch-1 und Parvin [104] konnte anhand der gewonnenen Expressionsdaten für verschiedene Zelllinien bestätigt werden. Eine weitere Korrelation mit funktionell assoziierten Proteinen wie FAK, Src, GSK3 $\beta$  oder AKT konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Mechanismen der Radiosensibilisierung der Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen bleiben weiterhin

unklar. In Frage kommen unter anderem eine erhöhte Apoptoserate, reduzierte DNA-Reparaturmechanismen oder Veränderungen im Zellzyklus. Der Nachweis von Apoptose mittels DAPI-Färbung bei bestrahlten Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen zeigte allerdings keine nennenswerte Rolle für diese Form des Zelluntergangs.

Die Bestimmung der Proliferation zeigte auf dem Substrat Poly-L-Lysin für Pinch-1<sup>fl/fl</sup> eine höhere Zellzahl als bei Pinch-1<sup>-/-</sup>. Interessanterweise beeinflusst das Substrat Fibronektin die Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zelllinie negativ, während die Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen stärker proliferieren. Ein ähnlicher Effekt ist beim Zellüberleben erkennbar. Pinch-1 moduliert die Fibronektinwirkung möglicherweise über eine Veränderung der Zusammensetzung der fokalen Adhäsionen und somit die Wirkung nachgeschalteter Signalwege.

Es ist bisher unklar, welche Faktoren das Überleben einer Zelle nach Bestrahlung determinieren. Unstrittig ist aber die Bedeutung der strahleninduzierten DNA Schädigung und somit auch der DNA-Reparaturmechanismen. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass bereits ein einzelner DNA Doppelstrangbruch letal für die Zelle sein kann. Das Histon H2AX wird im Bereich eines Doppelstrangbruchs von ATM phosphoryliert, wodurch weitere Proteine zur DNA-Reparatur rekrutiert werden. Dieses phosphorylierte Histon  $\gamma$ -H2AX lässt sich durch Immunfluoreszenz nachweisen und macht somit indirekt Doppelstrangbrüche sichtbar. Die Zahl der  $\gamma$ -H2AX Foci wurde in bestrahlten Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen bestimmt. Vor allem zum Zeitpunkt 6 Stunden, aber in geringerem Maße auch 24 Stunden nach Bestrahlung zeigten die Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen mehr Doppelstrangbrüche als die Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen. Dies steht im Einklang mit an humanen Fibroblasten durchgeführten Untersuchungen, die eine Korrelation der Zahl der verbleibenden Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung mit einer erhöhten Strahlensensibilität zeigen [50,95]. Als Ursache für das vermehrte Auftreten von  $\gamma$ -H2AX Foci in den Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen könnte einerseits eine größere Anzahl strahleninduzierter Doppelstrangbrüche sein, andererseits könnte die Reparatur dieser DNA Schäden reduziert sein [51]. Letzteres scheint eher zuzutreffen, da gezeigt wurde, dass die Zahl der strahleninduzierten Doppelstrangbrüche pro Zelle eine lineare Funktion der Strahlungsdosis ist [172] und somit im Weiteren die Geschwindigkeit und Effizienz der Reparaturvorgängen zu Unterschieden führen.

Pinch-1 ist an Signalwegen sowohl der Integrin als auch der Wachstumsfaktorrezeptoren beteiligt. Über noch ungeklärte Mechanismen führt der Verlust von Pinch-1 zu einer erheblichen Strahlensensibilisierung der untersuchten Zellen. Zudem ist eine veränderte Expression und Lokalisation von anderen Proteinen der fokalen Adhäsionen und eine Veränderung der Zytoskelettorganisation bei Pinch-1 defizienten Zellen

feststellbar. Vermutlich als Folge davon kommt es zu massiven Veränderungen in der Signaltransduktion, die sich sowohl in der Gesamtphosphorylierung der Zellen als auch in der Phosphorylierung von Schlüsselproteinen der zellulären Stressantwort deutlich zeigt. Im Zellkern zeigen sich nach Bestrahlung Unterschiede in der Zahl der Doppelstrangbrüche, die einen Hinweis auf veränderte Reparaturmechanismen geben. Pinch-1 ist in verschiedenen Tumorzelllinien nachweisbar. Allerdings ist die *in vitro* Situation nicht unbedingt repräsentativ, da in Tumorgewebe neben Tumorzellen weitere Zellen wie Stromazellen, Gefäßendothelien und Immunzellen vorkommen [110]. Mittels immunhistochemischem Nachweis von Pinch-1 konnte Wang-Rodriguez et al. zeigen, dass Pinch-1 vorrangig in Stromazellen in Bereichen invasiven Wachstums exprimiert wird [171]. Pinch-1 Expression im Stroma erwies sich als unabhängiger negativer prognostischer Faktor beim kolorektalen Karzinom [63]. Pinch-1 oder mit Pinch-1 assoziierte Signalmoleküle erscheinen geeignet für gezielte Therapieansätze. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Mechanismen der Pinch-1 vermittelten Radiosensibilisierung zu verstehen, um pharmakologisch gezielt die Wirkung der Strahlentherapie verbessern zu können.

## 7 Zusammenfassung

Resistenz eines Tumors gegen Strahlen- oder Chemotherapie ist ein häufiges und schwerwiegendes Phänomen. Dem intratumoralen Mikromilieu und den Interaktionen zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix wird hierbei zunehmende Bedeutung zugeschrieben. Diese Interaktionen der Zelle mit ihrer Umgebung findet an den fokalen Adhäsionen statt, wo Integrine, Wachstumsfaktorrezeptoren, Adapter-, Signal- und Strukturproteine lokalisiert sind. Das LIM-Domänen Protein Pinch-1 ist ebenfalls Teil dieser fokalen Adhäsionen und an Prozessen wie Zellüberleben, Zytoskelettorganisation und Signalübertragung beteiligt.

Um den Einfluss von Pinch-1 auf die Strahlen- und Chemosensibilität zu charakterisieren wurden Pinch-1<sup>fl/fl</sup> und Pinch-1 defiziente murine embryonale Fibroblasten vergleichend untersucht. Es zeigte sich, dass Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen unabhängig von Substrat und Suspensionszustand signifikant sensibler gegenüber ionisierender Strahlung und Behandlung mit den Zytostatika Cisplatin und Mitomycin-C sind. Starke Hinweise für die essentielle Rolle von Pinch-1 in der zellulären Stressantwort zeigten sich in Pinch-1 rekonstituierten Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen, die eine Strahlensensibilität vergleichbar mit Pinch-1<sup>fl/fl</sup> Zellen aufweisen.

Bei Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen sind im Vergleich zu Pinch-1<sup>fl/fl</sup> zentrale Proteine der fokalen Adhäsionen dysreguliert und der Phosphorylierungsstatus der Zellen ist stark verändert. Parallel zu diesen Beobachtungen weisen die Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen einen Defekt der Aktinzytoskelettorganisation auf. Interessanterweise konnte bei den untersuchten Pinch-1<sup>-/-</sup> Zellen eine größere Zahl an  $\gamma$ H2AX- und p53BP-Foci nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Dies ist ein Hinweis auf eine weniger effiziente DNA-Reparatur in Pinch-1 defizienten Zellen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Pinch-1 aufgrund einer zentralen Rolle bei der Regulation der fokalen Adhäsion, starken Einfluss auf die Strahlen- und Chemosensibilität der untersuchten Zellen hat.

Ein genaueres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen ist nötig, um mittels selektiver medikamentöser Beeinflussung den Therapieerfolg der Strahlentherapie weiter zu verbessern.

## Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht der integrindefizienten Phänotypen . . . . .	29
3.1	Verwendete Zelllinien . . . . .	36
4.1	Beim Koloniebildungsassay verwendete Zellzahlen . . . . .	49

## Abbildungsverzeichnis

2.1	Sequenzvergleich verschiedener LIM-Domänen . . . . .	13
2.2	LIM Domäne schematisch . . . . .	13
2.3	Strukturvergleich verschiedener LIM-Domänen . . . . .	14
2.4	Übersicht über Signalwege des IPP-Komplexes . . . . .	17
2.5	Übersicht ILK Struktur . . . . .	19
2.6	Übersicht FAK Struktur . . . . .	23
2.7	Übersicht Integrinrezeptoren . . . . .	28
2.8	Übersicht Integrinstruktur . . . . .	31
4.1	Fotografische Aufnahme Koloniebildungsassay ILK . . . . .	48
5.1	Pinch-1 Zelllinie, Bestrahlung 0-6 Gy in Adhäsion, Zelllinien . . . . .	59
5.2	Pinch-1 Zelllinie, Bestrahlung 0-6 Gy in Adhäsion, Substrate . . . . .	60
5.3	Pinch-1 Zelllinie, Bestrahlung 0-6 Gy in Suspension . . . . .	61
5.4	Pinch-1 Zelllinie, Behandlung mit Cisplatin . . . . .	62
5.5	Pinch-1 Zelllinie, Behandlung mit Mitomycin-C . . . . .	63
5.6	Pinch-1 Zelllinie, Bestrahlung 0-6 Gy in Suspension, Zeitwerte . . . . .	64
5.7	Pinch-1 Zelllinie, Bestrahlung 0-6 Gy in Suspension unter Serumentzug . . . . .	65
5.8	Pinch-1 <sup>rekon</sup> Zelllinien, Bestrahlung 0-6 Gy in Adhäsion, A . . . . .	66
5.9	Pinch-1 <sup>rekon</sup> Zelllinien, Bestrahlung 0-6 Gy in Adhäsion, B . . . . .	67
5.10	Pinch-1 <sup>rekon</sup> Zelllinien, Bestrahlung 0-6 Gy in Adhäsion, Vergleich . . . . .	68
5.11	ILK <sup>fl/fl</sup> und ILK <sup>-/-</sup> Zelllinien, Bestrahlung 0-6 Gy in Adhäsion . . . . .	69
5.12	ILK <sup>fl/fl</sup> und ILK <sup>-/-</sup> Zelllinien, Behandlung mit Cisplatin in Adhäsion . . . . .	70
5.13	Proliferationsbestimmung Pinch-1 <sup>fl/fl</sup> und Pinch-1 <sup>-/-</sup> . . . . .	71
5.14	Dotblot Fibronektinbestimmung . . . . .	72
5.15	Proteinexpression in verschiedenen Zelllinien . . . . .	73
5.16	Proteinexpression in verschiedenen Zelllinien, Korrelation . . . . .	74
5.17	Proteinexpression der Pinch-1 <sup>fl/fl</sup> und Pinch-1 <sup>-/-</sup> Zellen bei Bestrahlung . . . . .	76
5.18	Pinch-1 Expression in den retroviral infizierten Pinch-1 <sup>rekon</sup> Zellen . . . . .	78

5.19 $\gamma$ H2AX- und p53BP-Foci Zählung . . . . .	79
5.20 Immunfluoreszenz, subzelluläre Lokalisation von Pinch-1 in Pinch-1 <sup>fl/fl</sup> Zellen . . . . .	80
5.21 Immunfluoreszenz, subzelluläre Lokalisation von Pinch-1 in Pinch-1 <sup>rekon</sup> Zellen . . . . .	82
5.22 Immunfluoreszenz, Adhäsionsassay Pinch-1 <sup>fl/fl</sup> und Pinch-1 <sup>-/-</sup> . . . . .	83

## Literaturverzeichnis

- [1] Abdollahi, A., Griggs, D. W., Zieher, H., Roth, A., Lipson, K. E., Saffrich, R., Grone, H.-J., Hallahan, D. E., Reisfeld, R. A., Debus, J., Niethammer, A. G., and Huber, P. E. Inhibition of alpha(v)beta3 integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. *Clin Cancer Res*, 11(17):6270–6279, Sep 2005.
- [2] Abercrombie, M., Heaysman, J. E., and Pegrum, S. M. The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp Cell Res*, 67(2):359–367, Aug 1971.
- [3] Addison, C. L., Nor, J. E., Zhao, H., Linn, S. A., Polverini, P. J., and Delaney, C. E. The response of VEGF-stimulated endothelial cells to angiostatic molecules is substrate-dependent. *BMC Cell Biol*, 6:38, 2005.
- [4] Albert, J. M., Cao, C., Geng, L., Leavitt, L., Hallahan, D. E., and Lu, B. Integrin alpha v beta 3 antagonist Cilengitide enhances efficacy of radiotherapy in endothelial cell and non-small-cell lung cancer models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 65(5):1536–1543, Aug 2006.
- [5] Aoudjit, F. and Vuori, K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*, 20(36):4995–5004, Aug 2001.
- [6] Aronsohn, M. S., Brown, H. M., Hauptman, G., and Kornberg, L. J. Expression of focal adhesion kinase and phosphorylated focal adhesion kinase in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope*, 113(11):1944–1948, Nov 2003.
- [7] Attwell, S., Mills, J., Troussard, A., Wu, C., and Dedhar, S. Integration of cell attachment, cytoskeletal localization, and signaling by integrin-linked kinase (ILK), CH-ILKBP, and the tumor suppressor PTEN. *Mol Biol Cell*, 14(12):4813–4825, Dec 2003.
- [8] Augustin, H. G. Translating angiogenesis research into the clinic: the challenges ahead. *Br J Radiol*, 76 Spec No 1:3–10, 2003.

- [9] Batlle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*, 2(2):84–89, Feb 2000.
- [10] Baumann, M. and Krause, M. Targeting the epidermal growth factor receptor in radiotherapy: radiobiological mechanisms, preclinical and clinical results. *Radiother Oncol*, 72(3):257–266, Sep 2004.
- [11] Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382(6592):638–642, Aug 1996.
- [12] Beinke, C., Van Beuningen, D., and Cordes, N. Ionizing radiation modulates the expression and tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated proteins focal adhesion kinase (FAK) and its substrates p130cas and paxillin in A549 human lung carcinoma cells in vitro. *Int J Radiat Biol*, 79(9):721–731, Sep 2003.
- [13] Bock-Marquette, I., Saxena, A., White, M. D., Dimaio, J. M., and Srivastava, D. Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature*, 432(7016):466–472, Nov 2004.
- [14] Bouvard, D., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Aszodi, A., Bengtsson, T., Berna, A., and Fässler, R. Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ Res*, 89(3):211–223, Aug 2001.
- [15] Brakebusch, C. and Fässler, R. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J*, 22(10):2324–2333, May 2003.
- [16] Braun, A., Bordoy, R., Stanchi, F., Moser, M., Kostka, G. G., Ehler, E., Brandau, O., and Fässler, R. PINCH2 is a new five LIM domain protein, homologous to PINCH and localized to focal adhesions. *Exp Cell Res*, 284(2):239–250, Apr 2003.
- [17] Brizel, D. M., Albers, M. E., Fisher, S. R., Scher, R. L., Richtsmeier, W. J., Hars, V., George, S. L., Huang, A. T., and Prosnitz, L. R. Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med*, 338(25):1798–1804, Jun 1998.
- [18] Brooks, P. C., Clark, R. A., and Chersesh, D. A. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*, 264(5158):569–571, Apr 1994.

- [19] Brugarolas, J. and Kaelin, W. G. J. Dysregulation of HIF and VEGF is a unifying feature of the familial hamartoma syndromes. *Cancer Cell*, 6(1):7–10, Jul 2004.
- [20] Burke, P. A., DeNardo, S. J., Miers, L. A., Lamborn, K. R., Matzku, S., and DeNardo, G. L. Cilengitide targeting of alpha(v)beta(3) integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. *Cancer Res*, 62(15):4263–4272, Aug 2002.
- [21] Calalb, M. B., Polte, T. R., and Hanks, S. K. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*, 15(2):954–963, Feb 1995.
- [22] Campana, W. M., Myers, R. R., and Rearden, A. Identification of PINCH in Schwann cells and DRG neurons: shuttling and signaling after nerve injury. *Glia*, 41(3):213–223, Feb 2003.
- [23] Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J. C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282(5392):1318–1321, Nov 1998.
- [24] Caron, E. Rac signalling: a radical view. *Nat Cell Biol*, 5(3):185–187, Mar 2003.
- [25] Chu, H., Thievensen, I., Sixt, M., Lammermann, T., Waisman, A., Braun, A., Noegel, A. A., and Fassler, R. gamma-Parvin is dispensable for hematopoiesis, leukocyte trafficking, and T-cell-dependent antibody response. *Mol Cell Biol*, 26(5):1817–1825, Mar 2006.
- [26] Clark, E. A. and Brugge, J. S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, 268(5208):233–239, Apr 1995.
- [27] Clark, K. A., McGrail, M., and Beckerle, M. C. Analysis of PINCH function in *Drosophila* demonstrates its requirement in integrin-dependent cellular processes. *Development*, 130(12):2611–2621, Jun 2003.
- [28] Cooper, J. S., Pajak, T. F., Forastiere, A. A., Jacobs, J., Campbell, B. H., Saxman, S. B., Kish, J. A., Kim, H. E., Cmelak, A. J., Rotman, M., Machtay, M., Ensley, J. F., Chao, K. S. C., Schultz, C. J., Lee, N., and Fu, K. K. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 350(19):1937–1944, May 2004.

- [29] Cordes, N. Overexpression of hyperactive integrin-linked kinase leads to increased cellular radiosensitivity. *Cancer Res*, 64(16):5683–5692, Aug 2004.
- [30] Cordes, N. Integrin-mediated cell-matrix interactions for pro-survival and anti-apoptotic signaling after genotoxic injury. *Cancer Lett*, Oct 2006.
- [31] Cordes, N., Beinke, C., Plasswilm, L., and van Beuningen, D. Irradiation and various cytotoxic drugs enhance tyrosine phosphorylation and beta(1)-integrin clustering in human A549 lung cancer cells in a substratum-dependent manner in vitro. *Strahlenther Onkol*, 180(3):157–164, Mar 2004.
- [32] Cordes, N., Blaese, M. A., Meineke, V., and Van Beuningen, D. Ionizing radiation induces up-regulation of functional beta1-integrin in human lung tumour cell lines in vitro. *Int J Radiat Biol*, 78(5):347–357, May 2002.
- [33] Cordes, N., Hansmeier, B., Beinke, C., Meineke, V., and van Beuningen, D. Irradiation differentially affects substratum-dependent survival, adhesion, and invasion of glioblastoma cell lines. *Br J Cancer*, 89(11):2122–2132, Dec 2003.
- [34] Cordes, N. and Meineke, V. Cell adhesion-mediated radioresistance (CAM-RR). Extracellular matrix-dependent improvement of cell survival in human tumor and normal cells in vitro. *Strahlenther Onkol*, 179(5):337–344, May 2003.
- [35] Cordes, N., Seidler, J., Durzok, R., Geinitz, H., and Brakebusch, C. beta1-integrin-mediated signaling essentially contributes to cell survival after radiation-induced genotoxic injury. *Oncogene*, 25(9):1378–1390, Mar 2006.
- [36] Cordes, N. and van Beuningen, D. Cell adhesion to the extracellular matrix protein fibronectin modulates radiation-dependent G2 phase arrest involving integrin-linked kinase (ILK) and glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) in vitro. *Br J Cancer*, 88(9):1470–1479, May 2003.
- [37] Cordes, N. and van Beuningen, D. Arrest of human lung fibroblasts in G2 phase after irradiation is regulated by converging phosphatidylinositol-3 kinase and beta1-integrin signaling in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 58(2):453–462, Feb 2004.
- [38] Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, 16(22):10881–10890, Nov 1988.

- [39] Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A., and Dalton, W. S. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood*, 93(5):1658–1667, Mar 1999.
- [40] Damiano, J. S., Hazlehurst, L. A., and Dalton, W. S. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) protects the K562 chronic myelogenous leukemia cell line from apoptosis induced by BCR/ABL inhibition, cytotoxic drugs, and gamma-irradiation. *Leukemia*, 15(8):1232–1239, Aug 2001.
- [41] D’Amico, A. V., Manola, J., Loffredo, M., Renshaw, A. A., DellaCroce, A., and Kantoff, P. W. 6-month androgen suppression plus radiation therapy vs radiation therapy alone for patients with clinically localized prostate cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*, 292(7):821–827, Aug 2004.
- [42] Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91(2):231–241, Oct 1997.
- [43] Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103(2):239–252, Oct 2000.
- [44] de la Fuente, M. T., Casanova, B., Garcia-Gila, M., Silva, A., and Garcia-Pardo, A. Fibronectin interaction with alpha4beta1 integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax. *Leukemia*, 13(2):266–274, Feb 1999.
- [45] de la Fuente, M. T., Casanova, B., Moyano, J. V., Garcia-Gila, M., Sanz, L., Garcia-Marco, J., Silva, A., and Garcia-Pardo, A. Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *J Leukoc Biol*, 71(3):495–502, Mar 2002.
- [46] De Luca, G., Suryapranata, H., Stone, G. W., Antonucci, D., Tcheng, J. E., Neumann, F.-J., Van de Werf, F., Antman, E. M., and Topol, E. J. Abciximab as adjunctive therapy to reperfusion in acute ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized trials. *JAMA*, 293(14):1759–1765, Apr 2005.
- [47] Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase

- 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(19):11211–11216, Sep 1998.
- [48] Deng, J. T., Sutherland, C., Brautigan, D. L., Eto, M., and Walsh, M. P. Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase. *Biochem J*, 367(Pt 2):517–524, Oct 2002.
- [49] Dent, P., Yacoub, A., Fisher, P. B., Hagan, M. P., and Grant, S. MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene*, 22(37):5885–5896, Sep 2003.
- [50] Dikomey, E., Borgmann, K., Brammer, I., and Kasten-Pisula, U. Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal diploid human fibroblasts. *Toxicology*, 193(1-2):125–135, Nov 2003.
- [51] Dikomey, E., Dahm-Daphi, J., Brammer, I., Martensen, R., and Kaina, B. Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int J Radiat Biol*, 73(3):269–278, Mar 1998.
- [52] Dong, L., Sun, H., Liu, W., Tao, D., Zhang, Y., and Xu, H. Effect of ligustrazine on expression of adherent molecule CD49d and cyclin D2 in hematopoietic cells in acute radiation injured mice. *J Tongji Med Univ*, 19(2):99–101, 1999.
- [53] Dougherty, G. W., Chopp, T., Qi, S.-M., and Cutler, M. L. The Ras suppressor Rsu-1 binds to the LIM 5 domain of the adaptor protein PINCH1 and participates in adhesion-related functions. *Exp Cell Res*, 306(1):168–179, May 2005.
- [54] Duxbury, M. S., Ito, H., Benoit, E., Waseem, T., Ashley, S. W., and Whang, E. E. RNA interference demonstrates a novel role for integrin-linked kinase as a determinant of pancreatic adenocarcinoma cell gemcitabine chemoresistance. *Clin Cancer Res*, 11(9):3433–3438, May 2005.
- [55] Eble, J. A. and Haier, J. Integrins in cancer treatment. *Curr Cancer Drug Targets*, 6(2):89–105, Mar 2006.
- [56] Eke, I., Sandfort, V., Mischkus, A., Baumann, M., and Cordes, N. Antiproliferative effects of EGFR tyrosine kinase inhibition and radiation-induced genotoxic injury are attenuated by adhesion to fibronectin. *Radiother Oncol*, 80(2):178–184, Aug 2006.
- [57] Fridman, R., Giaccone, G., Kanemoto, T., Martin, G. R., Gazdar, A. F., and Mulshine, J. L. Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the

- tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(17):6698–6702, Sep 1990.
- [58] Frisch, S. M., Vuori, K., Ruoslahti, E., and Chan-Hui, P. Y. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol*, 134(3):793–799, Aug 1996.
- [59] Fritsch, P. *Dermatologie Venerologie*. Springer-Verlag, zweite edition, 2003.
- [60] Fu, M., Wang, C., Rao, M., Wu, X., Bouras, T., Zhang, X., Li, Z., Jiao, X., Yang, J., Li, A., Perkins, N. D., Thimmapaya, B., Kung, A. L., Munoz, A., Giordano, A., Lisanti, M. P., and Pestell, R. G. Cyclin D1 represses p300 transactivation through a cyclin-dependent kinase-independent mechanism. *J Biol Chem*, 280(33):29728–29742, Aug 2005.
- [61] Fuks, Z., Vlodavsky, I., Andreeff, M., McLoughlin, M., and Haimovitz-Friedman, A. Effects of extracellular matrix on the response of endothelial cells to radiation in vitro. *Eur J Cancer*, 28A(4-5):725–731, 1992.
- [62] Fukuda, T., Chen, K., Shi, X., and Wu, C. PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival. *J Biol Chem*, 278(51):51324–51333, Dec 2003.
- [63] Gao, J., Arberman, G., Rearden, A., and Sun, X.-F. Stromal staining for PINCH is an independent prognostic indicator in colorectal cancer. *Neoplasia*, 6(6):796–801, Nov 2004.
- [64] Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K. M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix–cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(11):793–805, Nov 2001.
- [65] George, E. L., Georges-Labouesse, E. N., Patel-King, R. S., Rayburn, H., and Hynes, R. O. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*, 119(4):1079–1091, Dec 1993.
- [66] Grashoff, C., Aszodi, A., Sakai, T., Hunziker, E. B., and Fässler, R. Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Rep*, 4(4):432–438, Apr 2003.

- [67] Grashoff, C., Thievensen, I., Lorenz, K., Ussar, S., and Fässler, R. Integrin-linked kinase: integrin's mysterious partner. *Curr Opin Cell Biol*, 16(5):565–571, Oct 2004.
- [68] Grisar-Granovsky, S., Salah, Z., Maoz, M., Pruss, D., Beller, U., and Bar-Shavit, R. Differential expression of protease activated receptor 1 (Par1) and pY397FAK in benign and malignant human ovarian tissue samples. *Int J Cancer*, 113(3):372–378, Jan 2005.
- [69] Guilford, P., Hopkins, J., Harraway, J., McLeod, M., McLeod, N., Harawira, P., Taite, H., Scoular, R., Miller, A., and Reeve, A. E. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*, 392(6674):402–405, Mar 1998.
- [70] Guo, L. and Wu, C. Regulation of fibronectin matrix deposition and cell proliferation by the PINCH-ILK-CH-ILKBP complex. *FASEB J*, 16(10):1298–1300, Aug 2002.
- [71] Guo, W. and Giancotti, F. G. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(10):816–826, Oct 2004.
- [72] Gutenberg, A., Bruck, W., Buchfelder, M., and Ludwig, H. C. Expression of tyrosine kinases FAK and Pyk2 in 331 human astrocytomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, 108(3):224–230, Sep 2004.
- [73] Gutheil, J. C., Campbell, T. N., Pierce, P. R., Watkins, J. D., Huse, W. D., Bodkin, D. J., and Cheresch, D. A. Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin  $\alpha v \beta 3$ . *Clin Cancer Res*, 6(8):3056–3061, Aug 2000.
- [74] Hallahan, D., Geng, L., Qu, S., Scarfone, C., Giorgio, T., Donnelly, E., Gao, X., and Clanton, J. Integrin-mediated targeting of drug delivery to irradiated tumor blood vessels. *Cancer Cell*, 3(1):63–74, Jan 2003.
- [75] Hanahan, D. and Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57–70, Jan 2000.
- [76] Hanks, S. K., Ryzhova, L., Shin, N.-Y., and Brabek, J. Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front Biosci*, 8:982–996, May 2003.
- [77] Hannigan, G., Troussard, A. A., and Dedhar, S. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer*, 5(1):51–63, Jan 2005.

- [78] Hartsell, W. F., Scott, C. B., Bruner, D. W., Scarantino, C. W., Ivker, R. A., Roach, M. r., Suh, J. H., Demas, W. F., Movsas, B., Petersen, I. A., Konski, A. A., Cleeland, C. S., Janjan, N. A., and DeSilvio, M. Randomized trial of short- versus long-course radiotherapy for palliation of painful bone metastases. *J Natl Cancer Inst*, 97(11):798–804, Jun 2005. Clinical Trial.
- [79] Hayashi, I., Vuori, K., and Liddington, R. C. The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. *Nat Struct Biol*, 9(2):101–106, Feb 2002.
- [80] Hazlehurst, L. A., Argilagos, R. F., Emmons, M., Boulware, D., Beam, C. A., Sullivan, D. M., and Dalton, W. S. Cell adhesion to fibronectin (CAM-DR) influences acquired mitoxantrone resistance in U937 cells. *Cancer Res*, 66(4):2338–2345, Feb 2006.
- [81] Hazlehurst, L. A., Damiano, J. S., Buyuksal, I., Pledger, W. J., and Dalton, W. S. Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene*, 19(38):4319–4327, Sep 2000.
- [82] Hazlehurst, L. A., Valkov, N., Wisner, L., Storey, J. A., Boulware, D., Sullivan, D. M., and Dalton, W. S. Reduction in drug-induced DNA double-strand breaks associated with beta1 integrin-mediated adhesion correlates with drug resistance in U937 cells. *Blood*, 98(6):1897–1903, Sep 2001.
- [83] Hess, F., Estrugo, D., Fischer, A., Belka, C., and Cordes, N. Integrin-linked kinase interacts with caspase-9 and -8 in an adhesion-dependent manner for promoting radiation-induced apoptosis in human leukemia cells. *Oncogene*, Aug 2006.
- [84] Hobert, O., Moerman, D. G., Clark, K. A., Beckerle, M. C., and Ruvkun, G. A conserved LIM protein that affects muscular adherens junction integrity and mechanosensory function in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*, 144(1):45–57, Jan 1999.
- [85] Hodkinson, P. S., Elliott, T., Wong, W. S., Rintoul, R. C., Mackinnon, A. C., Haslett, C., and Sethi, T. ECM overrides DNA damage-induced cell cycle arrest and apoptosis in small-cell lung cancer cells through beta1 integrin-dependent activation of PI3-kinase. *Cell Death Differ*, 13(10):1776–1788, Oct 2006.

- [86] Hood, J. D. and Cheresch, D. A. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*, 2(2):91–100, Feb 2002.
- [87] Hsia, D. A., Mitra, S. K., Hauck, C. R., Strebblow, D. N., Nelson, J. A., Ilic, D., Huang, S., Li, E., Nemerow, G. R., Leng, J., Spencer, K. S. R., Cheresch, D. A., and Schlaepfer, D. D. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol*, 160(5):753–767, Mar 2003.
- [88] Hynes, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69(1):11–25, Apr 1992.
- [89] Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6):673–687, Sep 2002.
- [90] Itoh, S., Maeda, T., Shimada, M., Aishima, S.-i., Shirabe, K., Tanaka, S., and Maehara, Y. Role of expression of focal adhesion kinase in progression of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10(8):2812–2817, Apr 2004.
- [91] Iwabuchi, K., Basu, B. P., Kysela, B., Kurihara, T., Shibata, M., Guan, D., Cao, Y., Hamada, T., Imamura, K., Jeggo, P. A., Date, T., and Doherty, A. J. Potential role for 53BP1 in DNA end-joining repair through direct interaction with DNA. *J Biol Chem*, 278(38):36487–36495, Sep 2003.
- [92] Jockusch, B. M., Bubeck, P., Giehl, K., Kroemker, M., Moschner, J., Rothkegel, M., Rudiger, M., Schluter, K., Stanke, G., and Winkler, J. The molecular architecture of focal adhesions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11:379–416, 1995.
- [93] Kadrmas, J. L. and Beckerle, M. C. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(11):920–931, Nov 2004.
- [94] Kadrmas, J. L., Smith, M. A., Clark, K. A., Pronovost, S. M., Muster, N., Yates, J. R. r., and Beckerle, M. C. The integrin effector PINCH regulates JNK activity and epithelial migration in concert with Ras suppressor 1. *J Cell Biol*, 167(6):1019–1024, Dec 2004.
- [95] Kao, J., Milano, M. T., Javaheri, A., Garofalo, M. C., Chmura, S. J., Weichselbaum, R. R., and Kron, S. J. gamma-H2AX as a therapeutic target for improving the efficacy of radiation therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 6(3):197–205, May 2006.

- [96] Kasahara, T., Koguchi, E., Funakoshi, M., Aizu-Yokota, E., and Sonoda, Y. Antiapoptotic action of focal adhesion kinase (FAK) against ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal*, 4(3):491–499, Jun 2002.
- [97] Kato, A. The biologic and clinical spectrum of Glanzmann's thrombasthenia: implications of integrin alpha IIb beta 3 for its pathogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*, 26(1):1–23, May 1997.
- [98] Katz, B.-Z., Romer, L., Miyamoto, S., Volberg, T., Matsumoto, K., Cukierman, E., Geiger, B., and Yamada, K. M. Targeting membrane-localized focal adhesion kinase to focal adhesions: roles of tyrosine phosphorylation and SRC family kinases. *J Biol Chem*, 278(31):29115–29120, Aug 2003.
- [99] Kim, S. J., Park, J. W., Yoon, J. S., Mok, J. O., Kim, Y. J., Park, H. K., Kim, C. H., Byun, D. W., Lee, Y. J., Jin, S. Y., Suh, K. I., and Yoo, M. H. Increased expression of focal adhesion kinase in thyroid cancer: immunohistochemical study. *J Korean Med Sci*, 19(5):710–715, Oct 2004.
- [100] Kirchner, J., Kam, Z., Tzur, G., Bershadsky, A. D., and Geiger, B. Live-cell monitoring of tyrosine phosphorylation in focal adhesions following microtubule disruption. *J Cell Sci*, 116(Pt 6):975–986, Mar 2003.
- [101] Krause, M., Hessel, F., Zips, D., Hilberg, F., and Baumann, M. Adjuvant inhibition of the epidermal growth factor receptor after fractionated irradiation of FaDu human squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol*, 72(1):95–101, Jul 2004.
- [102] Kumar, A. S., Naruszewicz, I., Wang, P., Leung-Hagesteijn, C., and Hannigan, G. E. ILKAP regulates ILK signaling and inhibits anchorage-independent growth. *Oncogene*, 23(19):3454–3461, Apr 2004.
- [103] Langer-Gould, A., Atlas, S. W., Green, A. J., Bollen, A. W., and Pelletier, D. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *N Engl J Med*, 353(4):375–381, Jul 2005.
- [104] Legate, K. R., Montanez, E., Kudlacek, O., and Fässler, R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(1):20–31, Jan 2006.
- [105] Leung-Hagesteijn, C., Mahendra, A., Naruszewicz, I., and Hannigan, G. E. Modulation of integrin signal transduction by ILKAP, a protein phosphatase 2C associating with the integrin-linked kinase, ILK1. *EMBO J*, 20(9):2160–2170, May 2001.

- [106] Lewis, J. M., Truong, T. N., and Schwartz, M. A. Integrins regulate the apoptotic response to DNA damage through modulation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(6):3627–3632, Mar 2002.
- [107] Li, S., Bordoy, R., Stanchi, F., Moser, M., Braun, A., Kudlacek, O., Wewer, U. M., Yurchenco, P. D., and Fässler, R. PINCH1 regulates cell-matrix and cell-cell adhesions, cell polarity and cell survival during the peri-implantation stage. *J Cell Sci*, 118(Pt 13):2913–2921, Jul 2005.
- [108] Liang, X., Zhou, Q., Li, X., Sun, Y., Lu, M., Dalton, N., Ross, J. J., and Chen, J. PINCH1 plays an essential role in early murine embryonic development but is dispensable in ventricular cardiomyocytes. *Mol Cell Biol*, 25(8):3056–3062, Apr 2005.
- [109] Lim, Y., Han, I., Jeon, J., Park, H., Bahk, Y.-Y., and Oh, E.-S. Phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861 is crucial for Ras transformation of fibroblasts. *J Biol Chem*, 279(28):29060–29065, Jul 2004.
- [110] Liotta, L. A. and Kohn, E. C. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 411(6835):375–379, May 2001.
- [111] Liu, G., Guibao, C. D., and Zheng, J. Structural insight into the mechanisms of targeting and signaling of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol*, 22(8):2751–2760, Apr 2002.
- [112] Lynch, D. K., Ellis, C. A., Edwards, P. A., and Hiles, I. D. Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism. *Oncogene*, 18(56):8024–8032, Dec 1999.
- [113] Manser, E., Loo, T. H., Koh, C. G., Zhao, Z. S., Chen, X. Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T., and Lim, L. PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell*, 1(2):183–192, Jan 1998.
- [114] Masuelli, L. and Cutler, M. L. Increased expression of the Ras suppressor Rsu-1 enhances Erk-2 activation and inhibits Jun kinase activation. *Mol Cell Biol*, 16(10):5466–5476, Oct 1996.
- [115] Maubant, S., Cruet-Hennequart, S., Poulain, L., Carreiras, F., Sichel, F., Luis, J., Staedel, C., and Gauduchon, P. Altered adhesion properties and alphav integrin

- expression in a cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell line. *Int J Cancer*, 97(2):186–194, Jan 2002.
- [116] McLean, G. W., Carragher, N. O., Avizienyte, E., Evans, J., Brunton, V. G., and Frame, M. C. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer*, 5(7):505–515, Jul 2005.
- [117] Meineke, V., Muller, K., Ridi, R., Cordes, N., Kohn, F.-M., Mayerhofer, A., Ring, J., and van Beuningen, D. Development and evaluation of a skin organ model for the analysis of radiation effects. *Strahlenther Onkol*, 180(2):102–108, Feb 2004.
- [118] Menendez, J. A., Vellon, L., Mehmi, I., Teng, P. K., Griggs, D. W., and Lupu, R. A novel CYR61-triggered 'CYR61-alpha3 integrin loop' regulates breast cancer cell survival and chemosensitivity through activation of ERK1/ERK2 MAPK signaling pathway. *Oncogene*, 24(5):761–779, Jan 2005.
- [119] Miller, D. H., Khan, O. A., Sheremata, W. A., Blumhardt, L. D., Rice, G. P. A., Libonati, M. A., Willmer-Hulme, A. J., Dalton, C. M., Miszkiel, K. A., and O'Connor, P. W. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 348(1):15–23, Jan 2003.
- [120] Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., and Rini, J. M. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature*, 380(6572):360–364, Mar 1996.
- [121] Nieder, C., Wiedenmann, N., Andratschke, N., and Molls, M. Current status of angiogenesis inhibitors combined with radiation therapy. *Cancer Treat Rev*, 32(5):348–364, Aug 2006.
- [122] Nikolopoulos, S. N. and Turner, C. E. Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. *J Cell Biol*, 151(7):1435–1448, Dec 2000.
- [123] Nishimura, M., Machida, K., Imaizumi, M., Abe, T., Umeda, T., Takeshima, E., Watanabe, T., Ohnishi, Y., Takagi, K., and Hamaguchi, M. Tyrosine phosphorylation of 100-130 kDa proteins in lung cancer correlates with poor prognosis. *Br J Cancer*, 74(5):780–787, Sep 1996.

- [124] Nishimura, R., Li, W., Kashishian, A., Mondino, A., Zhou, M., Cooper, J., and Schlessinger, J. Two signaling molecules share a phosphotyrosine-containing binding site in the platelet-derived growth factor receptor. *Mol Cell Biol*, 13(11):6889–6896, Nov 1993.
- [125] Novak, A., Hsu, S. C., Leung-Hagesteijn, C., Radeva, G., Papkoff, J., Montesano, R., Roskelley, C., Grosschedl, R., and Dedhar, S. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(8):4374–4379, Apr 1998.
- [126] Obara, S., Nakata, M., Takeshima, H., Katagiri, H., Asano, T., Oka, Y., Maruyama, I., and Kuratsu, J.-I. Integrin-linked kinase (ILK) regulation of the cell viability in PTEN mutant glioblastoma and in vitro inhibition by the specific COX-2 inhibitor NS-398. *Cancer Lett*, 208(1):115–122, May 2004.
- [127] Owen, J. D., Ruest, P. J., Fry, D. W., and Hanks, S. K. Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol*, 19(7):4806–4818, Jul 1999.
- [128] Park, C. C., Zhang, H., Pallavicini, M., Gray, J. W., Baehner, F., Park, C. J., and Bissell, M. J. Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res*, 66(3):1526–1535, Feb 2006.
- [129] Pavletich, N. P. and Pabo, C. O. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*, 252(5007):809–817, May 1991.
- [130] Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Mawji, N., Deng, J. T., Leung, D., Yan, J., Sanghera, J., Walsh, M. P., and Dedhar, S. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J Biol Chem*, 276(29):27462–27469, Jul 2001.
- [131] Phillips, D. R. and Scarborough, R. M. Clinical pharmacology of eptifibatide. *Am J Cardiol*, 80(4A):11B–20B, Aug 1997.

- [132] Plopper, G. E., McNamee, H. P., Dike, L. E., Bojanowski, K., and Ingber, D. E. Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex. *Mol Biol Cell*, 6(10):1349–1365, Oct 1995.
- [133] Posner, M. R. and Wirth, L. J. Cetuximab and radiotherapy for head and neck cancer. *N Engl J Med*, 354(6):634–636, Feb 2006.
- [134] Prutzman, K. C., Gao, G., King, M. L., Iyer, V. V., Mueller, G. A., Schaller, M. D., and Campbell, S. L. The focal adhesion targeting domain of focal adhesion kinase contains a hinge region that modulates tyrosine 926 phosphorylation. *Structure*, 12(5):881–891, May 2004.
- [135] Puck, T. T. and Marcus, P. I. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med*, 103(5):653–666, May 1956.
- [136] Qian, Y., Zhong, X., Flynn, D. C., Zheng, J. Z., Qiao, M., Wu, C., Dedhar, S., Shi, X., and Jiang, B.-H. ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling. *Oncogene*, 24(19):3154–3165, Apr 2005.
- [137] Rauch, F. and Glorieux, F. H. Osteogenesis imperfecta. *Lancet*, 363(9418):1377–1385, Apr 2004.
- [138] Rearden, A. A new LIM protein containing an autoepitope homologous to senescent cell antigen. *Biochem Biophys Res Commun*, 201(3):1124–1131, Jun 1994.
- [139] Reddig, P. J. and Juliano, R. L. Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev*, 24(3):425–439, Sep 2005.
- [140] Riley, P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*, 65(1):27–33, Jan 1994.
- [141] Roach, M. r., DeSilvio, M., Lawton, C., Uhl, V., Machtay, M., Seider, M. J., Rotman, M., Jones, C., Asbell, S. O., Valicenti, R. K., Han, S., Thomas, C. R. J., and Shipley, W. S. Phase III trial comparing whole-pelvic versus prostate-only radiotherapy and neoadjuvant versus adjuvant combined androgen suppression: Radiation Therapy Oncology Group 9413. *J Clin Oncol*, 21(10):1904–1911, May 2003.
- [142] Rundhaug, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 9(2):267–285, Apr 2005.

- [143] Sakai, T., Li, S., Docheva, D., Grashoff, C., Sakai, K., Kostka, G., Braun, A., Pfeifer, A., Yurchenco, P. D., and Fässler, R. Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes Dev*, 17(7):926–940, Apr 2003.
- [144] Sandborn, W. J., Colombel, J. F., Enns, R., Feagan, B. G., Hanauer, S. B., Lawrance, I. C., Panaccione, R., Sanders, M., Schreiber, S., Targan, S., van Deventer, S., Goldblum, R., Despain, D., Hogge, G. S., and Rutgeerts, P. Natalizumab induction and maintenance therapy for Crohn’s disease. *N Engl J Med*, 353(18):1912–1925, Nov 2005.
- [145] Sapan, C. V., Lundblad, R. L., and Price, N. C. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol Appl Biochem*, 29 ( Pt 2):99–108, Apr 1999.
- [146] Schmeichel, K. L. and Beckerle, M. C. The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell*, 79(2):211–219, Oct 1994.
- [147] Schwartz, M. A. and Assoian, R. K. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci*, 114(Pt 14):2553–2560, Jul 2001.
- [148] Seidler, J., Durzok, R., Brakebusch, C., and Cordes, N. Interactions of the integrin subunit beta1A with protein kinase B/Akt, p130Cas and paxillin contribute to regulation of radiation survival. *Radiother Oncol*, 76(2):129–134, Aug 2005.
- [149] Sepulveda, J. L., Gkretsi, V., and Wu, C. Assembly and signaling of adhesion complexes. *Curr Top Dev Biol*, 68:183–225, 2005.
- [150] Sethi, T., Rintoul, R. C., Moore, S. M., MacKinnon, A. C., Salter, D., Choo, C., Chilvers, E. R., Dransfield, I., Donnelly, S. C., Strieter, R., and Haslett, C. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med*, 5(6):662–668, Jun 1999.
- [151] Shain, K. H. and Dalton, W. S. Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR. *Mol Cancer Ther*, 1(1):69–78, Nov 2001.

- [152] Simon, E. L., Goel, H. L., Teider, N., Wang, T., Languino, L. R., and Fitzgerald, T. J. High dose fractionated ionizing radiation inhibits prostate cancer cell adhesion and beta(1) integrin expression. *Prostate*, 64(1):83–91, Jun 2005.
- [153] Stanchi, F., Bordoy, R., Kudlacek, O., Braun, A., Pfeifer, A., Moser, M., and Fässler, R. Consequences of loss of PINCH2 expression in mice. *J Cell Sci*, 118(Pt 24):5899–5910, Dec 2005.
- [154] Stupack, D. G., Puente, X. S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C. M., and Cheresch, D. A. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol*, 155(3):459–470, Oct 2001.
- [155] Symonds, R. P. Recent advances: Radiotherapy. *BMJ*, 323(7321):1107–1110, Nov 2001.
- [156] Tachibana, K., Sato, T., D’Avirro, N., and Morimoto, C. Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. *J Exp Med*, 182(4):1089–1099, Oct 1995.
- [157] Takagi, J., Erickson, H. P., and Springer, T. A. C-terminal opening mimics ‘inside-out’ activation of integrin alpha5beta1. *Nat Struct Biol*, 8(5):412–416, May 2001.
- [158] Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T., and Springer, T. A. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, 110(5):599–511, Sep 2002.
- [159] Tamagiku, Y., Sonoda, Y., Kunisawa, M., Ichikawa, D., Murakami, Y., Aizu-Yokota, E., and Kasahara, T. Down-regulation of procaspase-8 expression by focal adhesion kinase protects HL-60 cells from TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 323(2):445–452, Oct 2004.
- [160] Tan, C., Costello, P., Sanghera, J., Dominguez, D., Baulida, J., de Herreros, A. G., and Dedhar, S. Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC-/- human colon carcinoma cells. *Oncogene*, 20(1):133–140, Jan 2001.
- [161] Tang, J., Feng, G. S., and Li, W. Induced direct binding of the adapter protein Nck to the GTPase-activating protein-associated protein p62 by epidermal growth factor. *Oncogene*, 15(15):1823–1832, Oct 1997.

- [162] Tetsu, O. and McCormick, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 398(6726):422–426, Apr 1999.
- [163] Toker, A. and Cantley, L. C. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*, 387(6634):673–676, Jun 1997.
- [164] Toy, E., Macbeth, F., Coles, B., Melville, A., and Eastwood, A. Palliative thoracic radiotherapy for non-small-cell lung cancer: a systematic review. *Am J Clin Oncol*, 26(2):112–120, Apr 2003.
- [165] Tsuda, T., Marinetti, M. R., Masuelli, L., and Cutler, M. L. The Ras suppressor RSU-1 localizes to 10p13 and its expression in the U251 glioblastoma cell line correlates with a decrease in growth rate and tumorigenic potential. *Oncogene*, 11(2):397–403, Jul 1995.
- [166] Tu, Y., Li, F., Goicoechea, S., and Wu, C. 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(3):2425–2434, Mar 1999.
- [167] Tu, Y., Li, F., and Wu, C. Nck-2, a novel Src homology2/3-containing adaptor protein that interacts with the LIM-only protein PINCH and components of growth factor receptor kinase-signaling pathways. *Mol Biol Cell*, 9(12):3367–3382, Dec 1998.
- [168] Uhm, J. H., Dooley, N. P., Kyritsis, A. P., Rao, J. S., and Gladson, C. L. Vitronectin, a glioma-derived extracellular matrix protein, protects tumor cells from apoptotic death. *Clin Cancer Res*, 5(6):1587–1594, Jun 1999.
- [169] Velyvis, A., Yang, Y., Wu, C., and Qin, J. Solution structure of the focal adhesion adaptor PINCH LIM1 domain and characterization of its interaction with the integrin-linked kinase ankyrin repeat domain. *J Biol Chem*, 276(7):4932–4939, Feb 2001.
- [170] Wang, X.-Y., Liu, T., Zhu, C.-Z., Li, Y., Sun, R., Sun, C.-Y., and Wang, A.-X. [Expression of KAI1, MRP-1, and FAK proteins in lung cancer detected by high-density tissue microarray]. *Ai Zheng*, 24(9):1091–1095, Sep 2005.
- [171] Wang-Rodriguez, J., Dreilinger, A. D., Alsharabi, G. M., and Rearden, A. The signaling adapter protein PINCH is up-regulated in the stroma of common cancers, notably at invasive edges. *Cancer*, 95(6):1387–1395, Sep 2002.

- [172] Ward, J. F. The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. *Int J Radiat Biol*, 57(6):1141–1150, Jun 1990.
- [173] Watcharasit, P., Bijur, G. N., Song, L., Zhu, J., Chen, X., and Jope, R. S. Glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) binds to and promotes the actions of p53. *J Biol Chem*, 278(49):48872–48879, Dec 2003.
- [174] Watcharasit, P., Bijur, G. N., Zmijewski, J. W., Song, L., Zmijewska, A., Chen, X., Johnson, G. V. W., and Jope, R. S. Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12):7951–7955, Jun 2002.
- [175] Watermann, D. O., Gabriel, B., Jager, M., Orłowska-Volk, M., Hasenburg, A., zur Hausen, A., Gitsch, G., and Stickeler, E. Specific induction of pp125 focal adhesion kinase in human breast cancer. *Br J Cancer*, 93(6):694–698, Sep 2005.
- [176] Weichselbaum, R. R., Dahlberg, W., and Little, J. B. Inherently radioresistant cells exist in some human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(14):4732–4735, Jul 1985.
- [177] Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R., and Folkman, J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*, 324(1):1–8, Jan 1991.
- [178] Weisel, J. W., Nagaswami, C., Vilaire, G., and Bennett, J. S. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J Biol Chem*, 267(23):16637–16643, Aug 1992.
- [179] Werb, Z., Vu, T. H., Rinkenberger, J. L., and Coussens, L. M. Matrix-degrading proteases and angiogenesis during development and tumor formation. *APMIS*, 107(1):11–18, Jan 1999.
- [180] Wu, C. The PINCH-ILK-parvin complexes: assembly, functions and regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1692(2-3):55–62, Jul 2004.
- [181] Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L., and Arnaout, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science*, 294(5541):339–345, Oct 2001.

- [182] Xu, Z., Fukuda, T., Li, Y., Zha, X., Qin, J., and Wu, C. Molecular dissection of PINCH-1 reveals a mechanism of coupling and uncoupling of cell shape modulation and survival. *J Biol Chem*, 280(30):27631–27637, Jul 2005.
- [183] Zamir, E. and Geiger, B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*, 114(Pt 20):3583–3590, Oct 2001.
- [184] Zent, R., Ailenberg, M., Downey, G. P., and Silverman, M. ROS stimulate reorganization of mesangial cell-collagen gels by tyrosine kinase signaling. *Am J Physiol*, 276(2 Pt 2):278–287, Feb 1999.
- [185] Zhang, H., Ozaki, I., Mizuta, T., Matsushashi, S., Yoshimura, T., Hisatomi, A., Tadano, J., Sakai, T., and Yamamoto, K. Beta 1-integrin protects hepatoma cells from chemotherapy induced apoptosis via a mitogen-activated protein kinase dependent pathway. *Cancer*, 95(4):896–906, Aug 2002.
- [186] Zhang, Y., Chen, K., Guo, L., and Wu, C. Characterization of PINCH-2, a new focal adhesion protein that regulates the PINCH-1-ILK interaction, cell spreading, and migration. *J Biol Chem*, 277(41):38328–38338, Oct 2002.
- [187] Zhang, Y., Chen, K., Tu, Y., Velyvis, A., Yang, Y., Qin, J., and Wu, C. Assembly of the PINCH-ILK-CH-ILKBP complex precedes and is essential for localization of each component to cell-matrix adhesion sites. *J Cell Sci*, 115(Pt 24):4777–4786, Dec 2002.
- [188] Zhang, Y., Chen, K., Tu, Y., and Wu, C. Distinct roles of two structurally closely related focal adhesion proteins, alpha-parvins and beta-parvins, in regulation of cell morphology and survival. *J Biol Chem*, 279(40):41695–41705, Oct 2004.
- [189] Zhang, Y., Guo, L., Chen, K., and Wu, C. A critical role of the PINCH-integrin-linked kinase interaction in the regulation of cell shape change and migration. *J Biol Chem*, 277(1):318–326, Jan 2002.

## Lebenslauf

### Veit Sandfort

Geburtsdatum: 11. August 1977  
Geburtsort: Heidenheim, Württemberg  
Familienstand: ledig

#### Schulbildung

---

09/83-06/96  
Grundschule Steinheim  
Max-Planck-Gymnasium  
Heidenheim

#### Medizinstudium

---

11/97-10/99  
10/99-10/01  
10/01-04/06  
04/05-04/06  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Christian-Albrecht-Universität Kiel  
Technischen Universität München  
Praktisches Jahr

#### Dissertation

---

seit 05/04  
am Institut für Radiobiologie der  
Bundeswehr in München zum Thema  
«Untersuchungen an murinen Pinch-1<sup>fl/fl</sup>  
und Pinch-1<sup>-/-</sup> Fibroblasten zur Rolle von  
Pinch-1 für die zelluläre Strahlenreaktion»

#### Beruf

---

seit 12/06  
Assistenzarzt, Gastroenterologie, Charité  
Campus Mitte.

## Danksagung

Ich möchte mich besonders bei meinem Doktorvater Herrn Priv. Doz. Dr. med. N. Cordes bedanken, der mir ein sehr interessantes und spannendes Thema zur Verfügung gestellt hat und diese Arbeit durch seine hervorragende Betreuung und sein kontinuierliches konstruktives Engagement ermöglicht hat.

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

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

Die Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) war von großer Bedeutung für diese Arbeit. Ich danke insbesondere Herrn Prof. Dr. med R. Fässler (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) und F. Stanchi für die Bereitstellung der verwendeten Zelllinien sowie die vielen wertvollen Anregungen.

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