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

Untersuchungen zum Einfluss von β1 Integrin vermittelten Signaltransduktionswegen auf das Überleben von Fibroblasten nach Exposition mit ionisierender Strahlung

Julia C. Seidler

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. G. Multhoff

Die Dissertation wurde am 26.02.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.06.2008 angenommen.

Meinem Vater
Harald Seidler

Kurz-Zusammenfassung

Zelladhäsions-vermittelte Radioresistenz ist ein bekanntes Phänomen, dass kurative Krebstherapien erschwert. Zur Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen wurden in dieser Arbeit zwei Zelllinien, GD25β1A (mit funktionsfähigem β1 Integrin) und GD25β1B (mit mutiertem β1 Integrin), in klonogenem Zellüberleben und Aktivität intrazellulärer Signalmoleküle miteinander verglichen. Hierbei wurden auf Fibronektin, KollagenIII, β1-Integrin-IgG oder Poly-L-Lysine kultivierte Zellen in An- und Abwesenheit von Serum und Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) Inhibitoren mit 0-6 Gy bestrahlt. Adhäsion von GD25β1A Zellen an diesen Matrixproteinen oder β1-IgG zeigte einen Wachstumsfaktor-unabhängigen Überlebensvorteil nach Bestrahlung. Dieser Überlebensvorteil ließ sich durch PI3K-vermittelte Akt Stimulation durch β1 Integrine erklären. Die Mediatoren dieser Wechselwirkungen waren die fokale Adhäsionskinase (FAK), Crk-assoziiertes Substrat (p130Cas), Paxillin und die C-Jun NH2 terminale Kinase (JNK). Diese Ergebnisse illustrieren die essentielle Rolle von β1 Integrinen im Zellüberleben nach genotoxischer Schädigung und postulieren spezifische molekulare anti-β 1 Integrin Therapien zur Optimierung der Radioonkologie.

Short Abstract

Integrin-mediated adhesion to extracellular matrix proteins confers resistance to radiation- or drug-induced genotoxic injury. To analyse the underlying mechanisms specific for β1-integrins, wild-type β1A-integrin-expressing GD25βA cells were compared to GD25β1B cells, which express signaling-incompetent β1B variants. Cells grown on fibronectin, collagen-III, β1-integrin-IgG or poly-l-lysine were exposed to 0-6 Gy X-rays in presence or depletion of growth factors and phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) inhibitors. We found that β1A-integrin-mediated adhesion to fibronectin, collagen-III or β1-IgG was essential for cell survival after radiation-induced genotoxic injury. Mediated by PI3K, prosurvival β1A-integrin/Akt signaling was critically involved in this process. Additionally, the β1-integrin downstream targets p130Cas and paxillin-impaired survival-regulating PI3K-dependent JNK. These findings suggest β1-integrins as critical regulators of cell survival after radiation-induced genotoxic injury. Elucidation of the molecular circuitry of prosurvival β1-integrin-mediated signaling in tumor cells may promote the development of innovative molecular-targeted therapeutic antitumor strategies.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

2 Grundlagen **3**

2.1 Molekularbiologische Grundbegriffe 3

2.1.1 Molekularbiologie von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen 3

2.1.2 Die extrazelluläre Matrix (ECM) 4

2.2 Integrine 10

2.2.1 Struktur 10

2.2.2 Aufbau der Integrinfamilie 12

2.2.3 Integrin regulierte Signalwege 14

2.2.4 Integrinfunktion in den verwendeten GD25 Zellen 18

2.3 Eingriffe in die Integrität der Zelle 19

2.3.1 Einfluss ionisierender Strahlen 19

2.3.2 PI3K Inhibition 21

3 Material **24**

3.1 Zelllinien 24

3.1.1 Herstellung der GD25β1A und GD25β1B Splicevarianten 24

3.2 Medium 25

3.3 Geräte und Hilfsmittel 25

3.3.1 Zellkultur 25

3.3.2 Bestrahlung 25

3.3.3 Koloniebildungsassay 25
3.3.4 Western-Blot 26
3.3.5 Akt Kinase Assay 26
3.4 Reagenzien 27
3.4.1 Zellkultur 27
3.4.2 Western-Blot 28
3.4.3 Akt Kinase Assay 32
3.5 Rezeptorliganden 32
3.6 Inhibitoren 32
3.7 Antikörper 33
3.7.1 Primärantikörper 33
3.7.2 Sekundärantikörper 34

4 Experimentelle Methoden 35
4.1 Zellkultur 35
4.1.1 Subkultivierung 35
4.1.2 Einfrieren 35
4.1.3 Auftauen 35
4.1.4 Bestrahlung 36
4.2 Koloniebildungsassay 36
4.2.1 Ansatz 36
4.2.2 Bestrahlung 37
4.2.3 Fixierung 37
4.2.4 Auswertung 37
4.3 Western-Blot 38
4.3.1 Ansatz 38
4.3.2 Proteinextraktion 38
4.3.3 Proteinbestimmung 39
4.3.4 SDS-Gelelektrophorese und Proteintransfer 39

4.3.5 Detektion 40
4.3.6 Auswertung 40
4.4 Akt Kinase Assay 40
4.4.1 Ansatz 40
4.4.2 Akt Immunpräzipitation 40
4.4.3 Kinase Assay 41
4.4.4 Western-Blot und Detektion 41
4.5 Wachstumskurve 41
4.5.1 Ansatz 41
4.5.2 Zählung 42
4.5.3 Auswertung 42
4.6 Statistik 42

5 Ergebnisse 43

5.1 β1 Integrin abhängiges Zellüberleben nach Bestrahlung in An- und Anwesenheit von Wachstumsfaktoren auf verschiedenen Substraten 43
5.1.1 Auf Poly-L-Lysin 43
5.1.2 Auf verschiedenen Substraten 44
5.1.3 Zusammenfassung 45
5.2 β1 Integrin abhängiges Zellüberleben nach Bestrahlung auf verschiedenen Substraten in An- und Abwesenheit von Wachstumsfaktoren und PI3K-Inhibitoren 46
5.2.1 Kontrolle 46
5.2.2 Vergleich des Überlebens von GD25β1A mit GD25β1B Zellen unter PI3K Inhibition 46
5.3 AKT/GSK3β-Phosphorylierung auf β1-IgG und Fibronektin unter PI3K Inhibition in An- und Abwesenheit von Wachstumsfaktoren 48
5.3.1 Akt Aktivität 30 Min. nach Bestrahlung 49
5.3.2 Akt Phosphorylierung an Ser473 und Thr308 49
5.3.3 Akt Kinase Assay 50

5.4 Aktivität der β1 Integrin regulierten Proteine FAK, p130Cas, Paxillin und JNK in An- und Abwesenheit von Wachstumsfaktoren und PI3K-Inhibitoren 51

5.4.1 FAK 52

5.4.2 Paxillin 53

5.4.3 JNK 53

5.5 JNK Phosphorylierung 30 Min nach Bestrahlung 54

5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse 55

6 Diskussion **56**

7 Zusammenfassung **64**

Literaturverzeichnis **66**

Abkürzungen **84**

Abbildungsverzeichnis **85**

Kapitel 1

Einleitung

Das Drei-Säulen-Konzept onkologischer Strategien, Operation, Zytostatika und Radiatio, wird seit den neunziger Jahren progressiv durch ein breites Spektrum gezielter therapeutischer Optionen erweitert. Neben Hormon- und Gentherapie sowie Angiogenese-Inhibition rücken immuntherapeutische Ansätze zunehmend in den Vordergrund. Hierbei erwies sich die Entwicklung monoklonaler Antikörper zur spezifischen Beeinflussung definierter Zielmoleküle in Tumorzellen als eine erfolgreiche Methode zur Optimierung von Krebstherapien. Als Ziel solcher Strategien bieten sich Signalwege an, die einen relevanten Einfluss auf das Zellüberleben haben.

Einer dieser Signalwege beginnt in definierten Arealen der Plasmamembran, die als Fokaladhäsionen bezeichnetet werden und Interaktionen zwischen Zelle und der extrazellulären Matrix ermöglichen. Diese Komplexe bestehen aus einer Vielzahl verschiedener Proteine wie Integrinen, Integrin-assoziierten Adaptor- und Signalproteinen, Wachstumsfaktorrezeptoren und nachgeschalteten Zielmolekülen. Das Zusammenwirken dieser Proteine bildet ein Netzwerk, welches an der Regulation zahlreicher Zellfunktionen wie Überleben, Apoptose, Proliferation und Differenzierung beteiligt ist.

In klinischen Studien werden bereits verschiedene Substanzen getestet, die Wachstumsfaktorrezeptoren und Integrine bei niedriger Toxizität inhibieren [81]. Die Umsetzung solcher Konzepte befindet sich bisher noch in der Anfangsphase. Ein vertiefendes Verständnis der genauen zellulären Abläufe nach genotoxischer Zellschädigung ist notwendig, um derartige Zieltherapien in Kombination mit Radio- und Chemotherapien zu verbessern. Diese im Mikromilieu der Zelle ablaufenden Prozesse sind hierbei von besonderer Bedeutung, was sich in der deutlichen Diskrepanz zwischen in vitro durchgeführten Studien und deren klinischem Erfolg in vivo wiederspiegelt. Zu diesen Prozessen gehören insbesondere Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix und darauffolgende Signaltransduktionen, Interak-

tion von Integrinen mit Wachstumsfaktorrezeptoren sowie das Phänomen der Adhäsionsvermittelter Radioresistenz.

Mit der Zielsetzung durch Aufklärung dieser spezifischen Abläufe in der mikromolekularen Umgebung der Zelle einen Beitrag zur Entwicklung zielgerichteter Krebstherapien leisten zu können, wurden in dieser Arbeit $\beta 1$ Integrin abhängige Adhäsionsprozesse und deren Interaktion mit Wachstumsfaktorrezptoren gesteuerten Signalwegen nach genotoxischer Zellschädigung untersucht. Unter Modulation verschiedener Einflüsse, wie Entzug von Wachstumsfaktoren, Kultivierung der Zellen auf verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen und Inhibition des intrazellulären Signalmoleküls Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K), wurden zwei Mausfibroblasten-Zelllinien verglichen. Zur Abgrenzung des $\beta 1$ Integrin vermittelten Einflusses, insbesondere seiner zytoplasmatischen Domäne, wurden hierfür eine Zelllinie mit funktionsfähigem $\beta 1$ Integrin (GD25β1A) sowie eine weitere mit mutiertem $\beta 1$ Integrin (GD25β1-Integrin) ausgewählt. Umgesetzt wurde diese Zielsetzung in Koloniebildungsassays und Wachstumskurven zur Analyse des Zellüberlebens sowie in Western-Blots zu Beurteilung der verschiedenen intrazellulären Signalmoleküle nach Bestrahlung.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Molekularbiologische Grundbegriffe

2.1.1 Molekularbiologie von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen

Ein vielzelliger Organismus stellt an seine einzelnen Zellen als kleinsten Grundbaustein die Anforderung, dass sie seine Funktionsfähigkeit über mechanische Befestigung und einen aktiven Kommunikationsfluss untereinander aufrechterhalten. Spezialisierte Zellverbindungen befinden sich an Orten des Zell/Zell- oder Zell/Matrixkontaktes und lassen sich in drei funktionelle Gruppen einteilen:

1. **Undurchlässige Verbindungen** (engl. Tight Junctions) sind undurchlässige Verbindungen, die entscheidend daran beteiligt sind, den Konzentrationsgradienten verschiedener hydrophiler Moleküle über Epithelschichten aufrechtzuerhalten. Jeder Strang der Tight Junctions besteht aus einer langen Reihe von transmembranösen Adhäsionproteinen, die in die kommunizierenden Plasmamembranen eingebettet sind. Die extrazellulären Domänen dieser Proteine sind direkt miteinander verbunden und schließen so den interzellulären Raum aus. Den Hauptteil dieser transmembran Proteine, die sich in verschiedenen Tight Junctions unterscheiden, bilden Claudine und Occludine [2].

2. **Kommunizierende Verbindungen** (engl. Gap Junctions) vermitteln den Durchtritt chemischer oder elektrischer Signale von einer Zelle zu ihrem Interaktionspartner. Dies wird durch Connexine ermöglicht, die die Plasmamembran durchdringen und mit Connexinen benachbarter Zellen gemeinsam durchgängige Kanäle,

die Connexone, bilden. Der funktionelle Porendurchmesser eines solchen Kanals beträgt etwa 1,5 nm, so dass die verbundenen Zellen kleine Moleküle wie Ionen, Aminosäuren, Nucleotide und intrazelluläre Signalüberträger untereinander austauschen können. Jedes Connexon besteht aus sechs Connexin-Untereinheiten, die wiederum aus vier Transmembran-Helices bestehen [3].

3. **Ankerverbindungen** verbinden Zellen und Zytoskelett mechanisch mit ihren Nachbarzellen sowie der extrazellulären Matrix (ECM). Sie lassen sich weiter unterteilen in:
   - Anheftungsstellen für Aktinfilamente:
     - Zell/Zell-Verbindungen **(Adhäsionsverbindungen)**
     - Zell/Matrix-Verbindungen **(Fokaladhäsionen)**
   - Anheftungsstellen für Intermediärfilamente:
     - Zell/Zell-Verbindungen **(Desmosomen)**
     - Zell/Matrix-Verbindungen **(Hemidesmosomen)**

Adhäsionsverbindungen und Desmosomen verbinden zur Steuerung gewebsspezifischer Erkennungsprozesse Zellen miteinander und werden von transmembranösen Adhäsionsproteinen gebildet, die zur Cadherinfamilie gehören. Fokaladhäsionen und Hemidesmosomen verbinden Zellen mit der ECM und bestehen aus transmembranösen Adhäsionsproteinen der Integrinfamilie.

Hemidesmosomen verbinden die Aktinfilamente des Zytoskelettes mit der Basallamina von Epithelzellen über Laminin, ein Protein der ECM. In **Fokaladhäsionen** garantieren Integrine die Verbindung von intrazellulären Aktinfilamenten mit Proteinen der ECM, so dass die Zellen in dieser ihre Verankerung finden. Nach diesem Prinzip schließen sich beispielsweise Fibroblasten zu funktionsfähigen Bindegewebsverbänden zusammen. In allen diesen Adhäsionsverbindungen binden die extrazellulären Domänen der Integrine an Proteinbestandteile der ECM, während intrazelluläre Domänen indirekt an Bündel von Aktinfilamenten über intrazelluläre Ankerproteine wie Talin, α-Actinin, Filamin und Vinculin anbinden [4].

2.1.2 Die extrazelluläre Matrix (ECM)

Gewebe setzen sich nicht nur aus einzelnen Zellen zusammen. Vielmehr ist der substanzielle Anteil jedes Gewebes der Extrazellularraum, in dem Makromoleküle zu einem komple-

xen Netzwerk assoziiert sind, der extrazellulären Matrix. Durch eine enorme Variationsbreite in der Zusammensetzung der ECM ergibt sich eine Vielzahl verschiedener Formen, jeweils adaptiert an die funktionellen Anforderungen der spezifischen Gewebe. Dabei stellt die ECM nicht nur ein stabilisierendes Gerüst dar, sondern ist durch ihren Kontakt zu intrazellulären Strukturen maßgeblich an Migration, Differenzierung und Proliferation beteilig [90].

Dieses Phänomen wird als anchorage dependance bezeichnet und verdeutlicht, dass die Steuerung zahlreicher biologischer Prozesse eine Verankerung der Zellen in ihrer umgebenden Matrix voraussetzt [65]. Der Kontakt von Integrinen zur ECM ist keineswegs statisch. Signalübertragung läuft bidirektional, d.h. Veränderungen in zytoskelettalen Strukturen modulieren die Affinität zur ECM gleichermaßen wie Veränderungen der ECM auf Signalisierungsprozesse im Zytosol wirken. Integrine kommunizieren demnach Informationen über die Beschaffenheit der ECM ins Zytosol und sind gleichzeitig in der Lage, die ECM entsprechend ihren jeweiligen Bedürfnissen zu gestalten [101].

So hängt die Fähigkeit vieler Zellen zu wachsen, proliferieren und schließlich zu überleben vom Kontakt mit ihrer Umbebung ab. Integrine erkennen bestimmte Makromoleküle wie Fibronektin oder Kollagen (siehe unten) in der Umgebung ihrer Zellmembran und leiten diese Information an Signalstrukturen im Zytosol weiter, die dann die Steuerung regulatorischer Prozesse initiieren [87]. Die Fähigkeit eines Integrins an bestimmte Matrixproteine zu binden, hängt von der Zusammensetzung seiner Untereinheiten ab, wie Kapitel 2.2.2, Aufbau der Integrinfamilie, näher beschreibt.

Diese die ECM bildenden Makromoleküle werden hauptsächlich von denen in der Matrix eingebetteten Zellen synthetisiert. In den meisten Bindegeweben werden die Matrixproteine von der Familie der Fibroblasten, sowie deren Untergruppen (z.B. Chondroblasten, Osteoblasten) sezerniert. Abbau von Komponenten der ECM wird von extrazellulären, proteolytischen Enzymen gesteuert. Die meisten von ihnen sind Calcium oder Zink abhängige Matrix-Metalloproteasen [124]; [19]. Diese den extrazellulären Raum (EZR) füllende, je nach Gewebetyp unterschiedlich organisierte Matrix, setzt sich aus zwei Hauptgruppen von Makromolekülen zusammen:

1. **Gruppe der Glycosaminoglykane (GAGs)** hauptsächlich in Form von Proteoglykanen, die dem Gewebe über enorme Wasserbindungskapazität seine Form geben

2. **Fibrillen formenden Proteine** wie Kollagen, Elastin, Fibronektin, Vitronektin und Laminin

2.1.2.1 Glycosaminoglykane

GAGs formen, wie bereits erwähnt, im Bindegewebe eine stark hydratisierte gelartige Grundsubstanz, in der die fibrillenbildenden Proteine eingelagert sind. Während sie kompressivem Druck auf die Matrix standhalten, können sie gleichzeitig Diffusion von Nährstoffen, Metaboliten und Hormonen zwischen Blut und Gewebszellen gewährleisten. GAGs sind unverzweigte Polysaccaridketten aus 1-4-bis-gylokosidisch verbundenen Disaccariden, von denen meist einer ein sulfatierter Aminozucker ist (N-Acetylglycosamin oder N-Acetylgalaktosamin), der zweite in der Regel eine Glucoronsäure. Aufgrund ihrer Sulfat- und Carboxylgruppen sind GAGs stark negativ geladen. Die hohe Dichte dieser anionischen Valenzen zieht Kationen, hauptsächlich osmotisch wirksames Natrium an, was den Einstrom großer Wassermengen in die Matrix zur Folge hat. Der so zustande kommende Tugur ist schließlich für die enorme kompressiv-mechanische Widerstandsfähigkeit der Gewebe verantwortlich. Unterschieden werden anhand ihrer Zusammensetzung vier verschiedene Gruppen von GAGs: Hyaluronate, Chondroitin-/Dermatansulfat, Heparansulfat sowie Keratansulfat. Sie unterscheiden sich durch ihre Bindung zwischen den Zuckern sowie Lage und Anzahl der Sulfatgruppen und können Gele mit unterschiedlicher Poren- und Ladungsdichte bilden. GAGs liegen (mit Ausnahme von Hyaluron) in kovalenter Bindung mit Polypeptidketten als Proteoglykane vor [5].

2.1.2.2 Fibrillenformende Proteine

GAGs und Proteoglykane lagern sich nicht nur untereinander zu großen polymeren Komplexen zusammen, sondern binden zusätzlich an die faserförmigen Matrixproteine. Matrixproteine wie Kollagene, Laminin oder Fibronektin, werden auf der Zelloberfläche zu komplexen Netzwerken zusammengebaut. Die Matrix beeinflusst mechanisch die Zellausbreitung, in dem sie Zelloberflächerezeptoren bindet und intrazelluläre Signalübertragungswege aktiviert. Im Folgenden finden sich die in dieser Arbeit verwendeten Matrixproteine, Kollagen, Fibronektin, Laminin und Vitronektin kurz erläutert [5].

Kollagen

Kollagen ist als Hauptbestandteil von Haut und Knochen das wichtigste faserförmige Protein und macht mengenmäßig etwa 25% des im Körper vorhandenen Gesamtproteins aus. Die wichtigste Eigenschaft eines typischen Kollagenmoleküls ist seine lange, unbewegliche Helicalstruktur, in der drei Kollagenpeptidketten, die so genannten α-Ketten, zu einer Superhelix ineinander verdrillt sind (Abb. 2.1).

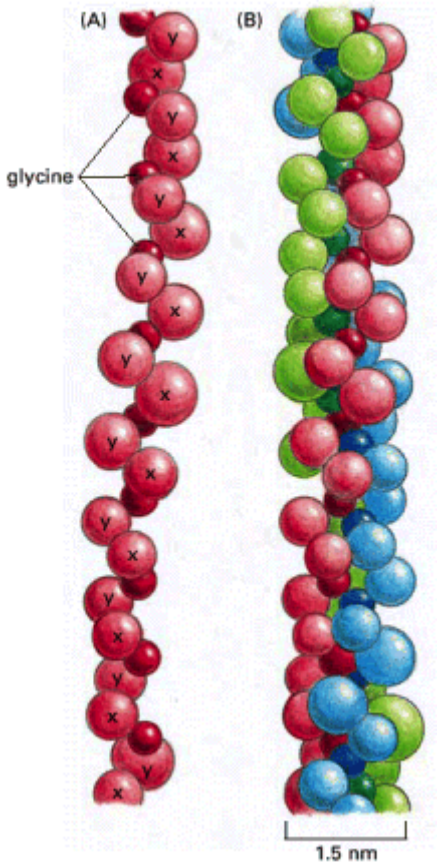

Abbildung 2.1: Grundstruktur eines Kollagen Moleküls (A): Kalottenmodell einer einzelnen Kollagen-α-Kette, in der jede einzelne Aminosäure als Kugel dargestellt ist. Die ca. 1000 Aminosäuren (AS) lange Helix besteht aus der Tripelsequenz Glycin-X-Y, wobei X und Y jede beliebige Aminosäure sein kann (in der Regel steht X für die AS Prolin,Y für die AS Hydroxyprolin). (B): Kollagenmolekül aus drei verschiedenen Kollagenketten, jede in einer unterschiedlichen Farbe dargestellt, die sich zu einer Tripelhelix verdrillen. Aus: [5].

Kollagene enthalten viel Glycin und Prolin, deren Wechselwirkungen für die Ausbildung der Trippelhelix von Bedeutung sind. Bislang wurden 25 verschiedene α-Ketten beschrieben, die jeweils von einem eigenständigen Gen kodiert werden. Obwohl sich diese 25 verschiedenen α-Ketten zu mindestens 10.000 unterschiedlichen Tripelhelices zusammensetzen könnten, wurden bislang nur etwa 20 verschiedene Kollagenmoleküle gefunden. Die in Bindegeweben anzutreffenden Kollagene sind vom Typ I, II, III, V, XI, wobei Typ I als Hauptbestandteil von Haut und Knochen mit Abstand das am häufigsten vorkommende ist. Synthetisiert werden Kollagene in membrangebundenen Ribosomen. Durch Einbau zusätzlicher Aminosäuren, die erst nach Sekretion in den EZR proteolytisch abgespalten werden, erfolgt ihre Assoziation erst nach Ausscheidung in diesen.

Interessant ist die Interaktion von Kollagenfasern und Fibroblasten in der Organisation

der ECM, deren mechanische und chemische Wechselwirkungen maßgeblich Gewebsarchitektur gestaltet. Fibroblasten beeinflussen die Ausrichtung der Kollagefasern; im Gegenzug beeinflussen Kollagenfasern die Verteilung der Fibroblasten. So können Zellen innerhalb verschiedener Gewebe den unterschiedlichen, an sie gestellten Anforderungen durch Modulation von Dichte und Formation ihrer Kollagenfasern gerecht werden.

Fibronektin

Die ECM enthält neben Kollagen noch zahlreiche andere Proteine, die Domänen zur Bindung von Matrixmolekülen und Zelloberflächen-Rezeptoren besitzen. Diese Proteine unterstützen somit sowohl die Strukturierung der Matrix als auch die Zellbindung an die Matrix. Das erste aus dieser Gruppe beschriebene Molekül, Fibronektin, ist ein in allen Vertebraten zu findendes Glykoprotein.

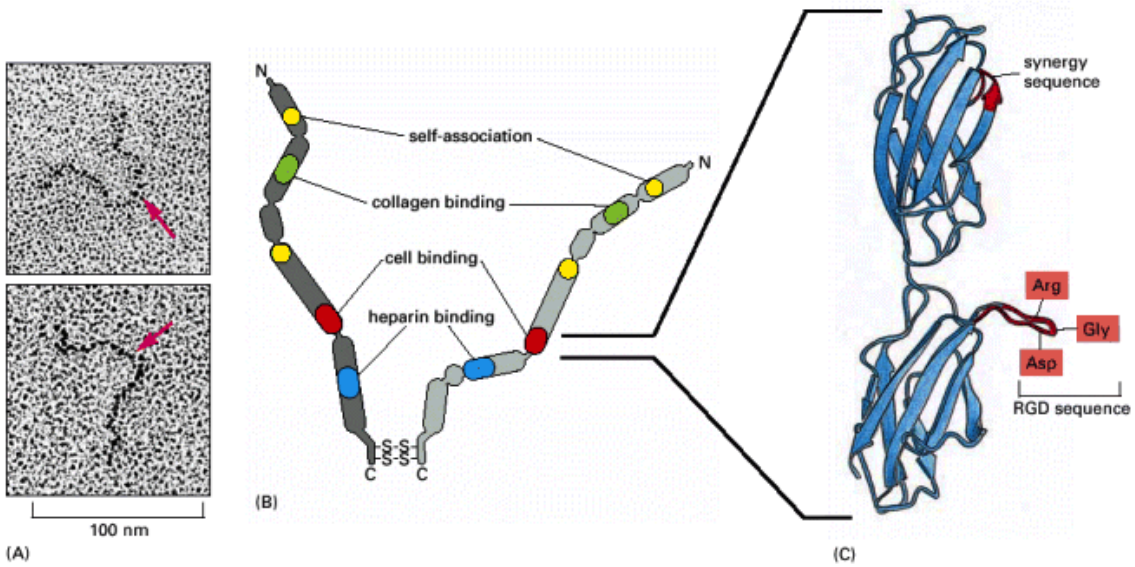

Abbildung 2.2: Struktur eines Fibronektin Dimers (A) Elektronenmikroskopische Abbildung eines einzelnen, mit Platin bedampften Fibronektindimers. Die roten Pfeile markieren die C-terminalen Enden. (B) Die beiden Polypeptidketten (hellgrau und dunkelgrau) sind ähnlich, aber nicht identisch (gleiches Gen aber alternativ gespleiste mRNA). Auf Höhe des C-terminalen Endes sind sie über zwei Disulifidbrücken verbunden. Jede Kette ist etwa 2500 Aminosäuren lang und besteht aus fünf bis sechs verschiedenen Domänen, die flexibel über Polypeptidsequenzen miteinander verbunden sind. Wie im Modell angezeigt, hat jede Domäne charakteristische Bindungseigenschaften. (C) Raumstruktur zweier Typ III-Fibronektin-Wiederholungseinheiten, abgeleitet aus Röntgenstrukturdaten. Diese Typ III-Fibronektin-Wiederholungseinheit ist die vorherrschende Wiederholungseinheit in Fibronektin Molekülen. Über die enthaltende RGD-Sequenz (rot dargestellt) können Integrine gebunden werden. Aus [5].

Fibronektin ist ein Dimer aus zwei großen Untereinheiten, die miteinander über eine Disul-

fidbrücke verbunden sind. Die Untereinheiten sind wiederum aus verschiedenen Domänen zusammengesetzt, die spezifisch Zellen oder Makromoleküle binden können. In jeder dieser Untereinheiten kommt eine sog. Typ III-Fibronektin-Wiederholungseinheit mindestens fünfzehn mal vor. In jeder dieser Typ III-Wiederholungseinheiten findet sich eine spezifische Sequenz aus den drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Aspartat (RGD), über welche Fibronektin in der Lage ist, an Integrine zu binden [35]. Alle Fibronektinformen werden von einem einzigen Gen kodiert, verschiedene Isoformen entstehen durch alternative Spliceprozesse. Fibronektin kommt in seiner löslichen Isoform als Plasmafibrinogen vor, in der es an Phagozytose, Wundheilung und Gerinnung beteiligt ist. Unlösliches Fibrinogen ist ein Haupt-Bestandteil der ECM. Gegensätzlich zu Kollagenen, die sich auch in vitro selbständig zu Fibrillen organisieren, ist die Assoziation von Fibronektinmolekülen an die Anwesenheit zusätzlicher Proteine gebunden. Um zu Fibrillen assoziieren zu können, brauchen Fibronektindimere Kontakt zu intrazellulären Aktinfilamenten, die durch ihre Kontraktilität Zugkräfte erzeugen. Diese Wechselwirkung zwischen Fibronektin und den zytoskelettalen Aktinfilamenten wird über Integrine gesteuert und bewirkt die Freigabe weiterer Bindungsstellen an den gedehnten Fibronektinmolekülen, über welche diese dann assoziieren können [79], (Abb. 2.2).

Vitronektin

Vitronektin ist ein multifunktionales Glykoprotein, das sowohl im Blut als auch in der extrazellulären Matrix vorkommt. Es bindet an Glycosaminoglykane, Kollagen, Plasminogen und den Urokinase-artigen Plasminogen-Atkivator (uPA). Durch seine Lokalisation in der extrazellulären Matrix mit Bindungsfähigkeit von uPA und Plasminogen ist Vitronektin potentiell in der Lage, den proteolytischen Abbau der ECM zu regulieren. Weiterhin bindet Vitronektin an die Komplementfaktoren, Heparin und Thrombin-Antithrombin-3-Komplexe, was seine Beteiligung an der Regulation von Komplementaktivierung, Gerinnung und Fibrinolyse impliziert.Die biologische Funktion von Vitronektin wird über proteolytische Enzyme und Proteinkinasen reguliert. Vitronektin enthält eine RGD-Sequenz, über die es an den Integrin Rezeptor $\alpha V\beta 3$ binden kann. Über diese Bindung ist Vitronektin an zahlreichen regulatorischen Prozessen wie Zelladhäsion und Migration beteiligt [128]; [147].

Laminin

Laminin ist ein großes Glykoprotein aus drei zu einem asymmetrischen Kreuz verdrillten Polypeptidketten, α, β und γ genannt und wird durch eine Vielzahl von Disulfidbrücken

zusammengehalten. Bekannt sind bislang fünf verschiedene α-Ketten sowie je drei verschiedene β- und γ-Ketten, deren Kombination 45 (5x3x3) verschiedene Laminin Isoformen ergibt, jede mit charakteristischer Gewebsverteilung.
In vitro assoziieren Lamininmoleküle zu einer filzartigen Schicht, insbesondere durch Interaktion im Bereich seiner Arme. In Geweben polymerisieren Lamininmoleküle bevorzugt mit Kollagen IV-Molekülen über Nidogen und Perlecan, zwei Moleküle, die sowohl Bindungstellen für Kollagen als auch für Laminin besitzen. Laminin ist essentieller Bestandteil von ECM und Basallaminae und kann an Zelloberflächen-Rezeptoren der Integrinfamilie binden [5].

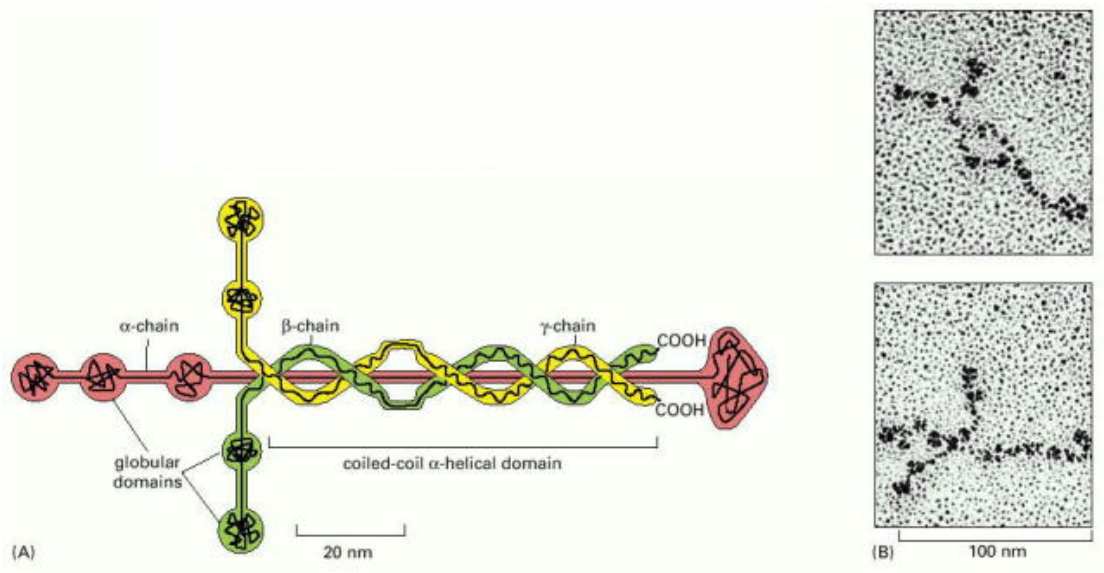

Abbildung 2.3: Struktur eines Lamininmoleküles (A) Untereinheit eines Laminin 1-Moleküls, zusammengesetzt aus drei jeweils ca. 1500 Aminosäuren langen Polypetidketten (α, β und γ), die über Disulfidbrücken zu einem kreuzförmigen Glykoprotein ineinander verdrillt sind (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines mit Platinum bedampften Lamininmolküles. Aus: [5].

2.2 Integrine

2.2.1 Struktur

Ein Integrinmolekül besteht aus zwei nicht kovalent gebundenen transmembranen Glykoproteinen, die als α- und β-Untereinheit bezeichnet werden. Jede dieser Untereinheiten enthält eine große extrazelluläre Domäne, einen transmembranen Abschnitt sowie eine zytoplasmatische Domäne (Abb. 2.4).
Ihre Form ähnelt einem von zwei stangenförmigen Beinen gestütztem Kopf, in welchem

die beiden Untereinheiten in Kontakt stehen und Kationen abhängig Liganden binden können. Aus röntgenkristallographischen Analysen ist bekannt, dass Integrine konformatorisch nicht aufrecht stehen, sondern in den Knien (Abb. 2.4: Abschnitt zwischen den Thigh Domains und der oberen der beiden Calf Domains) so weit gebeugt sind, dass ihr Kopf eher der Plasmamembran als dem EZR zugewandt ist [156]. Die in etwa 135° gebeugte Konformation scheint dabei die inaktive zu sein, in der keine Liganden gebunden werden [27], [135].

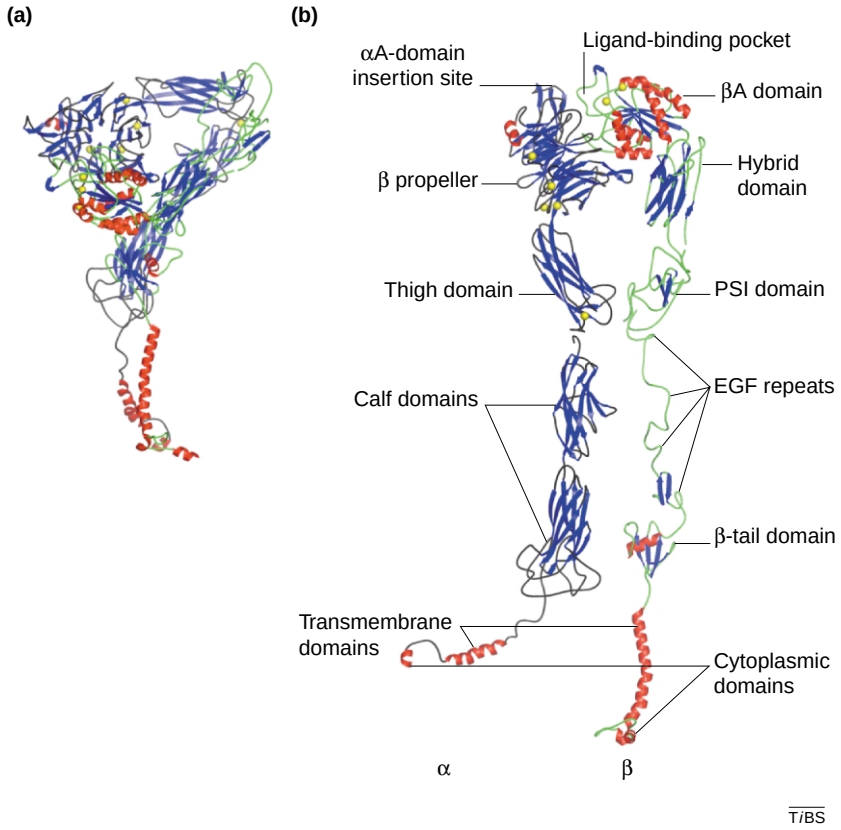

Abbildung 2.4: Der Integrin-Rezeptor und seine Konformationen, nach röntgenkristallographischer Darstellung: (A) Bändermodell der "gebeugten Konformation"(B) Bändermodell der "gestreckten"Konformation: links die α-Untereinheit, rechts die β-Untereinheit. Aus: [87]

Die extrazelluläre Domäne der α-Untereinheit ist aus sieben homologen, etwa 60 Aminosäuren langen Abschnitten aufgebaut, die sich zu einer einzelnen Domäne formieren, die als β-Propeller bezeichnet wird. Einige α-Untereinheiten enthalten innerhalb dieses β-Propellers eine Einbuchtung, die als αIA-Domäne bezeichnet wird. Sie ist etwa 180 Aminosäuren lang und mit einem korrespondierenden Abschnitt der β-Untereinheit (βIA genannt; in allen β-Untereinheiten vorhanden) in der Lage, Liganden zu binden. Diese Interaktion ist von der Bindung divalenter Kationen über die sogenannte MIDAS-Sequenz

(Metal-Ion-dependent-adhesion-site) der α-Untereinheit abhängig, wobei Magnesium Ionen die Liganden-Bindung zu stimulieren, Calcium Ionen zu inhibieren scheint.
Die extrazelluläre Domäne der β-Untereinheit besteht aus einer konservierten Proteindomäne sowie einem sich wiederholenden Cystein-reichen Abschnitt.
Der zytoplasmatische Abschnitt beider Untereinheiten ist mit weniger als 75 Aminosäuren relativ kurz. Die intrazellulären Domänen der α- und β-Ketten unterscheiden sich in Struktur und funktionellen Eigenschaften. Die meisten β-Ketten enthalten ein NPxY Motiv (Aminosäure-Sequenz, in der N für Asparagin, P für Prolin, x für jede beliebige und Y für Tyrosin steht), über welches sie eine Vielzahl Phosphotyrosin-Bindungsdomänen (PTB) tragender zytoskelletaler Proteine binden können [87].

2.2.2 Aufbau der Integrinfamilie

Die Integrinfamilie besteht aus mindestens 24 verschiedenen Rezeptoren, die sich, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, jeweils aus einer α- und einer β-Untereinheit zusammensetzen.

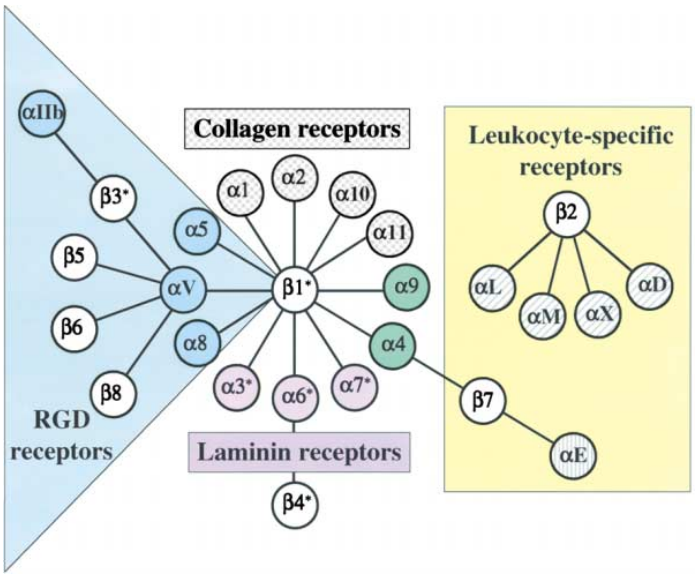

Abbildung 2.5: Die Integrin Rezeptor Familie: 8 β- assoziieren mit 18 α-Untereinheiten zu 24 verschiedenen Integrinen. Aus [88].

Bekannt sind bislang 18 verschiedene α- (α1-11, α11B, α-V, -L, -M, -X, -D, -E) sowie 8 verschiedene β- (β1- 8) Untereinheiten, die nicht-kovalent zu 24 Rezeptoren assoziieren [88]. Die Bindungsfähigkeit verschiedener Matrixproteine resultiert aus der Kombination von α- und β-Untereinheiten des jeweiligen Integrins und ist in der Abbildung 2.5

veranschaulicht.

Aufgrund ihrer evolutionsbedingten und funktionellen Beziehungen lassen sich Integrine in verschiedene Unterfamilien mit spezifischen Aufgaben einteilen. Dementsprechend lassen sich drei funktionelle Unterfamilien klassifizieren: β1 Integrine, β2 Integrine und αv Integrine.

β1 Integrine

Die in dieser Arbeit untersuchte β1 Integrinfamilie ist charakterisiert durch 12 verschieden Heterodimere, denen gemeinsam die β1 Untereinheit ist. Während die β Kette die Bindung verschiedener Proteine im Zytosol reguliert, garantiert die α Untereinheit die Ligandenbindungsspezifität, über welche sich die β1 Familie subklassifizieren lässt: β1 Integrine assoziieren mit den korrespondierenden α Untereinheiten zu Kollagen-, Laminin-, Fibronektin- und RGD-Rezeptoren, wie Abb. 2.5 illustriert: β1 Untereinheiten binden mit α1, α2, α10 und α11 (schraffiert dargestellt) an Kollagen zur Steuerung von Migrationprozessen durch kollagenhaltige Matrices.
α3, α6 oder α7 assoziieren mit β1 Integrinen zu Lamininrezeptoren (lila dargestellt), einem elementaren Bestandteil von Basalmembranen, insbesondere in Epithelien, Muskeln oder neurokortikalen Strukturen.
β1 Ketten binden mit α4 und α9 (Abb. 2.6 grün dargestellt) sowohl Proteine der ECM wie Fibronektin als auch IgG-Rezeptoren auf endothelialen Zellen. Sie spielen eine entscheidende Rolle in Migrationsprozessen.
β1 mit α5, α8 oder αV erkennen die RGD Tripeptid Sequenz (Arg-Gly-Asp; im blauen Dreieck dargestellt) in Molekülen wie Fibronektin und Vitronektin, zwei Schlüsselmoleküle in Migrations- und Adhäsionsprozessen.
Die αV Untereinheit bindet neben β1 auch noch weitere β Untereinheiten und wird gelegentlich als eigenständige Unterfamilie kategorisiert.

β2 Integrine

Die Expression von Integrinen aus dieser Familie spielt eine Schlüsselrolle in der Funktion der Zellen des Immunsystems. Die β2 Integrinfamilie bildet verschiedene Heterodimere mit α Untereinheiten (αL, αM, αX, αD; Abb. 2.6 im gelb unterlegten Kasten) und besitzt die Fähigkeit mit Rezeptoren der IgG-Familie, wie sie beispielsweise auf Leukozyten oder aktivierten Endothelzellen vorkommen, zu interagieren. Durch diese Interaktion kommt es schließlich zu dauerhafter Adhäsion von Chemokin-stimulierten Leukozyten, gefolgt von Diapedese und Chemotaxis in geschädigtem Gewebe.

αV Integrine

αV Integrine assoziieren mit den β Untereinheiten (β1, β3, β5, β6 und β8, blaues Dreick) zu Heterodimeren, mit Bindungsspezifität von RGD-Peptid tragenden Liganden. Vermutet wird bislang eine tragende Rolle in der Angiogenese. Abb. 2.6 gibt einen Überblick über verschiedene Integrinrezeptoren und ihre Liganden.

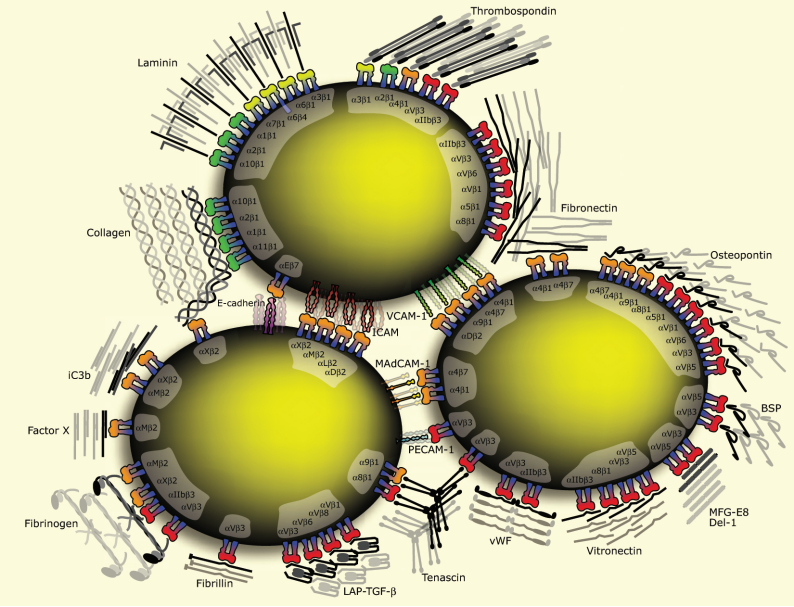

Abbildung 2.6: Übersicht über Ligandenbindungs-Spezifitäten verschiedener Integrinuntereinheiten. Die Abbildung zeigt die die Abhängigkeit der Ligandenbindungsspezifität von der Kombination der Integrin Untereinheiten. Aus [87]

2.2.3 Integrin regulierte Signalwege

Wie bereits erläutert, beeinflussen Veränderungen in der ECM Abläufe von Signalkaskaden im Zytoskelett [142]. Diese Effekte werden durch synergistische Wirkung von Integrinen und Rezeptor Tyrosin Kinasen im Zytosol induziert [11]; [104].
Integrine sind für die intrazelluläre Signalweiterleitung auf Rekrutierung von Adapter Elementen mit Phosphorylierungs-Potential angewiesen, da ihre zytoplasmatischen Domänen keine intrinsische Kinase-Aktivität besitzen [28]; [109].

Vor Einstieg in die Komplexität der Interaktionen einzelner Signalmoleküle sei im Folgenden ein kurzer Überblick über die Charakteristika einzelner, von Integrinen rekrutierter zytoplasmatischer Proteine gegeben.

2.2.3.1 Paxillin

Paxillin ist ein in fokalen Adhäsionen vorkommendes Protein, das in einer Vielzahl von Signalwegen eine regulatorische Rolle spielt. Paxillin enthält eine Anzahl von Motiven, über die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt werden [84]. Am N-terminalen Ende besitzt Paxillin fünf sog. LD-Motive, die nach der Aminosäure-Sequenz Leucin(L)-Aspartat(D) mit der jedes dieser Motive konstant beginnt, benannt wurden. Über diese LD-Motive bindet Paxillin FAK sowie die Integrin-gebundene Kinase (ILK). Im C-terminalen Abschnitt enthält Paxillin vier sog. LIM-Domänen (engl. lymphoid cancer-binding factor). LIM-Motive sind doppelte Zinkfinger-Motive aus etwa 50 AS, die in vielen Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren und Zytoskelett-assoziierten Molekülen zu finden sind und dienen als Module in Protein-Protein-Bindungen. Über diese LIM-Motive interagiert Paxillin mit Fokaladhäsionen. [146].

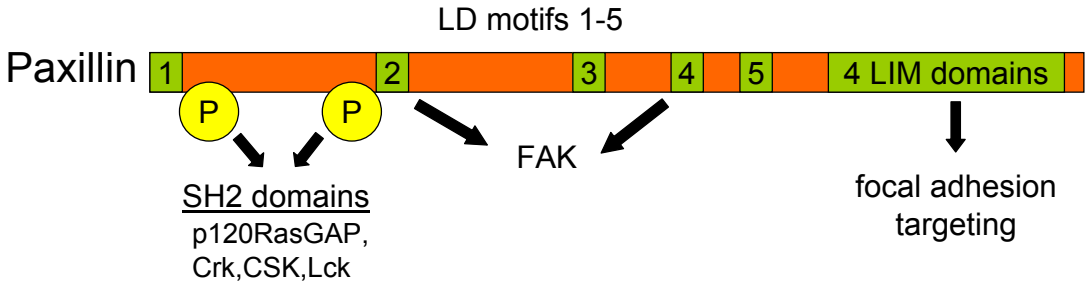

Abbildung 2.7: Linear dargestellte Struktur von Paxillin mit Hauptbindungsstellen, Tyrosin Phosphorylierungsstellen und Proteininteraktionen. Aus [76]

Weiterhin kann Paxillin an Serin(Ser)-/Threonin(Thr)- und Tyrosin(Tyr)-resten, wie beispielsweise von FAK und der Protein Kinase Src (engl. homology domain containing phosphatase-2Src) phosphoryliert werden, die daraufhin Phosphotyrosin bindende, etwas 100 AS lange Src Homologie 2(SH2)-Bindungsstellen zur Rekrutierung weiterer Moleküle freigeben [144]. Bislang sind vier verschiedene Tyrosin Phosporylierungsstellen von Paxillin bekannt, von denen Tyr31 und Tyr118 die Haupt-Phosporylierungs-Positionen repräsentieren. Auf diese Weise dient Paxillin als Adapter-Protein in fokalen Adhäsionen sowie als Signalmolekül zur Rekrutierung nachfolgender Signalwege. Die biologische Funktion Paxillins steuert somit Zellwachstum und Motilität [126].

2.2.3.2 FAK (Fokale Adhesionskinase)

Die FAK ist ein essentieller Mediator in Integrin-abhängiger Signaltransduktion. Die zentrale Rolle der nicht Rezeptor gebundenen FAK wurde bereits in einer Vielzahl von Ma-

lignomen in immunhistologischen und molekularen Analysen demonstriert [34]; [91]; [97]. Die Aktivität der FAK wird nicht nur über Fokaladhäsionen, sondern ebenfalls durch Oncogene und Wachstumsfaktorrezeptoren reguliert [67] . FAK spielt eine entscheidende Rolle in Adhäsions-Dynamik und Migration als Reaktion auf Veränderungen der ECM und Wachstumsfaktor-vermittelter Signale [86]. Weiterhin besitzt FAK einen antiapoptotischen Einfluss in Zellen, die in der ECM verankert sind [95].

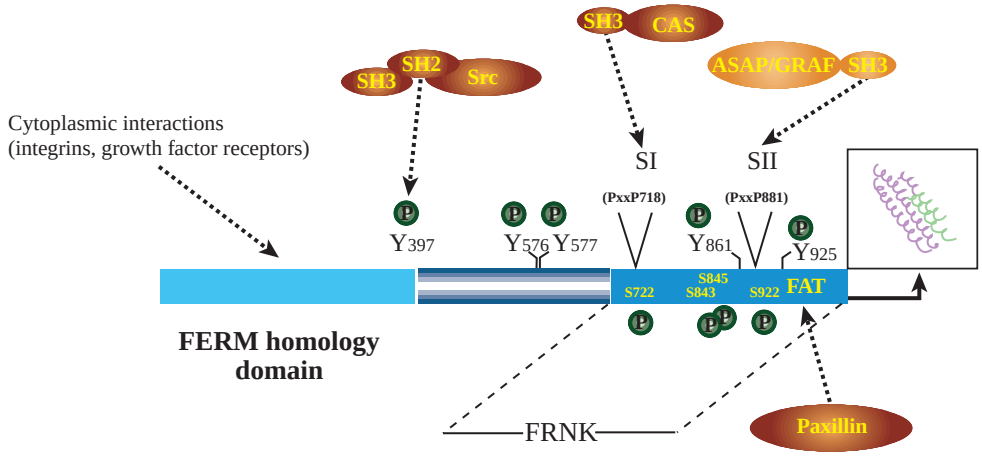

Abbildung 2.8: Organisation der verschiedenen FAK-Domänen. Der N-terminale Abschnitt dirigiert über seine FERM-Domäne (Four-point-one, Ezrin, Radixin,Moesin) die Interaktion mit Integrinen und Wachstumsfaktorrezeptoren. Die C-terminalen Domänen enthalten Bindungstellen für zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen wie beispielsweise die Bindung des Crk-assoziierten Substrat(p130Cas). Hauptbindungsstelle für Phosphorylierungen ist Tyr397. Die sog. FAT-Domäne (Fokal-Adhesion-Targetting-Domain) dirigiert FAK an Adhäsionkomplexe [113].

FAK ist eine zytoplasmatische Protein-Tyrosinkinase, die über Bindung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder Integrinen im Bereich zellulärer Fokaladhäsionen aktiviert wird. An ihrem C-terminalen Ende besitzt sie eine sog. FAT-Domäne (Fokal-Adhesion-Targetting-Domain), die FAK an Adhäsionskomplexe dirigiert. Die Integrität dieser Domäne ist Vorraussetzung für den ungestörten Ablauf nachgeschalteter Signalisierungswege. Die FAT-Domäne besteht aus vier assoziierenden Helices, über die FAK in der Lage ist, die LD-Domäne von Paxillin zu binden [78], Abb. 2.8. An ihrem N-terminalen Ende enthält FAK eine sog. FERM-Domäne (Proteindomäne, die in den Proteinen Four-point-one, Ezrin, Radixin und Moesin gefunden wurde), deren Prolin-reiche Abschnitte Interaktionsgrundlage für weitere Signalmoleküle darstellen. Über die FERM-Domäne bindet FAK an Integrine, Wachstumsfaktorrezeptoren sowie die Src Homolgie 3(SH3)-Domäne von p130Cas. FAK Phosphorylierung erfolgt an den Tyrosinresten 397, 576, 577, 861 und 925. Phosphorylierung an Tyr397 wird über Integrine induziert und ermöglicht Bindung von

Src [93]. An FAK gebundenes Src phosphoryliert FAK an Tyr576 und Tyr577. Src phosphoryliert FAK außerdem an Tyr861 sowie Tyr925, um Bindungstellen für SH2-Domänen tragende Moleküle, wie Gbr2 (engl. growth factor receptor-bound protein 2)zu schaffen [113], [154].

2.2.3.3 Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)

Die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) ist ein Schlüsselmolekül in der Schnittstelle von Signalwegen, die sowohl von Wachstumsfaktorrezeptoren als auch von Integrinen aktiviert werden. Die aktive PI3K besteht aus einer regulatorischen p85 Untereinheit und einer katalytischen p110 Untereinheit [45]. Aktivierung von PI3K durch Phosphorylierung an ihrer p85 Untereinheit folgt die Generierung des Botenmoleküles (engl. second messager Molekül) Lipid-Phosphatidyl-(3,4,5)-Triphosphat (PIP3). PIP3 wiederum rekrutiert die Phosphatidyl-Inositol-dependent-Kinase 1 (PDK1) sowie die Proteinkinase B (PKB; auch als Akt bezeichnet) an der Zellmembran, wo PDK 1 durch Phosphorylierung PKB aktiviert [159]; [23]. Die Aktivierung von PKB wiederum führt zur Regulation einer Reihe weiterer Signalkaskaden, die Zellwachstum und -überleben, Proliferation und Anti-Apoptose bewirken. Dies illustriert PI3Ks Funktion in der Tumorgenese [121]. Einen groben Überblick über die Vernetzung dieser Signalwege gibt Abb. 2.9.

2.2.3.4 JNK (c-Jun NH2-terminale Kinase)

JNK1 und JNK2 Kinasen wurden in den 90er Jahren als stressinduzierte Proteinkinasen identifiziert, die den Transkriptionsfaktor c-JUN an seinem NH2-Terminus phosphorylieren. Phosphorylierung von c-JUN amplifiziert dessen Fähigkeit den Transkriptionsfaktorverstärker AP-1 (Aktivierungsprotein-1) zu transaktivieren, der wiederum als Promoter für die Expression verschiedener Gene fungiert. Die transkribierten Gene scheinen sowohl Proliferation als auch Apoptose zu beeinflussen. JNK 1/2 Aktivierung wird durch verschiedene Stress Faktoren wie Ultraviolett(UV)- und γ-Strahlung, zytotoxische Noxen und reaktive Sauerstoffradiakale induziert [52].

2.2.3.5 p130Cas/Crk

Eine der vielen von Integrinen aktivierten Signalwege initiiert die Phosphorylierung des Docking-Proteins p130Cas (Crk-associated substrate) sowie wie dessen Rekrutierung und Bindung des Adapter Proteins Crk (CT10 Regulator of kinase) zur Steuerung von Proliferation, Überleben und Migration. Fehlregulation innerhalb dieser Abläufe führen zu

Tumorprogression und Metastasierung [112]. Sowohl Cas als auch die Crk Familie besteht aus mehreren Proteinen, die alle eine Vielzahl verschiedener Domänen zur Bindung weiterer Proteine besitzen [152]. Diese Interaktionen sind komplex und bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt [32]. Einen Überblick über mögliche Interaktionen der beschriebenen Signalmoleküle gibt Abb. 2.9.

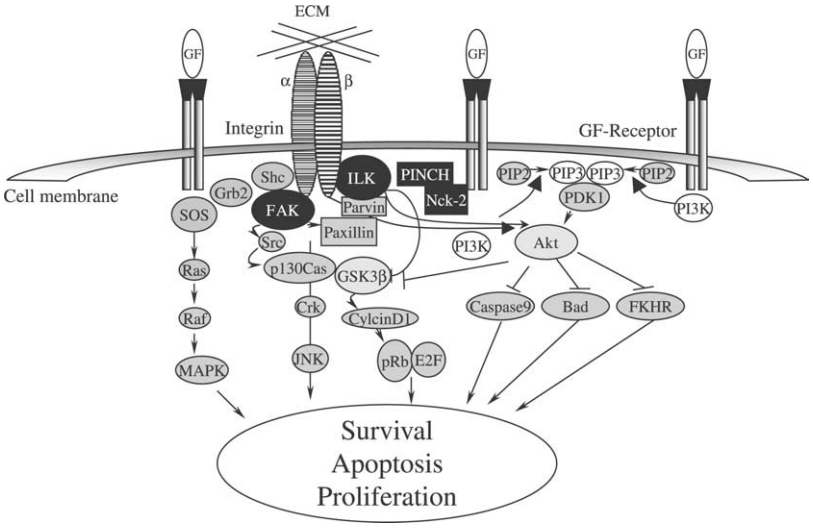

Abbildung 2.9: Die Abbildung zeigt schematisch die Hauptsignalwege, die durch Integrine oder Wachstumsfaktorrezeptoren (Growth factor=GF) beeinflusst werden. Die Moleküle sind der Zellmembran angelagert, um Signale an zytoplasmatische Strukturen weiterzuleiten [77]. In vivo werden durch diese regulatorischen Kaskaden Überleben, Proliferation, Zellzyklus und Apoptose gesteuert. Die Abbildung schematisiert die Integration verschiedener Proteinkinasen wie Akt, GSK3β, Src, MAPK (Mitogenaktivierte Protein Kinase) und Caspase in ein intrazelluläres Netzwerk, dass Integrin und Wachstumsfaktorrezeptor abhängig an der Reaktion auf genotoxischer Zellschädigung beteiligt ist. Aus [34].

2.2.4 Integrinfunktion in den verwendeten GD25 Zellen

GD25β1A und GD25β1B Splicevarianten Im Menschen wurden vier unterschiedliche β1 Integrin Splicevarianten beschrieben, die als β1A, β1B, β1C, und β1D bezeichnet werden. Allen Splicevarianten gemeinsam ist ihr N-terminaler Teil bis zu einer definierten Aminosäure Sequenz ("WDT"), die auf Genebene im 3' Ende des Exon 6 der mRNA lokalisiert ist [7], Abb. 2.10.

Der grundlegende Unterschied der in dieser Arbeit betrachteten Isoformen β1A und β1B liegt in der Sequenz der letzten 21 Aminosäuren am C-terminalen Ende des Proteins. Die β1B Untereinheit besitzt im Unterschied zu den 21 terminalen Aminosäuren in β1A nur

eine 12 AS lange Sequenz, die aus der Intron-Sequenz vor dem letzten Exon stammt.
Die Splicevariante β1A kommt innerhalb verschiedener Arten mit konstanter Aminosäuresequenz vor. Über sie sind Integrine in der Lage Verbindungen in Fokaladhäsionen einzugehen, Signalmoleküle wie α-Actinin, FAK, ILK, Paxillin und Talin zu binden und Informationen an nachgeschaltete Signalkaskaden über Phophorylierungsreaktionen in Richtung Zellkern zu transduzieren, [7]. Das β1B Integrin Transkript findet sich in geringer Expression in allen humanen Geweben, das Protein allerdings konnte bislang nur in Haut und Leber detektiert werden.

Wie aus Abb. 2.10 hervorgeht ist die dem WDT-Abschnitt folgende Sequenz nur 12 AS lang und besitzt, im Gegensatz zu β1A, keine NPxY Motive, welche an der innen-aussen(engl. inside-out)-Aktivierung von Integrinen sowie der aussen-innen(engl. outside-in)-Stimulation von FAK beteiligt sind [114]; [141].
Damit ist die β1B Integrin Splicevariante aufgrund ihrer inaktiven Konformation nicht in der Lage, extrazelluläre Signale über Phosphorylierung intrazellulärer Signalmoleküle, wie beispielsweise der FAK, in Richtung Zellkern zu transduzieren [7]. Splicevarianten der Integrinuntereinheit β1 sind in Abb. 2.10 dargestellt.

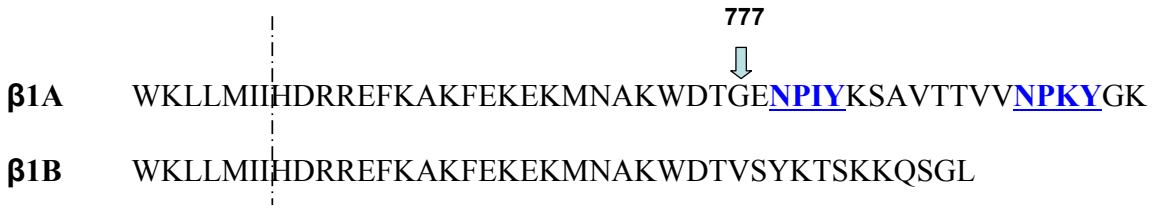

Abbildung 2.10: Aminosäuresequenzen (in internationaler Einzelbuchstaben Kodierung abgekürzt) der zytoplasmatischen Splicevariante der humanen β1 Untereinheiten A und B. Der N-terminale Part ist bis zur WDT777 Sequenz auf Höhe des Pfeils allen Splicevarianten gemeinsam. Unterstrichen finden sich beide NPxY Motive in β1A. Aus [7]

2.3 Eingriffe in die Integrität der Zelle

2.3.1 Einfluss ionisierender Strahlen

Die biologische Wirkung ionisierender Strahlen im Gewebe resultiert aus lokaler Energieabsorption. Absorption führt zum einen zur Anregung von Molekülen, wobei ein Elektron eines Atoms oder Moleküls auf eine höhere energetische Schale gehoben wird, anderseits zu Ionisation, wobei Elektronen ausgestoßen werden, um weitere Moleküle zu ionisieren. Daneben wird Schwingungs- und Rotationsenergie frei, die sich vor allem in Wärme umwan-

delt. Der Großteil des Strahlenschadens entsteht durch Wechselwirkung von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen mit Proteinen und Nukleinsäuren. An Proteinen kommt es hierbei zu Molekülbrüchen, Ringsprengungen, Veränderung von Sekundär- und Tertiätstruktur, Desaminierungen und Decarboxylierungen [116]; [120].

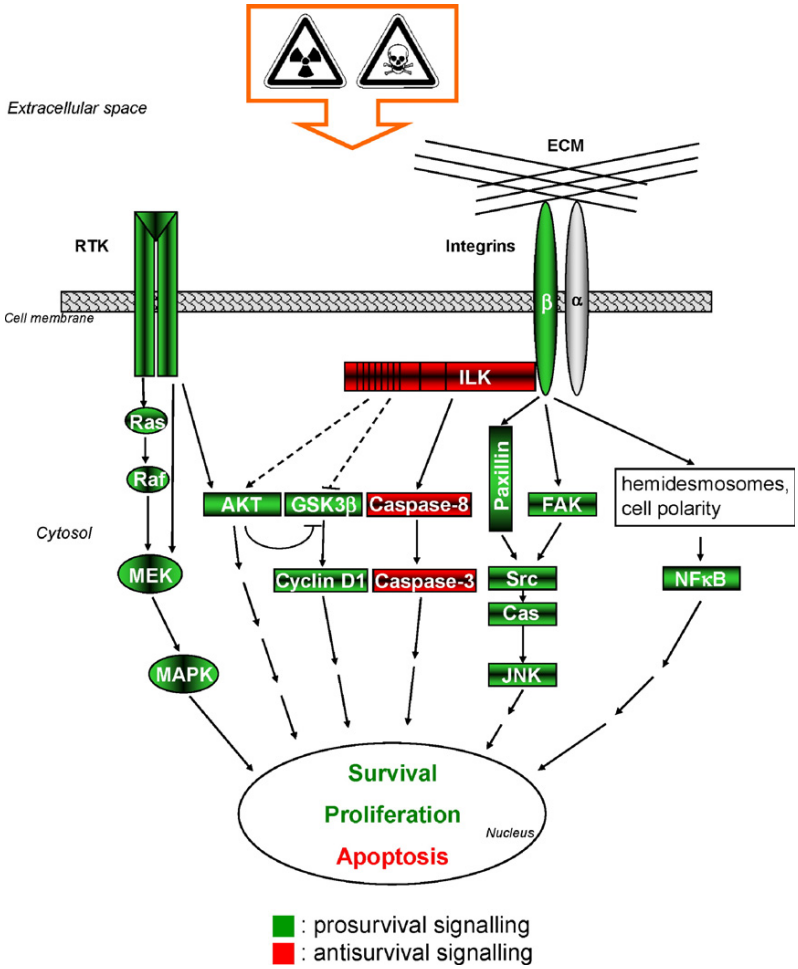

Abbildung 2.11: Schematischer Überblick über Integrin-assoziierte Signalwege, die an kritischen Zellfunktionen nach gentoxischer Schädigung beteiligt sind. Die dargestellten Signalwege sind eine kleine Auswahl aus einem umfassenden Netz verschiedener Moleküle, welche Reaktionen der Zelle auf Zelltod induzierende Stimuli modulieren. Integrin- und RTK assoziierte Signalkaskaden wie Ras/Raf/MEK/MAPK, β Integrin/FAK/JNK oder β Integrin/Nukleärer Faktor kappa B(NFkB) übermittele Pro-Überlebens-Signalwege sind grün dargestellt. ILK hingegen übermittelt Apoptose induzierende Signale (rot) via Inhibition von AKT und Interaktion mit caspase-8. Signalling via integrins [81].

An der Desoxyribonukleinsäure (DNS) führt Bestrahlung hauptsächlich zu Schäden an den Basen, denen Einzel- und Doppelstrangbrüche und schließlich reproduktiver Zelltod oder Apoptose folgen können [82]; [68]. Im Apoptoseprogramm der bestrahlten Zellen sterben diese innerhalb weniger Stunden in der Interphase des Zellzyklus oder nach irre-

versiblen Zyklusarrest in G1- oder Synthesephase [103]. Reproduktiver Zelltod bezeichnet den Verlust der Zelle mitotisch zu proliferieren und betrifft vorzugsweise Gewebe mit einen hohen Zellturnover [102].

Nicht nur die DNS stellt einen empfindlichen Angriffspunkt für ionisierende Strahlen dar. Ebenfalls relevant sind direkte Schäden an Zellorganellen, Plasmamebranen und intrazellulären Signalproteinen, die über Regulation von Zellzyklus und Transkriptionsfaktoren Apoptose und reproduktiven Zelltod mitverantworten [82]; [55].

Die nach Bestrahlung innerhalb der Zelle ablaufenden Signalprozesse sind komplex. Ihre Regulation ist abhängig vom Kontakt der Zellen zu benachbarten Zellen sowie der ECM und beinhaltet Signalwege, die sowohl von Rezeptor-Tyrosinkoinasen (RTK) als auch von Integrinen aktiviert werden [12], Abb. 2.11.

Überexpression RTK regulierter Signaltransduktion ist in Tumorzellen mit unkontrollierter Proliferation, inasivem Wachstum, autokriner Wachstumsregulation sowie erhöhter Strahlenresistenz assoziiert. [18], [138]. Ein Beispiel hierfür ist der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR), der das G-Protein Ras (engl. Rat sarcoma) aktiviert, welches wiederum die Serin/Threoninkinase Raf aktivert. Raf (engl. rapidly growing fibrosarkoma) führt zu Aktivitätszunahme der MAPK (engl. Mitogenaktivierte Protein Kinase), die Proliferation und Zellüberleben fördert [51]; [139].

Integrinen regulierte Signalwege umfassen, wie Abb. 2.11 zeigt, zwei Hauptaxen, die von den bereits beschriebenen Molekülen, ILK und FAK, aktiviert werden [41]. Tumorzellen, die erhöhte Level an ILK exprimieren, zeigen eine erhöhte Radiosensibilität [80]; [81]; [33]. Eine Überexpression von FAK hingegen hat anti-apoptotische Wirkung in Zellen, die an der ECM adhärieren [95]. Der radioprotektive Einfluß der FAK schient über Auto-Phosphorylierung an Tyr397 mit nachfolgender Phosphorylierung von Tyr925 durch Interaktion mit Src vermittelt zu werden [81]; [143]. Daraufhin erfolgt Bindung von GRB2 (engl. growth factor receptor-bound protein) mit Aktivierung des Ras/Raf/MAPK Weges [53], sowie Phosphorylierung des FAK-Bindungspartners Paxillin [16]. Abb. 2.11 gibt einen orientierenden Überblick über intrazellulären Abläufe nach Bestrahlung [81].

2.3.2 PI3K Inhibition

Wie bereits beschrieben, ist die PI3 Kinase ein Schlüsselmolekül in der Schnittstelle multipler Signalwege, die an Proliferation und Zellüberleben beteiltigt sind. Sie phosphoryliert die D3-Position des Inositolringes in Phosphoinositiden zur Generierung von Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat (PIP3), welches darauffolgend Akt an die Zellmembran

rekrutiert [115]. Klinische Ergebnisse verdeutlichen seit Jahren die Beteiligung dieser Signalwege in Tumorgenese und -progression, Angiogenese sowie Anti-Apoptose [108]. PI3K Inhibition gewinnt somit als viel versprechende Ergänzung effektiver Krebstherapien zunehmend an Bedeutung [117]. Bisher wurden verschiedene chemische Inhibitoren zur Hemmung der PI3K Familie entwickelt. Der klinischen Anwendung einiger dieser Substanzen stehen jedoch bisher ein Mangel an Spezifität sowie ungünstige pharmakologische Eigenschaften im Wege [153]. In dieser Arbeit wurde PI3K mit LY294002 und Wortmannin, den bis heute am häufigsten eingesetzten Inhibitoren [56], blockiert. Sowohl LY294002 als auch Wortmannin inhibieren die katalytische Aktivität der PI3K [108].

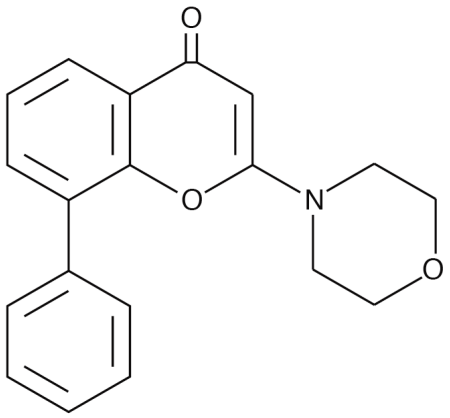

Abbildung 2.12: Strukturformel des PI3Kinase Inhibitor LY294002. Nur wenn das X im Morpholinring mit einem Sauerstoffatom besetzt ist, folgt vollständige PI3K Inhibition aus [151]

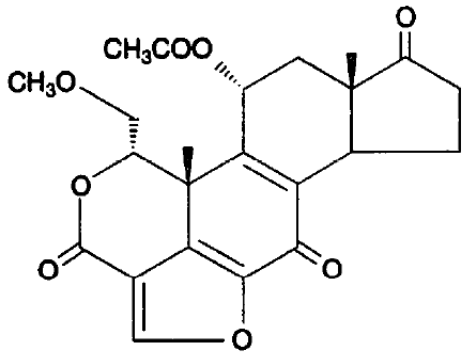

Abbildung 2.13: Strukturformel von Wortmannin, aus [148].

LY294002 (2-morpholino-8-phenyl-4H-1-benzopyren-4-one) wurde bereits 1981 als potenter und spezifischer PI3K Inhibitor beschrieben [151]. LY294002 inhibiert selektiv PI3K ohne Inhibition von EGF- und PDGF-Rezeptor, Src, MAPK, Proteinkinase A und C [30]. PI3K Inhibition durch LY294002 ist von Bindung seines Sauerstoff tragenden Morpholin-

ringes an der Adenosintriphosphat(ATP)-Bindungsdomäne der PI3K abhängig [151].

Wortmannin wurde bereits Anfang der neunziger Jahre als fungaler Metabolit mit anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Effekten beschrieben. Durch kovalente Bindung an die katalytische p110 Untereinheit inhibiert Wortmannin die PI3K irreversibel und nicht-kompetetiv, so dass deren Aktivierung durch RTK (wie z. B. durch Wachstumsfaktor Rezeptoren) verhindert wird [155]. Weiterhin inhibiert Wortmannin die MAPK sowie die MLCK (engl. myosin light-chain kinase) [160].

Kapitel 3

Material

3.1 Zelllinien

Die für die Experimente verwendeten GD25 Zellen sind Mausfibroblasten und stammen von $\beta 1$ Nullstammzellen ab. Über Transfektion wurden GD25β1A und die Mutanten GD25β1B erzeugt. Die GD25β1A Zellen stellte uns freundlicherweise Prof. Dr. Fässler (Abteilung für Molekulare Medizin, Max-Planck Institut für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung. Die GD25β1B Zellen stammen von Dr. Velling (Department of Medical Biochemistry and Microbiology, The Biomedical Center, Uppsala University, Sweden).

3.1.1 Herstellung der GD25β1A und GD25β1B Splicevarianten

Die Integrin-defizienten GD25 Fibroblasten stammen aus Mausembryonen des Klons G201. Sie entwickeln sich aus Stammzellen und sind homozygote Knockoutzellen mit mutantem $\beta 1$ Integrin ($\beta 1$ Integrin -/-) [61], Zur Herstellung von GD25β1A (-/β1A) und GD25β1B (-/β1B) wurden diese GD25 Fibroblasten mit den cDNA Vektoren β1A und β1B transfiziert, die vorher über PCR mit spezifischen Primern isoliert wurden [8]. Zur Verifizierung erfolgreicher Transfektion wurde die Integrin Expression im Anschluss via DNS-Sequenzierung und Durchflusszytometrie der Oberflächenexpression bestimmt. Die verwendeten GD25β1A und GD25β1B Zellen exprimieren die Splicevarianten ihrer Integrine in gleicher Quantität [9].

3.2 Medium

DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium (Gibco, Karlsruhe)
FCS	Fetal Calf Serum Gold (PAA, Pasching, Österreich)
NEA	Nicht- essentielle Aminosäuren (Gibco, Karlsruhe)

Zur Kultivierung der Zellen wurde DMEM (500 ml) mit 10% FCS (55 ml) und 1% NEA (5,5 ml) versetzt. Lagerung steril bei 4°C. pH des Mediums 7,4. Für die unter Serumentzug durchgeführten Versuchsreihen wurde DMEM mit 1% nicht essentiellen Aminosäuren ohne Zugabe von FCS verwendet.

3.3 Geräte und Hilfsmittel

3.3.1 Zellkultur

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

3.3.2 Bestrahlung

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

3.3.3 Koloniebildungsassay

6er-Platten	Multiwell 353046 (Becton Dickinson, Heidelberg)
Auflichtmikroskop	STEMT SV8 (Zeiss, Oberkochen)
Software	Sigma Plot 5,0 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath)

3.3.4 Western-Blot

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

3.3.5 Akt Kinase Assay

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

3.4 Reagenzien

3.4.1 Zellkultur

Trypsin	Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe)
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid (HybriMax, CR1194, Sigma-Aldrich, Steinheim)
G418	Geniticin (Calbiochem, Bad Soden)
LM-Agarose	Sea Plaque Agarose (BMA, Rockland, USA)
DMEM-Pulver	(Gibco, Karlsruhe)
$NaHCO_3$	Natrium-Hydrogencarbonat MW 84.01 g/mol (Merck, Darmstadt)

3.4.1.1 2-fach DMEM

DMEM-Pulver	12,04 g
$NaHCO_3$	3,34 g

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

3.4.1.2 Low-Melt-Agaroselösung

LM-Agarose	2 g
C_2H_5OH	Ethanol vergällt (Carl Roth, Karlsruhe)
$HCHO$	Formaldehyd 4 % (Merck, Darmstadt)
CH_3OH	Methanol (Merck, Darmstadt)
CH_3COOH	Eisessig (Merck, Darmstadt)
Coomassie	G250 Brilliantblau (Merck, Darmstadt)

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

3.4.1.3 Coomassie-BIau-Lösung

CH_3OH	200 ml
CH_3COOH	75ml
Coomassie	0,5 g

ad 1l Aqua bidest. Lagerung lichtgeschützt bei Raumtemperatur.

3.4.2 Western-Blot

NaCl	Natrium-Chlorid, MW 58,44 g/mol (Merck, Darmstadt)
KCl	Kalium-Chlorid, MW 74,56 g/mol (Merck, Darmstadt)
Na_2HPO_4	Di-Natrium-Hydrogenphosphat, MW 141,96 g/mol (Merck, Darmstadt)
KH_2PO_4	Kalium-Hydrogenphosphat, MW 136,09 g/mol (Merck, Darmstadt)
Tween	Tween 20, USB (Amersham Biosciences Europe, Freiburg)
Tris-HCl	Tris-HCl, pH 7,4, MW 157,6 g/mol (Merck, Darmstadt)
NP-40	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Na-Desoxycholat	Natrium-Desoxycholat MW 414.56 g/mol (Merck, Darmstadt)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Sigma Chemical CO. St. Louis, USA)
Complete	Proteaseinhibitor (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
BCA-Reagenz	BC Assay Reagent (Interchim, Montluon, Frankreich)
Tris-Base	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Acrylamidlösung	Acrylamid/bis-Acrylamid 30% (Sigma-Aldrich, Steinheim)
SDS	n-Dodecylsulfat Natriumsalz (Merck, Darmstadt)
APS	PlusOne Ammonium persuiphate (Amersham Biosciences, Freiburg)
TEMED	PlusOne TEMED (Amersham Biosciences, Freiburg)

C_3H_70H	Isopropanol (Merck, Darmstadt)
Marker	BenchMark Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)
$C_3H_80_3$	Glycerol (Merck, Darmstadt)
OHC_2H_4SH	Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
Bromphenolblau	(Serva, Heidelberg)
Glycin	MW 75.07 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim)
H_3BO_3	Borsäure (Merck, Darmstadt)
Ponceau S-Lösung	Ponceau 5 (Serva, Heidelberg)
Milchpulver	Magermilchpulver (Merck, Darmstadt)
ECL	ECLTM W.-Blot Detec. Reag. (Amersham Biosc., Freiburg)
Entwickler	GBX Developer (Kodak, Stuttgart)
Fixierer	GBX Fixer (Kodak, Stuttgart)

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

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na_2HPO_4	11 g
KH_2PO_4	2 g

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

3.4.2.2 Waschpuffer

1 × PBS	2000 ml
Tween	2 ml

Lagerung bei 4°C.

3.4.2.3 RIPA-Lysepuffer

Tris-HCl (pH 7,4)	50 mM
NP-40	1%
Na-Desoxycholat	0,25%
NaCl	150 mM
EDTA	1mM

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.

3.4.2.4 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:

$$\frac{\text{Anzahl der Wells} \times 200\ \mu\text{l}}{50} = \text{Menge von Reagenz B (1 Teil)} \tag{3.1}$$

Lagerung bei Raumtemperatur, lichtgeschützt.

3.4.2.5 Trenngelpuffer

Tris-Base	18,17 g

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

3.4.2.6 Sammelgelpuffer

Tris-Base	6,06 g

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

3.4.2.7 Trenngel

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

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

3.4.2.8 Sammelgel

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

3.4.2.9 Ladepuffer

Glycerol	2 ml
10% SDS-Lösung	2 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Mercaptoethanol	0,5 ml
Bromphenolblau	1 mg

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

3.4.2.10 Laufpuffer

Glycin	14,41 g
Tris-Base	3,03 g
SDS	l g

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

3.4.2.11 Anodenpuffer

Borsäure	3,1 g
SDS-Lösung	4 ml
Methanol	200 ml

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

3.4.2.12 Kathodenpuffer

Borsäure	3,1 g
SDS-Lösung	4 ml
Methanol	50 ml

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

3.4.2.13 Blocking Puffer

Milchpulver	5 g

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

3.4.2.14 ECL^{TM} 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:

$$0{,}3\ \frac{\text{ml}}{\text{cm}^2} \times \text{ Membranfläche} = \text{anzusetzende Menge Reagenz} \tag{3.2}$$

3.4.2.15 Entwickler

GBX Developer	100 ml
Aqua bidest	400 ml

3.4.2.16 Fixierer

GBX Fixer	100 ml
Aqua bidest	400 ml

3.4.3 Akt Kinase Assay

10 × Zell-Lysepuffer	(Cell Signaling, Frankfurt)
l0 × Kinasepuffer	(Cell Signaling, Frankfurt)
GSK3β-Fusionsprotein	(Cell Signaling, Frankfurt)
ATP	(Cell Signaling, Frankfurt)

Der l0 × Zell-Lysepuffer wurde nach Verdünnung mit Aqua bidest. mit 40 μg/ml Complete versetzt.

3.5 Rezeptorliganden

Fibronektin	1 mg/ml (Becton Dickinson, Heidelberg)
Vitronektin	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Kollagen III	(Calbiochem, Bad Soden)
Laminin	(Sigma-Aldrich, Hamburg)
Poly-L-Lysin	1 mg/ml (Calbiochem, Bad Soden)
Anti-β1-Integrin-IgG	(Dako, Hamburg)

3.6 Inhibitoren

LY294002	PI3K-Inhibitor 1250 μM in Ethanol (Calbiochem, Bad Soden)
Wortmannin	PI3K-Inhibitor 100 μM in DMSO (Sigma-Aldrich, Hamburg)

3.7 Antikörper

3.7.1 Primärantikörper

AKT	polyklonal, Hase IgG, (Cell Signaling, Frankfurt a.M.) WB 1:500 Milchpulver (MiPu), IF 1:100 BSA
Phospho-AKT S473	polyklonal, Hase IgG, (Cell Signaling, Frankfurt a.M.) WB 1:250 MiPu
Phospho-AKT T308	polyklonal, Hase IgG, (Cell Signaling, Frankfurt a.M.) WB 1:250 PBS Tween
GSK3β	monoklonal (Cl.7), Maus IgGl, (Becton Dickinson, Heidelberg) WB 1:500 MiPu
Phospho-GSK3α/β-S21/9	polyklonal, Hase IgG, (New England Biolabs GmbH, Germany) WB 1:250
Paxillin	polyklonal, Hase IgG, (Sigma Aldrich, Hamburg) WB: 1:500 MiPu
Phospho-Paxillin-Y118	polyklonal, Hase IgG, (Cell Signaling, Frankfurt a.M.) WB 1:250 MiPu
Phospho-Paxillin-Y31	polyklonal, Hase IgG, (Sigma Aldrich, Hamburg) WB 1:500 MiPu
p130Cas	polyklonal, Hase IgG, (Biomol, Hamburg) WB 1:200 MiPu
Phospho-p130Cas-Y410	polyklonal, Hase IgG, (Cell Signaling, Frankfurt a.M.) WB 1:500 MiPu
Phospho-JNK	polyklonal, Hase IgG, (Santa Cruz, Heidelberg) WB 1:500 MiPu
FAK	monoklonal, Maus IgG, (Becton Dickinson, Heidelberg) WB 1:2000 MiPu
Phospho-FAK Y397	polyklonal, Hase IgG, (Calbiochem, Bad Soden) WB 1:500 MiPu
Phospho-FAK Y925	polyklonnal Ziege IgG (Santa Cruz, Heidelberg) WB 1:200 MiPu
β-Actin	monoklonal (Cl.AC- 15)Maus- IgG1 (Sigma Aldrich, Hamburg) WB 1:2000 MiPu
Negativkontrolle FITC	monoklonal, Maus IgG1 (Serotec, Düsseldorf) DZ 1:10

3.7.2 Sekundärantikörper

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

Kapitel 4

Experimentelle Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Subkultivierung

Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C, einem CO_2 Gehalt von 10% und einem pH von 7,4 kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70-90% wurden die Zellen einmal mit Trypsin gespült, anschließend abtrypsiniert und im Verhältnis 1:4 bis 1:10 passagiert.

4.1.2 Einfrieren

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

4.1.3 Auftauen

Das Kryoröhrchen wurde zügig erwärmt und der Inhalt in eine 75 cm^2 Zellkulturflasche mit 12 ml Medium gegeben. Nach 24h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

4.1.4 Bestrahlung

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

4.2 Koloniebildungsassay

Der Koloniebildungsassay, welcher das klonogene Überleben erfasst, diente als Untersuchungsmethode für die Sensibilität verschiedener Zellen gegenüber genotoxischen Einflüssen. Hierzu wird eine definierte Zellzahl ausgesät und nach entsprechendem Protokoll, wie in Abb. 4.1 dargestellt, behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 7-11 Tagen wurden die Kolonien angefärbt und gezählt.

4.2.1 Ansatz

Die 6-Well-Platten wurden mit Fibronektin, Vitronektin, Laminin, KollagenIII , β1-IgG oder dem Kontrollsubstrat Poly-L-Lysin (1 μg/cm^2) eine Stunde bei Raumtemperatur beschichtet. Für die Versuche wurden subkonfluent wachsende Zellen abtrypsiniert. Nachdem die Zellen einmal mit PBS gewaschen und bei 800 rpm fünf Minuten zentrifugiert worden waren, wurde das Zellpellet vorsichtig mit DMEM ohne FCS resuspendiert. Daraufhin folgte eine Zellzahlbestimmung. Je nach Bedingung wurden verschiedene Zellzahlen mit und ohne FCS ausgesät und für 24 Stunden kultiviert, wie Tab. 4.1 zeigt.

Gy	0	2	4	6
Zellzahl	500	500	1000	3000

Tabelle 4.1: Zellzahlbestimmung

Serumentzug und/oder Inkubation mit PI3K Inhibitoren erfolgte nach 8 Stunden, Bestrahlung nach 24 Stunden. Serum deprivierten Zellen wurde 8 Stunden nach Bestrahlung 200 μl FCS zugegeben.

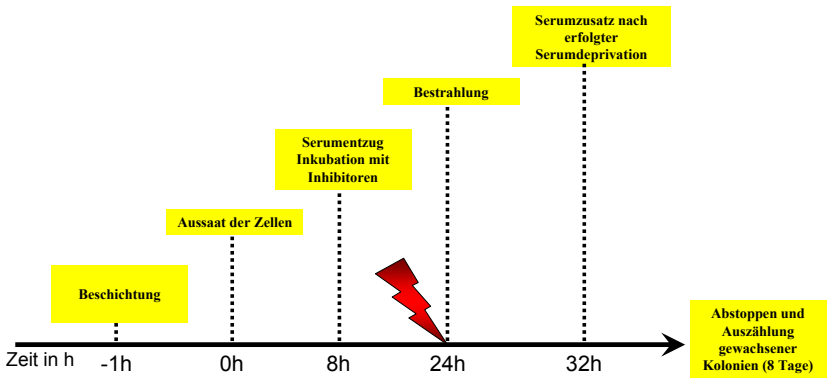

Abbildung 4.1: Zeitliche Abfolge der Einzelschritte in Koloniebildungstests: Die 6-Well-Platten wurden eine Stunde vor Bestrahlung mit Matrixproteinen oder Poly-L-Lysin beschichtet. Serumentzug und/ oder Inkubation mit PI3K Inhibitoren erfolgte nach 8 Stunden, Bestrahlung nach 24 Stunden. Serum deprivierten Zellen wurde 8 Stunden nach Bestrahlung 200 μl FCS zugegeben. Abgestoppt und gefärbt wurden die Koloniebildungstests nach einer Proliferationszeit von 8 Tagen bei 37°C und 10% CO_2.

4.2.2 Bestrahlung

Nach Proliferationszeit von 24 Stunden wurden die GD25β1A und GD25β1B Zellen mit 2,4 und 6 Gy bestrahlt, bzw. nicht behandelt (Kontrolle). Nach weiteren 8 Stunden wurde den Zellen, denen 16 Stunden vor Bestrahlung Serum entzogen worden war, 200 μl FCS (pro Well) zugegeben.

4.2.3 Fixierung

Nach Entfernung des Mediums wurden die Wells mit 2 ml 1xPBS gespült. Ein Mililiter einer 4%-Formaldehydlösung wurde pro Vertiefung zugegeben und für 30 Minuten belassen. Anschließend wurden die Platten für 30 Minuten mit 1 ml 70% Ethanol behandelt und mit Wasser gespült. Die Kolonien ließen sich daraufhin mit Coomassie anfärben.

4.2.4 Auswertung

Die Kolonien wurden mit einem Auflichtmikroskop ausgezählt, wobei eine Kolonie als eine Anhäufung von mehr als 50 Zellen definiert war. Jede Versuchsreihe wurde dreimal durchgeführt. Die Werte der einzelnen Experimente wurden jeweils auf verwendete Zellzahl und Kontrolle abgeglichen.

4.3 Western-Blot

Mittels Elektrophorese können die verschiedenen Proteine eines Zellysats aufgetrennt werden. Bei der Dodecylsulfat Natriumsalz Polyacrylamid Gel Elktrophorese (SDS-Page) erfolgt dies fast ausschließlich nach dem Molekulargewicht, da die Proteine durch das SDS eine stark negative Ladung erhalten und dadurch ihre eigene Ladung vernachlässigbar wird. Nach der Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine durch Anlegen einer Spannung vom Gel auf eine Membran transferiert (Blotten). Der Nachweis erfolgt durch Aufbringen spezifischer Primärantikörper, die in einem zweiten Schritt durch einen Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper gebunden werden. Dieses Enzym ("horseradish peroxidase", HRP) katalysiert die Freisetzung von H_20_2 welches mit dem ebenfalls zugegebenen Luminol reagiert. Die relative Intensität des hierbei entstehende Licht kann mittels Auflegen eines Films gemessen werden.

4.3.1 Ansatz

Zunächst wurden Petrischalen mit den verschiedenen Matrixproteinen und Poly-L-Lysin (1 μg/cm^2) bei Raumtemperatur für eine Stunde beschichtet. Daraufhin wurden subkonfluente Zellen abtrypsiniert, einmal gewaschen (Zentrifugation mit 800 rpm, 5 Minuten). Pro Petrischale wurden 1 Mio. Zellen ausgesät und nach dem in Abb. 4.1 beschriebenen Ablauf weiter behandelt: Serumentzug und/ oder Inkubation mit PI3K Inhibitoren erfolgte nach 8 Stunden, Bestrahlung nach 24 Stunden. Serum deprivierten Zellen wurde 8 Stunden nach Bestrahlung 200 μl FCS zugegeben. Darauf folgend wurden die Zellen bei 37°C und 10% CO_2 für bis zum Zeitpunkt der Proteinextraktion, die eine Stunde nach Bestrahlung durchgeführt wurde, belassen.

4.3.2 Proteinextraktion

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

4.3.3 Proteinbestimmung

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

Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA (2 mg/ml) verwendet, die in vier Schritten jeweils um den Faktor 2 mit RIPA-Lysepuffer (ohne Zusätze) verdünnt wurde. Als Leerwert diente unverdünnter RIPA-Lysepuffer. Von allen Werten wurden je zweimal 10 μl auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend mit 200 μl BCA-Reagenz vermischt. Die Absorptionsmessung erfolgte mittels eines ELISA-Spektrometers bei einer Wellenlänge von 562 nm.

4.3.4 SDS-Gelelektrophorese und Proteintransfer

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

4.3.4.1 SDS-Gelelektrophorese

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

4.3.4.2 Proteintransfer

Sobald die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Zum Transferieren der Proteine auf die Membran diente ein Blotting-Gerät, das mit Halbtrocken-Technik (semi-dry) arbeitete. Die Membran wurde auf der 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 x Membranfläche [cm2] 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.

4.3.5 Detektion

Die Membran wurde für fünf Minuten in 1xPBS und anschließend für weitere 60 Minuten in 5% Milchpulver 1xPBS geblockt. Der verdünnte Primärantikörper inkubierte auf dem Schwenktisch für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Membran dreimal fünf Minuten mit PBST gewaschen. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur, wurde die Membran erneut sechsmal fünf Minuten mit PBST gewaschen. Zur Detektion wurde gleichmäßig ECL aufgetragen und die entstehende Lumineszenz auf Film festgehalten.

4.3.6 Auswertung

Die densitomentrische Auswertung erfolgte mit der Software Image Quant. Die Filme wurden hierzu mit einem Scanner eingelesen und die Schwärzung der Banden quantitativ bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden diese Werte auf ein sog. "housekeeping"Protein (hier: β Aktin; besitzt einen konstanten Anteil am Gesamtprotein einer Zelle) normiert. Die Werte eines Immunblots sind relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben.

4.4 Akt Kinase Assay

4.4.1 Ansatz

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

4.4.2 Akt Immunpräzipitation

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

Zentrifugation mit 13.000 rpm für 30 Sekunden an, wobei das Pellet sowohl einmal mit 500 μl lx Zell-Lysepuffer, als auch mit 500 μl lx Kinasepuffer gewaschen wurde.

4.4.3 Kinase Assay

Dem Präzipitat wurden folgende Substanzen beigefügt:

- *1x Kinasepuffer* 40 μl
- *ATP* 200 μM
- *GSK3-Fusionsprotein* 1 μg

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

4.4.4 Western-Blot und Detektion

Der Western Blot wurde wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, durchgeführt. Um die relative Kinaseaktivität von Akt zu ermitteln, wurde phospho-GSK3 Serinα/β-Ser21/9 detektiert.

4.5 Wachstumskurve

4.5.1 Ansatz

Hierfür wurden 25 cm^2-Kulturflaschen mit den bereits genannten Matrixproteinen oder Poly-L-Lysin für eine Stunde bei Raumtemperatur beschichtet. Nach Abtrypsinierung wurden die Zellen einmal gewaschen (Zentrifugation: 800 rpm, 5 Minuten) und in DMEM ohne Serum aufgenommen. Um für alle Werte der Wachstumskurve die gleiche Ausganszellzahl auszusäen, wurden Zellsuspensionen (5000 Zellen/ml) mit und ohne FCS angesetzt und jeweils 5 ml davon auf die einzelnen Flaschen verteilt. Der weitere Ablauf folgte dann wiederum dem in Abb. 4.1 erläutertem Schema. Ausgezählt wurde, wie beim Koloniebildungstest, nach einer Bebrütungszeit von 8 Tagen.

4.5.2 Zählung

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

4.5.3 Auswertung

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

4.6 Statistik

4.6.0.1 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Mittelwerte ± Standardabweichungen (SD) von Überlebensfraktionen, Zelladhäsionen, Zellzahlen und Proteinphoshorylierungen wurden berechnet und in Relation zur unbehandelten Kontrolle, definiert als 1.0, gesetzt. Zur Testung der statistischen Signifikanz wurden Varianzanalysen (ANOVA) aus drei von einander unabhängigen Experimenten durchgeführt. Ergebnisse ab einem p-Wert von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Kapitel 5

Ergebnisse

5.1 β1 Integrin abhängiges Zellüberleben nach Bestrahlung in An- und Anwesenheit von Wachstumsfaktoren auf verschiedenen Substraten

Analyse des klonogenen Zellüberlebens nach Bestrahlung wurde durchgeführt, um den Einfluss der β1 Integrinuntereinheit in Mausfibroblasten auf das Überleben in An- und Abwesenheit von Wachstumsfaktoren sowie auf verschiedenen Proteine der ECM zu bestimmen.
Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ Standartabweichung (SD) aus drei voneinander unabhängigen Experimenten in Form von Dosis-Effekt-Kurven veranschaulicht. Die Darstellung erfolgte halblogarithmisch mit der Fraktion klonogener Zellen auf der Ordinate und der applizierten Strahlendosis in Gray (Gy) auf der Abzisse. Alle Daten wurden auf die Kontrolle (100% = 1) normiert. Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte über die Varianzanalyse ANOVA.

5.1.1 Auf Poly-L-Lysin

Entzug von Wachstumsfaktoren radiosensibilisiert auf Poly-L-Lysin (PLL) kultivierte GD25β1A und GD25β1B Zellen gleichermaßen (Abb. 5.1). In diesem Versuchsansatz wurden die Zellen nach dem in der Abb. 4.1 beschriebenem Ansatz auf 1μg PLL/cm^2 ausgesät. Serum- deprivation folgte 16h vor Bestrahlung, Auszählung gewachsener Kolonien nach 8 Tagen.

Unter der Fragestellung, welchen Einfluss Adhäsion an Proteine der ECM auf Integrin-vermitteltes Zellüberleben ausübte, wurde im nächsten Schritt Dosis-Effekt-Kurven der beiden Zelllinien auf verschiedenen Matrixproteinen miteinander verglichen. Dies geschah wiederum sowohl in An- als auch Abwesenheit von Wachstumsfaktoren, um Integrin- von Wachstumsfaktor-Rezeptor-vermittelten Effekten abgrenzen zu können.

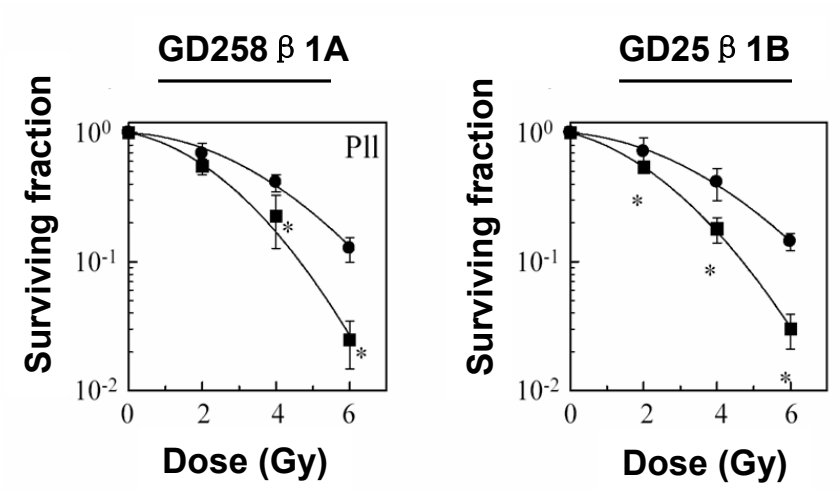

Abbildung 5.1: Dosis-Effekt-Kurve des klonogenen Zellüberlebens auf Poly-L-Lysin (PLL). Sowohl GD25β1A als auch GD25β1B zeigen eine gleichermaßen ausgeprägte Sensibilisierung in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren. Ordinate: Fraktion klonogener Zellen (surviving fraction); Abszisse: applizierte Strahlendosis in Gray (Gy); Serum deprivierte Zellen als Quadrate, in Serum kultivierte Zellen als Kreise dargestellt.

5.1.2 Auf verschiedenen Substraten

Mit dem im vorherigen Kapitel beschriebenem Versuchsansatz wurde das klonogene Zellüberleben auf den Matrixproteinen Fibronektin (Fn), KollagenIII (CollIII), Laminin (Ln), Vitronektin (Vn) sowie β1-IgG in An- und Abwesenheit von Wachstumsfaktoren untersucht.

Es zeigt sich hierbei **unter Serumdeprivation** ein Überlebensvorteil der signalkompetenten GD25β1A gegenüber GD25β1B Zellen: In Abwesenheit von Wachstumsfaktoren zeigten GD25β1B Zellen eine deutliche Strahlen-Sensibilisierung auf Fn, CollIII und Ln bereits ab 2 Gy, auf Vn sowie β1-IgG ab 4 Gy.

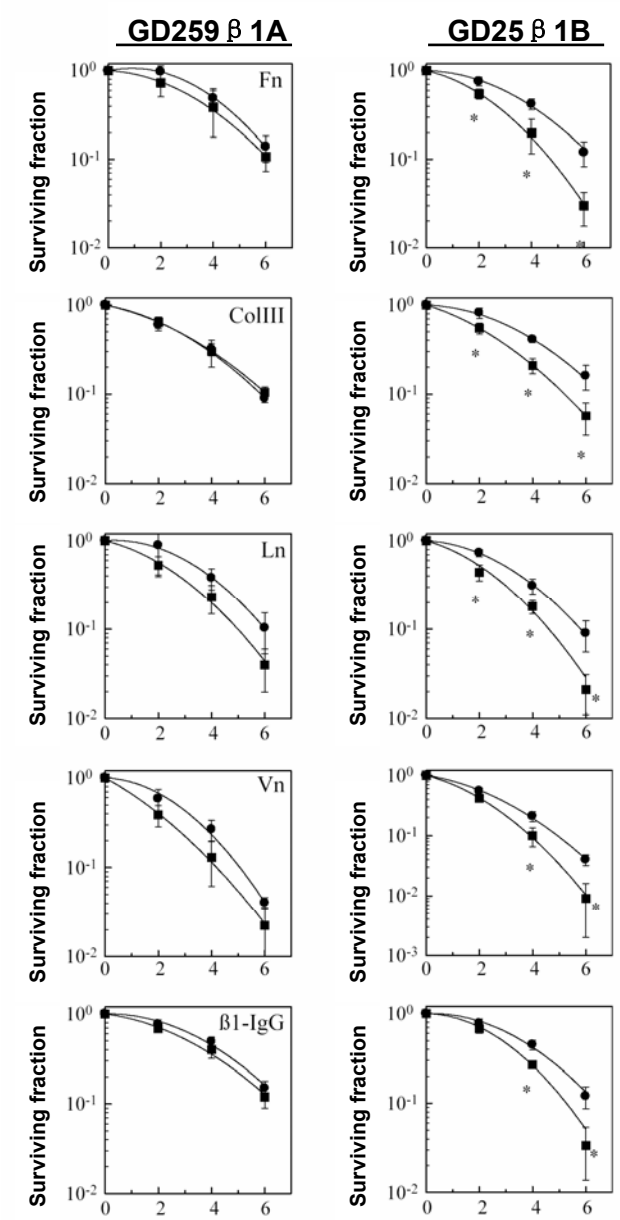

Abbildung 5.2: β1A Integrine schützen Zellen vor strahleninduziertem Zellsterben in einem wachstumsfaktorunabhängigen Prozess. Die Graphiken illustrieren das klonogene Zellüberleben nach Bestrahlung (0-6 Gy) auf Fibronectin (Fn), Kollagen-III (ColIII), Laminin (Ln), Vitronectin (Vn) sowie anti-β1-integrin IgG (β1-IgG), jeweils in einer Konzentration von 1 μg/cm^2. Serumdeprivation wurde 16h vor Bestrahlung durchgeführt, Zellkolonien wurden nach einer Wachstumsperiode von 8 Tagen gezählt. Varianzanalysen (ANOVA) zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurden zum Vergleich der in Serum kultivierten Zellen (als Kreise dargestellt) mit den Serum deprivierten Zellen (als Quadrate dargestellt) durchgeführt. $*p < 0,01$

5.1.3 Zusammenfassung

Interessanterweise überlebten die Signal-kompetenten GD25β1A Zellen **Wachstumsfaktor unabhängig** auf Substraten der extrazellulären Matrix, **nicht aber auf Pll**. Die

β1B Integrin exprimierenden Mutanten hingegen zeigten unter Serumentzug eine ausgeprägte Radiosensibilisierung ($p < 0,01$) ab einer Strahlendosis von $\leq$ 2Gy auf Fn, CollIII, Ln und Pll sowie auf Vn und β1-IgG ab einer Dosis von $\geq$ 4Gy (Abb. 5.2). Sowohl Wachstumsfaktor-Rezeptoren als auch β1 Integrine transduzieren überlebensförernde Signale. Die hier erhobenen Ergebnisse veranschaulichen die Bedeutung von β1 Integrinen im Überleben nach genotoxischer Zellschädigung, da sie das Überleben der Signaling-/Adhäsionskompetenten GD25β1A auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren sichern. Zur Spezifizierung der zugrunde liegenden Mechanismen wurde wie folgt fortgefahren:

5.2 β1 Integrin abhängiges Zellüberleben nach Bestrahlung auf verschiedenen Substraten in An- und Abwesenheit von Wachstumsfaktoren und PI3K-Inhibitoren

Ähnlich den Wachstumsfaktoren regulieren β1 Integrine das Zellüberleben über die Akt Signal Achse in Abhängigkeit von PI3K [150]. Um den Einfluss dieser Interaktionen auf das Zellüberleben nach Bestrahlung zu evaluieren, wurde PI3K mit LY294002 oder Wortmannin in Zellen inhibiert, die auf Fn oder β1-Integrin-IgG in An- oder Abwesenheit von Serum kultiviert wurden. Die Koloniebildungsassays wurden wie in Kapitel 5.1 beschrieben, durchgeführt. Exposition mit den PI3K Inhibitoren Ly294002 (10 μM) und Wortmannin (50 nM) erfolgte 8 Stunden vor Bestrahlung mit 6 Gy.

5.2.1 Kontrolle

Zum Ausschluss einer basalen Zytotoxizität wurden die Effekte von Wortmannin und LY294002 in unbestrahlten GD25β1A und GD25β1B Zellen auf Fibronektin in Koloniebildungsassays mit einer DMSO Kontrolle verglichen. Weder Exposition mit LY294002 noch mit Wortmannin zeigten Veränderungen im Zellüberleben.

5.2.2 Vergleich des Überlebens von GD25β1A mit GD25β1B Zellen unter PI3K Inhibition

In GD25 β1A zeigte sich nach Bestrahlung mit 6 Gy unter PI3K Inhibition ein moderat erhöhtes Zellsterben gegenüber der DMSO Kontrolle und nicht behandelten Zellen ($p <$

$0,01$). Dieser Effekt war gleichermaßen auf Fn und β1-IgG zu beobachten, sowohl in Anals auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren (Abb. 5.4). Eine signifikante Reduktion des Überlebens war in GD25 β1B ebenfalls zu beobachten, allerdings im Vergleich zu GD25 β1B deutlich stärker ausgeprägt, wie Abb. 5.4 illustriert. Es zeigte sich hierbei weder eine Abhängigkeit von Serum noch ein Unterschied zwischen den verwendeten Matrixproteinen Fn und β1-IgG. Aus diesem beobachteten Phänomen ergibt sich die Hypothese, dass β1 Integrine neben PI3K/Akt Aktivierung noch in zusätzliche, PI3K unabhängige Signalwege involviert sind, die einen positiven Effekt auf das Zellüberleben nach Bestrahlung haben.

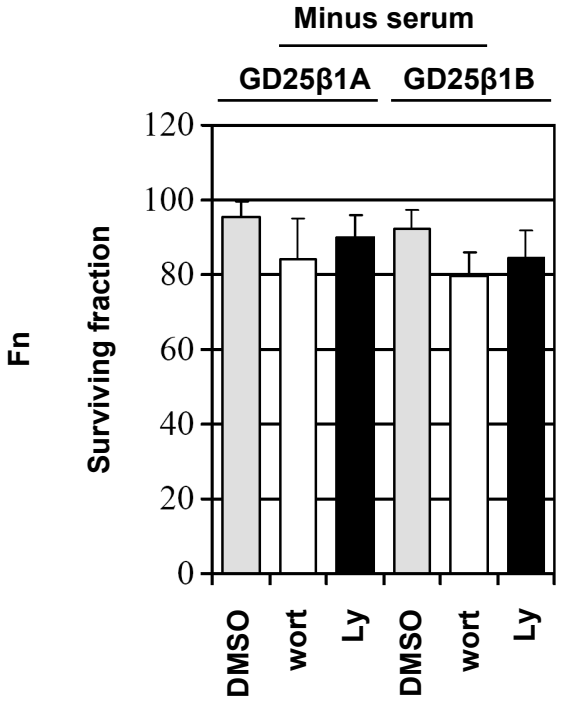

Abbildung 5.3: Klonogenes Überleben unbestrahlter GD25β1A und GD25β1B Zellen auf Fibronektin (Fn) unter PI3K Inhibition in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren. Weder Exposition mit10 μM Ly294002 (Ly) noch 50 nM Wortmannin (Wort) in zeigte signifikant basale Zytotoxizität.

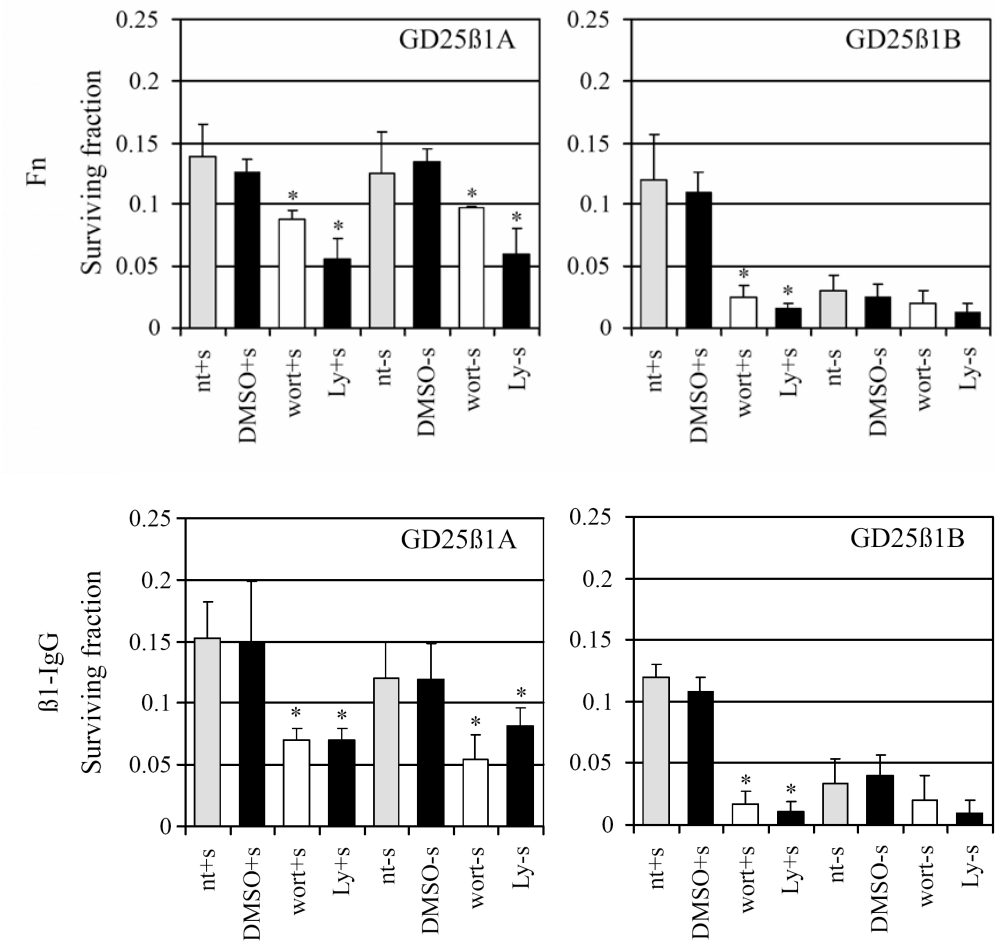

Abbildung 5.4: PI3K Inhibition zeigt in GD25β1A und GD25β1B Zellen eine Radiosensibilisierung unterschiedlicher Ausprägung. Auf Fibronektin (Fn) oder β1-IgG kultivierte Zellen wurden vor Bestrahlung (6 Gy) mit Ly294002 (10 μM, Ly), Wortmannin (50 nM, wort) oder verdünntem DMSO inkubiert. In statistischen Analysen wurden Ly294002 exponierte Zellen mit nicht exponierten sowie Wortmannin exponierte Zellen mit DMSO exponierten verglichen. Die Zellen wurden in allen Ansätzen mit 6 Gy bestrahlt. nt=not treated, s=serum. $*p < 0,01$

5.3 AKT/GSK3β-Phosphorylierung auf β1-IgG und Fibronektin unter PI3K Inhibition in An- und Abwesenheit von Wachstumsfaktoren

Im nächsten Schritt wurde die Aktivität von Akt, als Indikator für erfolgreiche PI3K Inhibition, mit Hilfe von Western Blots und Akt-Kinase Assays bestimmt.
β1 Integrine aktivieren PKB/Akt direkt und PI3K unabhängig [150], [62]. Um die Mechanismen des im vorherigen Kapitel beschriebenen Überlebensvorteils der GD25β1A Zellen

nach Bestrahlung zu spezifizieren, analysierten wir die Akt Aktivitäten auf Fn oder β1-IgG kultivierten Zellen sowohl mit als auch ohne Serum.

5.3.1 Akt Aktivität 30 Min. nach Bestrahlung

Um die Reaktivität von Akt sowie ihrer phosphorylierenden Enzyme abzuschätzen, wurden GD25β1A und GD25β1B Zellen mit 2 Gy bestrahlt. Herstellung der Zell-Lysate erfolgte 30 Minuten nach Bestrahlung und wurde in Immunoblot Technik bestimmt. Wie 5.5 illustriert, zeigen GD25β1A und GD25β1B eine deutliche Induktion der Phosphorylierung von Akt an Aminosäure Serin(Ser)473 nach Bestrahlung, wohingegen die unbestrahlte Kontrolle (co) dies nicht aufweist.

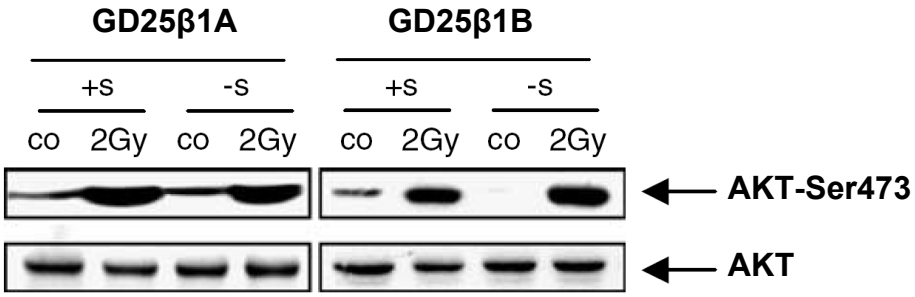

Abbildung 5.5: Bestrahlung induziert Akt Phosphorylierung an Serin(Ser)473 sowohl in Anwesenheit (+s) als auch in Abwesenheit (-s) von Wachstumsfaktoren. Herstellung der Zell-Lysate erfolgte 30 Min nach Bestrahlung mit 2 Gy/ohne Bestrahlung (co) der zuvor auf β1-IgG in An-/Abwesenheit von Serum über 24h kultivierten Zellen. Die Gesamt-Akt Expression, dargestellt in der zweiten Zeile der Abbildung, wurde als Ladekontrolle verwendet.

5.3.2 Akt Phosphorylierung an Ser473 und Thr308

Akt Phosphorylierung als Indikator für die Aktivität der PI3K blieb, wie erwartet, unter Inkubation mit LY294002 (10 μM) und Wortmannin (50 nM) aus. Interessanterweise war jedoch in den signalkompetenten β1A Integrin Splicevarianten, im Gegensatz zu den β1B Mutanten, die Aktivität von Akt auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren erhalten. Die Gesamtexpression von Akt blieb in beiden Zelllinien unter den getesteten Bedingungen konstant (Abb. 5.6).

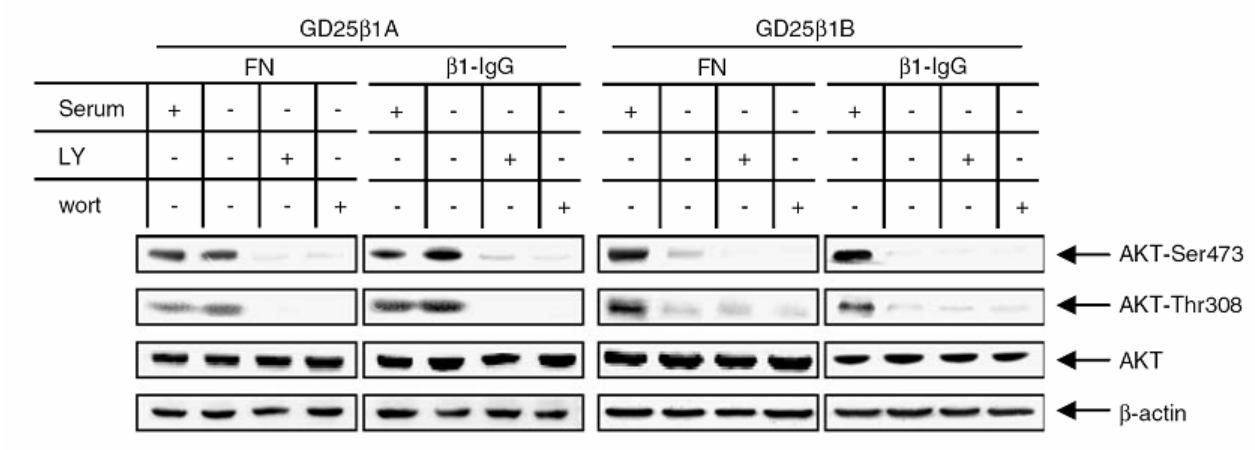

Abbildung 5.6: Akt Aktivität unter PI3Kinase Inhibition in An- und Abwesenheit von Wachstumsfaktoren. Signalkompetente β1A-Integrin Untereinheiten sind in der Lage ihre PKB/Akt Kinase Aktivität in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren zu erhalten (GD25β1A auf Fn und β1-IgG: jeweils in der 2. Spalte zu erkennen). Unter LY294002 (10 μM) und Wortmannin (50 nM) zeigten sich Akt Aktivitäten in GD25β1A und GD25βB Zellen auf Fibronektin (Fn; linke Spalte) und β1-IgG (rechte Spalte) gleichermaßen reduziert. β-actin, dargestellt in der letzten Zeile der Abbildung, wurde als Ladekontrolle verwendet.

5.3.3 Akt Kinase Assay

Zur quantitativen Spezifizierung bestimmten wir Akt Aktivitäten mit Hilfe von Akt Kinase Assays. Hierbei wird Akt aus den Zellen extrahiert und nachfolgend mit monoklonalen Antikörpern immunoprezipitiert. Anschließend wird in vitro ein Kinase Assay durchgeführt, bei dem das Fusionsprotein GSK3 als Substrat dient.

Aufgrund der Tatsache, dass GSK downstream von Akt an Ser21/9 phosphoryliert wird [50], kann die Aktivität dieses Fusionsproteins als Korrelat von Akt Reaktivität via Immunoblot determiniert werden. Die Beobachtungen aus den zuvor beschriebenen Immunoblots fanden sich im Akt Assay bestätigt: GD25β1A Zellen waren, konträr zu GD25β1B, in der Lage die Akt Aktivität unabhängig von Wachstumsfaktoren aufrecht zu erhalten.

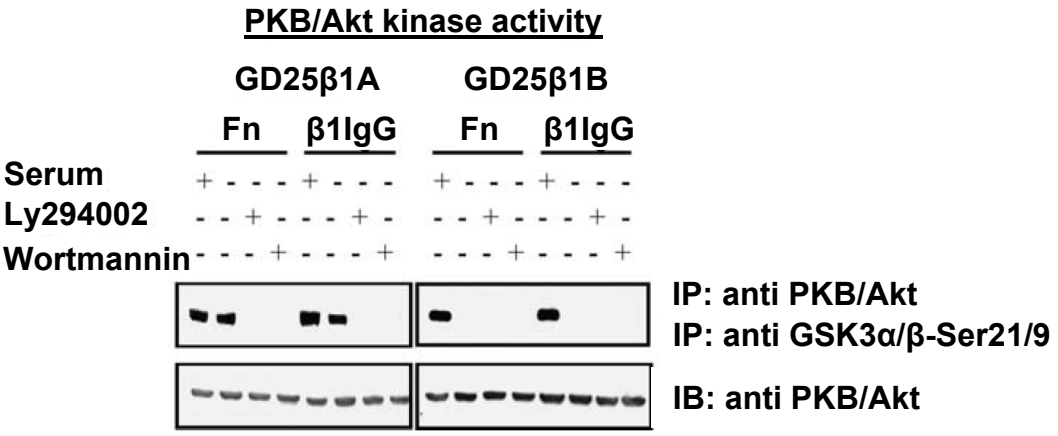

Abbildung 5.7: Signalkompetente β1-Integrin Untereinheiten erhalten die Akt Aktivität Wachstumsfaktor-unanhängig aufrecht. PI3K Inhibition durch LY294002 (10 μM) und Wortmannin (50 nM) reduziert die Akt Aktivität gleichermaßen in GD25β1A und GD25β1B Zellen, die auf Fn (linke Spalte) und β1-IgG (rechte Spalte) kultiviert wurden. Aktivität von Akt wurde in Akt Kinase Assays bestimmt. Hierbei wurde die Phosphorylierung des Fusionsproteins GSK an Ser21/9 durch Akt mit anti-GSK3α/β Ser21/9-Antikörpern nach SDS-PAGE und Immunoblot detektiert. Die Gesamtexpression von Akt/PKB blieb unter den getesteten Bedingungen unverändert (untere Zeile).

5.4 Aktivität der β1 Integrin regulierten Proteine FAK, p130Cas, Paxillin und JNK in An- und Abwesenheit von Wachstumsfaktoren und PI3K-Inhibitoren

Die beobachteten Phänome stützen die Hypothese, dass β1 Integrine neben Akt noch zusätzliche, PI3K unabhängige Signalwege stimulieren, die einen positiven Effekt auf das Zellüberleben nach Bestrahlung haben.

Neben Akt übermitteln β1 Integrine überlebensfördernde Signale über FAK. FAK interagiert eng mit p130Cas und Paxillin, die beide an der Regulation von JNK beteiligt sind [75]. Um den Einfluss dieser Signalkaskaden im Zusammenhang mit dem Überleben nach Bestrahlung zu evaluieren, wurde die Abhängigkeit dieser Proteine von β1 Integrinen, Wachstumsfaktoren und PI3K untersucht.

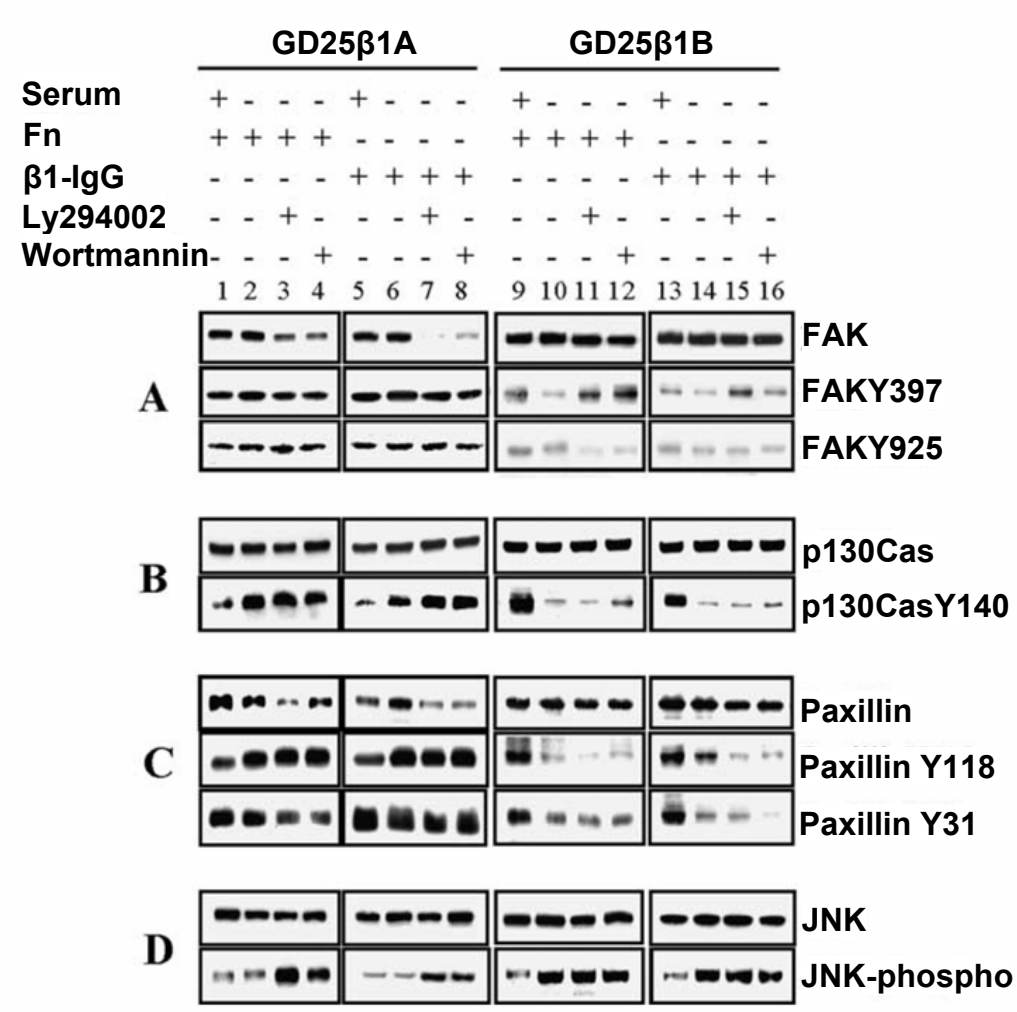

Abbildung 5.8: β1A- und β1B-Integrine regulieren PI3K- und Wachstumsfaktor-abhängig Expression und Phosphorylierung von FAK, p130Cas, Paxillin und JNK. Zellen wurden auf Fibronektin (Fn; Spalte 1-4; 9-12) oder β1-IgG (Spalte 5-8; 13-16) kultiviert. Anschließend erfolgte Serumentzug oder Inkubation mit 10 μM Ly294002 (Spalte 3, 7, 11, 15) bzw. 50 nM Wortmannin (Spalte 4, 8, 12, 16). Zell-Lysate wurden zum Zeitpunkt der Bestrahlung hergestellt, um Basal-Expression und Phosphorylierung dieser Proteine zu untersuchen.

5.4.1 FAK

Abb.5.8 A: Serumdeprivation zeigte in GD25β1A Zellen keinen Effekt, wohingegen in GD25β1B Zellen unter Wachstumsfaktorentzug eine deutliche Reduktion der FAK Phosphorylierung an Tyr397 bei unveränderter Gesamt-FAK und Tyr925 Phosphorylierung zu detektieren war. PI3K Inhibition reduzierte in GD25β1A Zellen die Gesamt-FAK Expression deutlich, gefolgt von einer relativen Induktion an Tyr397 und Tyr975 (Abb.5.8 A, Spalte 3, 4, 7, 8). Dieses Phänomen deutet auf unterschiedliche Mechanismen von

FAK-Expression und Phosphorylierung hin.

In GD25β1B Zellen hingegen war unter PI3K Inhibition eine leichte Induktion der FAK Phosphorylierung an Tyr397 auf Fn und β1-IgG zu beobachten. Tyr925 Phosphorylierung war auf Fn deutlich reduziert, auf β1-IgG hingegen unverändert. (Abb.5.8 A, Spalte 11, 12, 15, 16). Die niedrige basale Phosphorylierung von FAK an Tyr397 und Tyr925 in GD25β1B Zellen auf Fn sowie β1-IgG illustrierte die defizitäre Signaltransduktions der β1B Integrin-Splicevarianten im Vergleich zu β1A (Abb.5.8 A; Spalte 9, 10, 13, 14 im Vergleich zu 1, 2, 5, 6).

Wie **Abb.5.8 B** illustriert, ist Phosphorylierung von p130Cas an Tyr410 von Wachstumsfaktoren und PI3K abhängig (Spalte 1-16). Ohne funktionsfähige zytoplasmatische β1 Integrin Domäne, wie in β1B Splicevarianten, wurden die Phosphorylierungen an Tyr410 gegenläufig zu denen in β1A Zellen reguliert (Spalte 10-12, 14-16 versus 2-4, 6-8). Entzug von Wachstumsfaktoren (Spalte 2, 6) oder gehemmter PI3K (Spalte 3, 4, 7, 8) induzierte in GD25β1A Phosphorylierung von p130Cas an Tyr410. Die Gesamtexpression von p130Cas blieb unter den getesteten Bindungen in beiden Zelllinien unverändert.

5.4.2 Paxillin

Abb.5.8 C: Paxillin zeigte sich in GD25β1B Zellen an Tyr118 und Tyr31 bei konstanter Gesamt-Expression unter Serumentzug und PI3K Blockade sowohl auf Fn als auch auf β1-IgG deutlich dephosphoryliert (Spalte 10-12; 14-16). In GD25β1A Zellen fand sich auf Fn eine Induktion der Paxillin Tyr118 und Tyr31 Phosphorylierung sowohl unter Serumdeprivation als auch unter PI3K Inhibition (Abb. 5.8 C, Spalte 2-4), die auf die reduzierte Gesamt-Paxillin-Expression zurückzuführen ist. Adhäsion an β1-IgG führte zu einer leichten Induktion des Gesamt-Paxillin unter Serumentzug (Spalte 6) sowie einer deutlichen Reduktion unter PI3K Blockade (Spalte 7, 8).

5.4.3 JNK

JNK zeigte sich in **Abb.5.8 D** gegenläufig zu p130Cas und Paxillin reguliert, insbesondere im Vergleich der Phosphorylierungen Serum deprivierter Zellen beider Zelllinien (Spalte 2 und 6 versus 10 und 14). In GD25β1A Zellen waren auf Fn und β1-IgG unter PI3K Blockade diskrete Phosphorylierungen zu detektieren. (Spalte 3, 4, 7, 8). In GD25β1B Zellen war sowohl in Abwesenheit von Serum als auch nach Exposition mit LY294002/Wortmannin eine um den Faktor 20 erhöhte Zunahme JNK Phosphorylierung zu beobachten (Spalte 10, 11, 12, 14, 15, 16).

Die erhobenen Daten implizieren einen engen Zusammenhang zwischen den regulatorischen Interaktionen von JNK, p130Cas und Paxillin, der sich als β1 Integrin und PI3K dependent darstellt. Diese Ergebnisse postulieren, dass weitere Signalwege das β1 Integrin und/oder Wachstumsfaktor-abhängige Überleben als Antwort auf genotoxische Zellschädigung koordinieren.

5.5 JNK Phosphorylierung 30 Min nach Bestrahlung

Im nächsten Schritt korrelierten wir Expression und Phosphorylierung von FAK, als direkt von Integrinen aktiviertes Signalmolekül, mit der von JNK, einer nachgeschalteten Proteinkinase, 30Min nach Bestrahlung.
Während Gesamt-Fak und JNK Expression unverändert blieben, war FAK Tyr925 Phosphorylierung in An- und Abwesenheit von Serum in allen GD25β1A Zellkulturen sowie in GD25β1B auf β1-IgG induziert (Abb. 5.9). JNK Phosphorylierung zeigte sich ebenfalls deutlich gesteigert, insbesondere in GD25β1A in An- und Abwesenheit von Serum, sowie in GD25β1B in Anwesenheit von Serum. Aufgrund der hohen basalen Phosphorylierung der Serum deprivierten GD25β1B-Zellen, ließ sich unter Bestrahlung kein weiterer Anstieg von JNK-Phosphorylierung detektieren.

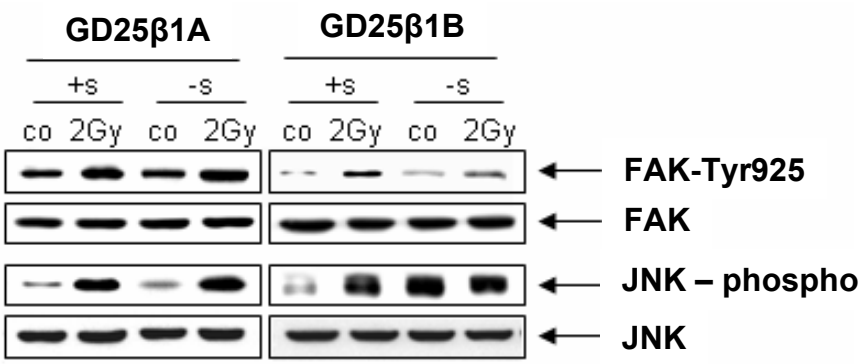

Abbildung 5.9: FAK Tyr925 und JNK Phosphorylierung 30min nach Bestrahlung auf β1-IgG. Sowohl FAK Tyr925 als auch JNK Phosphorylierung nehmen unter Bestrahlung in GD25β1A und GD25β1B bei An-/ oder Abwesenheit von Wachstumsfaktoren deutlich zu. Ausnahme ist die JNK Phosphorylierung in GD25β1B Zellen unter Serumentzug aufgrund der bereits hohen basalen Expression. Gesamt-FAK und JNK Expression wurde als Ladekontrolle verwendet.

5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Unter Entzug von Wachstumsfaktoren zeigen GD25β1A gegenüber GD25β1B Zellen einen deutlichen Überlebensvorteil nach Bestrahlung. Dieser Überlebensvorteil der GD25β1A Zellen unter Serum Deprivation ist allerdings nur zu beobachten, wenn die Zellen auf Matrix-Proteinen wie Fibronektin, Laminin und KollagenIII oder β1-IgG wachsen. Auf Poly-L-Lysin wurde dieses Phänomen nicht beobachtet. Zur Evaluation der zugrundeliegenden Mechanismen dieses β1 Integrin abhängigen Überlebensvorteils wurden weitere Koloniebildungsassays unter Blockade der PI3K, einer Proteinkinase in der Schnittstelle von Wachstumsfaktor- und Integrin aktivierten Signalwegen, durchgeführt. In diesem Versuchsansatz zeigten GD25β1A zwar eine deutliche Reduktion des Überlebens im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, verglichen mit der Signaltransduktions-inkompetenten GD25β1B Splice-Variante jedoch einen signifikanten Überlebensvorteil. Mit der daraus folgenden Hypothese, dass Integrine neben PI3K noch weitere das Überleben fördernde Signalwege regulieren, untersuchten wir die Phosphorylierung von Akt, von der bereits bekannt war, dass sie über PI3K von β1 Integrinen aktiviert wird [150]. Unter PI3K Inhibition war Akt Phosphorylierung in beiden Zelllinien wie erwartet aufgehoben, interessanterweise waren β1 Integrine jedoch in der Lage, Akt Phosphorylierung auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren aufrechtzuerhalten. Dieses Ergebnis illustrierte zum einen die bereits bekannte Abhängigkeit der Akt Phosphorylierung von PI3K, zum anderen die Hypothese, dass weitere β1 Integrin abhängige Signalwege das Zellüberleben auf genotoxische Zellschädigung Wachstumsfaktor-abhängig koordinieren. Die Interaktion dieser durch Integrine und Wachstumsfaktoren aktivierten Signalkaskaden wurde mit Hilfe von Immunoblots und Kinase Assays weiter spezifiziert. Der Überlebensvorteil der Serum deprivierten GD25β1A Zellen ließ sich durch direkte Aktivierung PI3K vermittelter Stimulation von Akt Aktivität und von p130Cas und Paxillin erklären. Phosphoryliertes p130Cas und Paxillin wiederum verhinderten die Aktivierung von Zelltod-regulierender JNK.

Kapitel 6

Diskussion

Innovative Krebstherapien erfordern mulitmodale Ansätze durch Auswahl verschiedener Strategien aus einem großen Spektrum therapeutischer Optionen. Zu diesem Spektrum zählen neben Operation, Zytostatika und Bestrahlung Hormon- und Gentherapie, Angiogenese-Inhibition sowie immuntherapeutische Ansätze. Die Suche nach neuen therapeutischen Angriffspunkten führt aufgrund sich entwickelnder technischen Möglichkeiten immer weiter in molekulare Strukturen der Zellen und ihrer Umgebung. Insbesondere in der mikrozellulären Umgebung konnten in den letzten Jahren potente Zielmoleküle wie Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren zur Krebstherapie identifiziert werden [119] und gleichzeitig zelluläre Resistennmechanismen gegen Zytostatika, Bestrahlung oder Immuntherapeutika besser verstanden werden [81].

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit zwei an Zellüberleben und Proliferation beteiligte Rezeptoren aus der mikromolekularen Zellumgebung, Integrin- und Wachstumsfaktorezeptoren, ihre Wechselwirkung sowie ihre Assoziation mit Zelladhäsions-vermittelter Radioresistenz (CAM-RR) untersucht.

In dieser Studie konnte erstmalig gezeigt werden, dass (1) nicht Adhäsion per se, sondern vielmehr die Signalkompetenz der zytoplasmatischen β1 Integrin Domäne für einen Überlebensvorteil nach Bestrahlung verantwortlich ist, (2) dieser Überlebensvorteil sich als unabhängig von der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren darstellt und sich durch (3) β1 Integrin/PI3K vermittelte Stimulation der das Zellüberleben regulierenden PKB/Akt-Signalachse erklären läßt; sowohl PI3K Inhibition als auch Serumentzug führte zu (4) Induktion der Phosphorylierung an Tyr410-p130Cas sowie Tyr118-Paxillin und konnte mit einer (5) Hypophosphorylierung des Zelltod-regulierenden JNK korreliert werden.

RTK Inhibitoren spielen in der Tumorforschung zunehmend eine tragende Rolle [94]; [57]. Ein Beispiel hierfür ist der von Wachstumsfaktoren aktivierte EGF-Rezeptor. Es sind zahl-

reiche zu Überexpression, vermindertem Abbau durch Internalisierung und konstitutiver Kinase-Aktivität führende Mutationen beschrieben, die neben Überleben und Proliferation die Tumor assoziierte Angiogenese und Aktivierung von Matrix-Metallo-Proteasen fördern [123]. Die Entwicklung von RTK Inhibitoren, die gegen die ATP-Bindungsstelle innerhalb der katalytischen Domäne des EGF-Rezeptors gerichtet sind [110]; [60], führte sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Chemotherapeutika in vitro und in vivo zu ermutigenden Ergebnissen [14]; [66]; [99]. Die EGF-Rezeptor-Inhibitoren Gefitinib [22]; [83] und Erlotinib [31] sind bereits fester Bestandteil onkologischer Strategien [13]; [15]. Zahlreiche weitere Substanzen gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor Rezeptor (VEGFR) und platelet-derived Wachstumsfaktor Rezeptor (PDGFR) sowie deren Kombinationspotential mit konventionellen radiotherapeutischen Interventionen befinden sich derzeit in der Entwicklung [71]; [105]; [122]. Abb.6.1 gibt einen Überblick über klinisch eingesetzte Inhibitoren.

Agent	**Targeted disease**
Trastuzumab *(Herceptin®)*, anti-Her-2 antibody	Breast cancer in women
Imatinib *(Glivec®)*, a tyrosine kinase inhibitor aimed at -Bcr-Abl -Kit	 -Chronic CML -Gist (gastrointestinal stromal tumor)
Gefitinib *(Iressa®)*, a tyrosine kinase inhibitor aimed at EGFR	Non small cell lung carcinoma, colon cancer, glioblastoma mulitforme
Erlotinib *(Tarceva®)*, a tyrosin kinase inhibitor aimed at EGFR	Non small cell lung carcinoma, glioblastoma mulitforme
Cetuximab *(Erbitux®)*, antibody aimed at EGFR	Head and neck cancer
Bevacizumab *(Avastin®)*, anti-VEGF antibody	Colon cancer

Abbildung 6.1: RTK Inhibitoren: Übersicht über die wichtigsten klinisch eingesetzten Substanzen und deren Indikation. Aus [54]

Allerdings kommt es bei der klinischen Anwendung immer wieder zu Resistenzentwicklungen, die trotz detailliertem Wissen über Struktur und Aktivierung des EGF-Rezeptors nicht vollständig aufgeklärt sind [100]; [10]; [49]. Die Entdeckung, dass sich Resistenzen gegen Imatinib, einem bei chronisch myeloischer Leukämie eingesetzten RTK Inhibitor [73] durch gleichzeitige Inhibition der Tyrosinkinase Src aufheben lassen [133], illustriert die komplexe Vernetzung von Signaltransduktionsmolekülen, sowie die Notwendigkeit, das Verständnis dieser Interaktionen zu vertiefen. Untersuchungen zu Interaktionen des EGF-Rezeptors postulieren die Auseinandersetzung mit der Funktion von Integrinen, da beide Rezeptorklassen in Fokaladhäsionen kooperieren [125].

Die in dieser Studie erhobenen Daten zeigen, dass β1A Integrine, im Gegensatz zu β1B Integrinen, einen Überlebsvorteil nach Bestrahlung vermitteln, der sich unabhängig von der Anwesenheit löslicher Wachstumsfaktoren zeigt. Demnach bilden β Integrine, Integrin assoziierte Adaptor-und Signalproteine neben Wachstumsfaktorrezeptoren einen weiteren versprechenden Angriffspunkt zur Kontrolle von Tumorprogression.

Identifikation der entscheidenden Funktionen von β1 Integrinen und ihrer zytoplamatischen Domänen im Überleben nach Bestrahlung liefert detaillierte Einblicke in die Grundprinzipien zelladhäsions-vermittelter Radioresistenz (CAM-RR) [40]. Eine Vielzahl von Studien belegt, dass die zelluläre Antwort auf genotoxische Zellschädigung durch Interaktion mit dem molekularen Umfeld moduliert wird [39]; [132]; [149]; [38]. Dabei sind Zellen, die über β1 Integrine an Liganden der ECM adhärieren, in der Lage, zelluläre Funktionen zur Abwendung drohender Schäden in Zytoplasma und Genom zu aktivieren [39]; [132]; [137]. Nach neuesten Erkenntnissen lassen sich auch weitere Komponenten der ECM inhibieren, wie bereits Akalu et al. zeigten [1]. Mit einem synthetischen Laminin Epitop gelang es ihnen in vitro Adhäsion, Migration und Proliferation sowie in vivo Angiogenese, Tumorwachstum und Metastasierung zu inhibieren.

Aus bisherigen Studien geht hervor, dass sowohl Integrine als auch RTKs das Zellüberleben nach Bestrahlung durch Aktivierung verschiedener Signalwege beeinflussen [14]; [106]; [157] und somit in transformierten Zellen Tumorprogression und Metastasierung begünstigen [72]; [136]. Bereits 2004 hypothesierten Giancotti und Guo [70]; [74], dass Integrine mit Rezeptor Tyrosin Kinasen kooperieren, um über FAK und JNK das Überleben regulierende Signalwege, wie z. B. den MAP Kinase Weg zu aktivieren. Interessant ist in diesem Kontext, dass diese zwei Rezeptorklassen beide mit Resistenz gegen Radio-/Chemotherapien assoziiert werden [58].

Integrine sowie von ihnen aktivierte Signalmoleküle sind an einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse beteiligt [34]; [39]; [69]; [89]; [129]; [130]; [157]; [46]; [21]. Sie regulieren das Zellüberleben und beeinflussen Gewebsinvasion und Metastasierung

Agent	Commercial name	Company	Type of agent	Target	Disease	Trial status
mAb						
HU23F2G, 23F2G	LeukArrest	Icos	mAb, chimeric human-mouse (IgG4)	CD11, integrin β2, integrin αLβ2 (LFA-1)	ischaemic stroke	phase III
	Erlizumab	Genentech, Roche	mAb, human-mouse light chain dimer	human CD18, integrin αLβ2 (LFA-1)	ischaemic stroke, acute myocardial infarction	phase II
	Abciximab	Centocor	mAb	integrin αvβ3	Angina pectoris	M
M200	Volociximab	Protein Design Labs	mAb	integrin α5β1	renal cell carcinoma metastases	phase II
M200	Volociximab	Protein Design Labs	mAb	integrin α5β1	melanoma metastases (combination with DTIC)	phase II
MEDI-525		MedImmune Inc.	mAb	integrin αvβ3	refractory advanced solid tumours, Leukemia, Lymphoma, small intestine cancer	phase I
MEDI-522	Vitaxin	MedImmune Inc.	mAb	integrin αvβ3	metastatic malignant melanoma	phase II
MEDI-522	Vitaxin	MedImmune Inc.	mAb	integrin αvβ3	rheumatoid arthritis	phase II
MEDI-522	Vitaxin	MedImmune Inc.	mAb	integrin αvβ3	metastatic androgen-independent prostate cancer, combination therapy	phase II
MEDI-522	Vitaxin	MedImmune Inc.	mAb	integrin αvβ3	plaque psoriasis	phase II
MLN01 (LDP-01)		Millenium Pharmaceuticals	mAb	integrin α2	cardiovascular diseases, thrombosis, stroke	phase I/II
MLN02		Millenium Pharmaceuticals	mAb, humanized	integrin α4β7	Crohn's disease	phase II
MLN02		Millenium Pharmaceuticals	mAb, humanized	integrin α4β7	ulcerative colitis	phase II
Small molecule blocker						
Ro 27-2441		Hoffmann-la Roche		dual integrin antagonist	asthma	phase II
Ro 27-2771		Hoffmann-la Roche		dual integrin antagonist	asthma	phase II
	Thalidomide		small molecule agent	integrin αv and β3 promoter	malignant gliomas	phase II
Peptide						
BIO-1211		Biogen, Merck and Co	peptide	integrin α4β1 (VLA-4)	allergy, asthma	phase II
EMD121974	Cilengitide	EMD Pharmaceuticals, Merck KGaA	peptide	integrin αvβ3 and αvβ5	Kaposi's sarcoma	
EMD121974	Cilengitide	EMD Pharmaceuticals, Merck KGaA	peptide	integrin αvβ3 and αvβ5	renal cell carcinoma, colon cancer	phase I
EMD121974	Cilengitide	EMD Pharmaceuticals, Merck KGaA	peptide	integrin αvβ3 and αvβ5	glioblastoma multiforme	phase II
EMD121974	Cilengitide	EMD Pharmaceuticals, Merck KGaA	peptide	integrin αvβ3 and αvβ5	first recurrence of glioblastoma multiforme	phase II
EMD121974	Cilengitide	EMD Pharmaceuticals, Merck KGaA	peptide	integrin αvβ3 and αvβ5	newly diagnosed glioblastoma multiforme	phase I/II
EMD121974	Cilengitide	EMD Pharmaceuticals, Merck KGaA	peptide	integrin αvβ3 and αvβ5	unresectable stage III or stage IV melanoma	phase II
EMD121974	Cilengitide	EMD Pharmaceuticals, Merck KGaA	peptide	integrin αvβ3 and avβ5	advanced solid tumours or lymphomas	phase I
EMD121974	Cilengitide	EMD Pharmaceuticals, Merck KGaA	peptide	integrin αvβ3 and αvβ5	acute myeloid leukaemia (AML)	phase II
eptifibatide	Integrilin	Millenium Pharmaceuticals	cyclic heptapeptide containing KGD sequence	integrin α2β3	acute coronary syndrome	M
Nonpeptide						
Tirofiban	Aggrastat		synthetic compound, nonpeptide, mimic of RGD	integrin α2β3	Acute coronary syndromes	M
TR-14035, SB683698		Tanabe Seiyaku, GlaxoSmithKline	nonpeptide	integrin α4β1 (VLA-4), integrin α4β7 (LPAM-1)	asthma, inflammatory bowel disease, multiple sclerosis	phase II

Abbildung 6.2: Integrin Zieltherapien: Übersicht über derzeit verfügbare Substanzen, Angriffspunkte, therapeutische Anwendung und Stand der Umsetzung. M= bereits auf dem Markt erschienen. Aus [81]

von Tumorzellen [69]; [111]; [85]; [39]; [48]; [119]. Dieses Phänomen ist mit der Resistenz tranformierter Zellen gegen Anoikis, einem Mechanismus, der in gesunden Zellen bei Verlust der Bindungsfähigkeit an die ECM Apoptose induziert, assoziert [63]; [64]; [118]; [107]. Aktuellen Studien zufolge, leisten Mutationen in der LigandenbindungssSequenz von Integrinen einen Beitrag zu malignen Transformationsprozessen [59]. Diese Mutationen bewirken konformationelle Veränderungen in den extrazellulären Domänen, die zu konstitutiver Aktivierung verschiedener Signalwege [47], wie z.B. des MAPK-Weges führen [92]; [29]. Innovative Therapieansätze auf der Grundlage dieser Erkenntnisse werden bereits progressiv umgesetzt [42]; [81]. In den letzten Jahren lieferten erste Studien über Anti-Integrin Antikörper und Integrin-Inhibitoren erfolgsversprechende Ergebnisse bei guter Verträglichkeit und geringer Toxizität in der klinischen Anwendung. Integrin-Inhibition mag in diesem Zusammenhang eine essentielle Rolle in der Unterbindung von Tumor-Stromazell-Interaktionen [7], Radioprotektion gesunder Zellen [24]; [25] sowie Inhibition tumorinduzierter Angiogenese tragen [145]. Die Tab. 6.2 gibt einen Überblick über bisher verfügbare Substanzen und den derzeitigen Stand klinischer Studien.

Die Weiterentwicklung derartiger Therapieansätze, die insbesondere in Kombination mit Radio- und Chemotherapie zur Optimierung onkologischer Strategien beitragen [17], erfordert eine Vertiefung des Verständnisse der verantwortlichen Mechanismen auf molekularer Ebene.

Untersuchungen zur Expression und Phosphorylierung von Proteinen zum Zeitpunkt der Bestrahlung liefert essentielle Informationen über den physiologischen Status der Zelle und ermöglicht die Identifikation neuer Moleküle, die in maligne Transformationsprozesse involviert sind [20].

Mit fokalen Adhäsionen interagierende Proteine reagieren auf Einflüsse aus ihrem molekularen Umfeld, wie beispielsweise durch Bestrahlung, mit Veränderung des Phosphorylierungsstatus [36]; [37]. Wie bereits beschrieben, ist die Fokale Adhäsionskinase (FAK) ein wichtiges Signalmolekül in Integrin-gesteuerten Signalwegen, über die weitere Signalwege, wie der Phosphoinositol-3-Kinase-Weg (PI3K), der Ras/mitogen-aktivierter Proteinkinase-Weg (MAPK) und der Akt-Weg, reguliert werden [6]; [16]; [39]; [127]. FAK fördert das Zellüberleben über PI3K/Akt [74] und interagiert mit p130Cas, Paxillin und Src [76]; [113]. Tyr397-abhängige Stimulation von FAK und Rekrutierung von Src resultiert in Tyrosin Phosphorylierung weiterer Bindungsstellen von FAK sowie von den FAK-bindenden Proteine p130Cas und Paxillin [126]; [26]; [140]. Die Abbildung 6.3 schematisiert diese Zusammenhänge.

β1A Integrin exprimierende Zellen aktivieren, im Gegensatz zu mutanten β1B Integrin

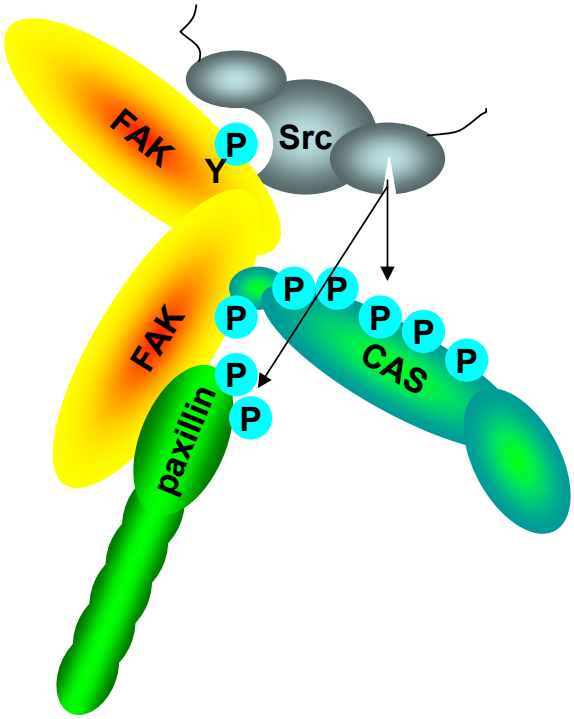

Abbildung 6.3: Modell zur Illustrierung der Funktion von FAK in der Rekrutierung von Src, das darauf folgend FAK gebundenes Paxillin und Cas phosphoryliert. Aus [76]

exprimierenden Zellen, physiologischerweise FAK und Akt, die an der Regulation des Überlebens beteiligt sind [62]; [150]. Insbesondere die Beteiligung von Akt am Zellüberleben nach Bestrahlung wird in zahlreiche Studien verdeutlicht [24]; [52].

FAK Phosphorylierung an Tyr925 sowie an Tyr416 phosphoryliertes Src rekrutieren GBR, welches das Bindeglied zum Proliferations-regulierenden MAPK-Signalweg darstellt [98]; [158]. Darauf folgend stimulieren durch FAK phosphoryliertes p130Cas-Tyr410 und Paxillin-Tyr31 sowie Crk-Tyr118 die Bindung dieser Moleküle zu einer komplexen Formation [113]. Ein kritisches Zielmolekül unterhalb dieses Komplexes ist die c-Jun N2 terminal Kinase (JNK), von der bereits bekannt ist, dass sie an der Stressreaktion nach genotoxischer Schädigung beteiligt ist [52].

Fornaro und Velling [62]; [150] haben gezeigt, dass $\beta 1$ vermittelte Akt Phosphorylierung an Ser473 unabhängig von FAK und Src, allerdings abhängig von PI3K abläuft. Khwaja et al. [96] illustrierten, dass PI3K sowohl über Integrine als auch über Wachstumsfaktorrezeptoren reguliert wird. Zudem zeigt PI3K Inhibition ein signifikant erhöhtes Zellsterben nach genotoxischer Zellschädigung [52] und ist daher ein interessantes Schlüsselmolekül in der Interaktion Wachstumsfaktor- und Integrin aktivierter Signalwege.

Die in dieser Studie erhobenen Daten zeigen, dass β1A Integrine, im Gegensatz zu β1B Integrinen, Signalwege Wachstumsfaktor-unabhängig über Akt aktivieren. Diese Erkenntnisse könnten die deutlich höheren Überlebensraten der Serum-deprivierten GD25β1A im Vergleich zu GD25β1B Zellen erklären. PI3K-Inhibition mit LY294002 und Wortmannin führte in beiden Zelllinien zu einem erhöhten Zellsterben, in β1B Integrin exprimierenden Mutanten jedoch wesentlich stärker ausgeprägt. Aus dieser Beobachtung leiten wir die Hypothese ab, dass GD25β1A Zellen das Überleben über zusätzliche Akt unabhängige Signalwege regulieren können.

Einer dieser zusätzlichen, das Überleben koordinierenden Signalwege scheint die mit FAK eng interagierenden fokalen Adhäsionsproteine p130Cas und Paxillin zu beinhalten , wie bereits in Abb.6.3 erläutert.

Im Gegensatz zur Gesamt-FAK Expression blieb die Phosphorylierung von FAK in β1A exprimierenden Zellen unter Serumentzug und PI3K-Inhibition unbeeinflusst. Wie bereits von Shen und Schaller [134] aufgezeigt, ist die Interaktion von FAK und der mit ihr interagierenden Proteine nicht die auf Lokalisation in Fokaladhäsionen beschränkt [67]. Aktivierung von p130Cas und Paxillin kann direkt und FAK-unabhängig über zytoplasmatische β1 Integrin Domänen ablaufen und mag in diesem Zusammenhang für den Überlebensvorteil der GD25β1A Zellen verantwortlich sein. Die in unserer Studie beobachteten Veränderungen in Expression und Phosphorylierung wurden durch β1 Integrine vermittelt, über Serum sowie PI3K moduliert und wirkten sich auf die das Überleben regulierende JNK aus. Folglich postulieren die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die engen Interaktionen von β1A Integrinen mit p130Cas/Paxillin/JNK in GD25 β1A Zellen einen entscheidenen Beitrag zur Regulation des Überlebens nach Bestrahlung leisten.

Abb. 6.4 illustriert diese Zusammenhänge.

Die entscheidende Rolle von β1 Integrinen im Zellüberleben fand sich in Versuchsreihen mit Tumorzellen bereits bestätigt. Cordes et al. beobachteten in humanen A-172 Gliomzellen einen β1 Integrin-vermittelten Überlebensvorteil nach Bestrahlung, der sich, wie bei den in dieser Arbeit verwendeten Mausfibroblasten, als Wachstumsfaktor- sowie PI3K-unabhängig zeigte. A-172 β1 Integrin Knockdown-Zellen zeigten ähnliche Phosphorylierungsreaktionen von p130Cas und JNK unter Entzug von Wachstumsfaktoren und PI3K Inhibition wie mutierte GD25β1B Zellen [44].

Die im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten verdeutlichen die kritische Rolle von β1 Integrinen im Zellüberleben nach Bestrahlung. β1 Integrin vermittelte Stimulation zahlreicher Signalwege leistet einen entscheidenen Beitrag in zelladhäsionsvermittelter Radioresistenz (CAM-RR). Die Notwendigkeit, die genauen zugrunde liegenden Mechanis-

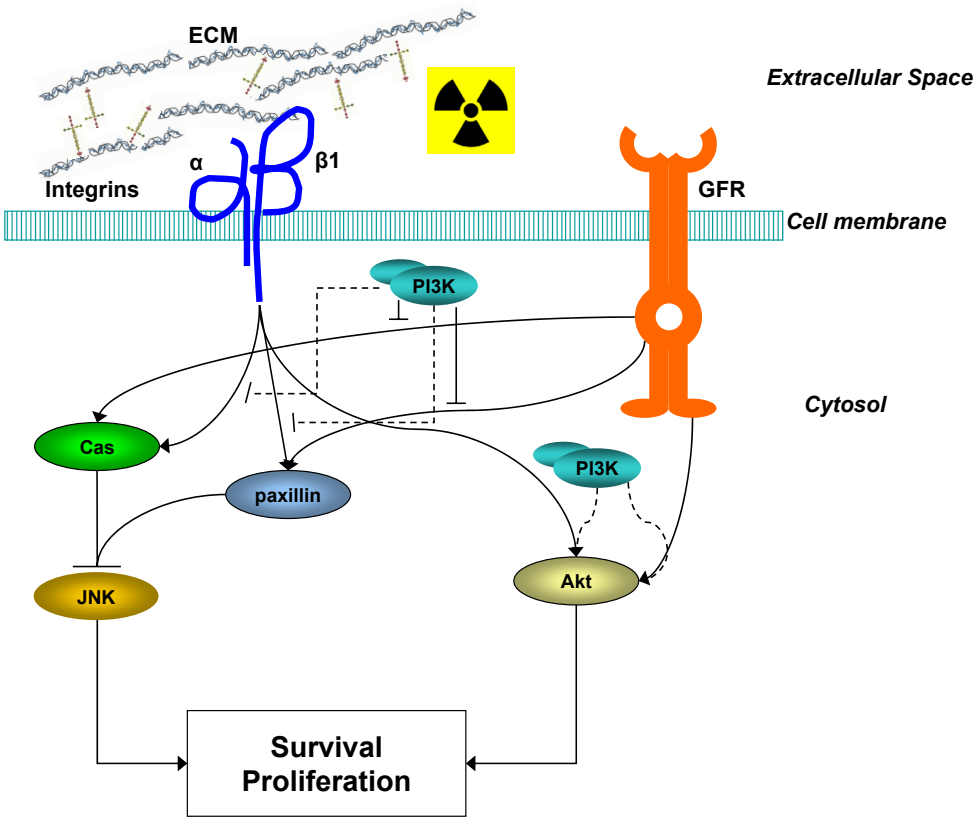

Abbildung 6.4: Modell der Mechanismen, über welche $\beta 1$ Integrine das Zellüberleben nach genotoxischer Zellschädigung regulieren: Ligandenbindung an $\beta 1$ Integrine stimuliert Akt, Cas und Paxillin in einem PI3K-unabhängigen Prozess. PI3K wirkt inhibitorisch auf Integrin- und Wachstumsfaktor-abhängige Aktivierung von Cas und Paxillin sowie aktivierend auf Akt. Die Rolle der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) mag hierbei in der Rekrutierung dieser Moleküle an Zellmembran und Fokaladhäsionen liegen, ist aber bislang eindeutig geklärt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Cas/Paxillin übermittelte Inhibition von JNK sowie direkte, $\beta 1$ Integrin-übermittelte Aktivierung von Akt das Überleben nach genotoxischer Schädigung begündtigen.

men besser zu verstehen, bestätigen aktuelle Studien [131]; [125]; [43]. Gezielte Inhibition Integrin- und Wachstumsfaktor modulierten Signalwege wird klinisch bereits erfolgsversprechend zur Unterstützung von Radio- und Chemotherapien eingesetzt [119]; [81]. Weitere Einblicke in die genauen Zusammenhänge dieser Prozesse könnte einen erheblichen Beitrag zur weiteren Optimierung radio-onkologischer Strategien leisten.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Zelladhäsions-vermittelte Radioresistenz ist ein bekanntes Phänomen mit besonderer Bedeutung in Tumorzellen, da es den Erfolg von Krebstherapien deutlich reduziert. Um die Rolle von Integrinen in diesem Prozess zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Zelllinien, GD25β1A mit funktionsfähiger β1A Integrin Untereinheit und GD25β1B Zellen, eine Signal-inkompetente Splicevariante, nach Bestrahlung miteinander verglichen. Hierbei wurde die Zielsetzung verfolgt, über Aufklärung β1-Integrin-vermittelte Abläufe nach Bestrahlung zur Gestaltung innovativer radioonkologischer Strategien, wie der Optimierung effektiver Zieltherapien (Molecular Targeting), beizutragen.

Auf Fibronektin, KollagenIII, Laminin, Vitronektin, Anti-β1-Integrin IgG oder Poly-L-Lysin kultivierte Zellen wurden in An- und Abwesenheit von Wachstumsfaktoren sowie den Phophatidylinositol-3 kinase (PI3K)-Inhibitoren Ly294002 und Wortmannin mit 0-6 Gy bestrahlt. Zusätzlich zu Koloniebildungsassays wurden Expression und Aktivität von Protein Kinase B/Akt (PKB/Akt), Fokaler Adhäsionskinase (FAK), p130Cas, Paxillin und c-Jun N2-terminal Kinase (JNK) via Immunoblot analysiert.

Unter Entzug von Wachstumsfaktoren zeigten GD25β1A Zellen gegenüber GD25β1B Zellen einen signifikanten Überlebensvorteil auf Proteinen der extrazellulären Matrix oder β1-IgG. PI3K Inhibition führte in GD25β1A Zellen zu einer moderaten, in GD25β1B zu einer ausgeprägten Radiosensibilisierung. Dieser Überlebensvorteil der GD251βA gegenüber GD25β1B Zellen unter Serumentzug und PI3K Inhibition ließ sich durch die PI3K-vermittelte Stimulation von PKB/Akt über β1 Integrine mit Induktion von p130Cas und Paxillin Phosphorylierung erklären. Phosphoryliertes p130Cas und Paxillin wiederum verhinderten die Aktivierung der Zelltod-regulierenden JNK.

$\beta 1$ Integrin-vermittelte Signaltransduktion ist für das Zellüberleben nach Bestrahlung essentiell. Integrin-abhängige Signalwege sind in der Lage, das Fehlen Wachstumsfaktor-vermittelter Signale zu kompensieren und somit einen deutlichen Überlebensvorteil nach Bestrahlung zu vermitteln. Eine Schlüsselrolle in der Interaktion dieser Signalachsen scheint PI3K zu spielen. Weitere Analyse dieser molekularen Mechanismen könnte das Potential von $\beta 1$ Integrinen als therapeutisches Zielmolekül für die Optimierung von Krebstherapien aufzeigen.

Literaturverzeichnis

[1] A. Akalu, J. M. Roth, M. Caunt, D. Policarpio, L. Liebes, and P. C. Brooks. Inhibition of angiogenesis and tumor metastasis by targeting a matrix immobilized cryptic extracellular matrix epitope in laminin. *Cancer Res*, 67:4353–4363, 2007.

[2] B. Alberts, A. Johnson, J. Louis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molekularbiologie der Zelle, Kapitel 19: Zellverbindungen, Zelladhäsion und die Extrazelluläre Matrix, Seite 1238-1240.* WILEY-VHC-Verlag, New York, 2. Auflage, 2000.

[3] B. Alberts, A. Johnson, J. Louis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molekularbiologie der Zelle, Kapitel 19: Zellverbindungen, Zelladhäsion und die Extrazelluläre Matrix, Seite 1248-1251.* WILEY-VHC-Verlag, New York, 2. Auflage, 2000.

[4] B. Alberts, A. Johnson, J. Louis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molekularbiologie der Zelle, Kapitel 19: Zellverbindungen, Zelladhäsion und die Extrazelluläre Matrix, Seite 1249-1260.* WILEY-VHC-Verlag, New York, 2. Auflage, 2000.

[5] B. Alberts, A. Johnson, J. Louis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molekularbiologie der Zelle, Kapitel 20: Die extrazelluläre Matrix von Tieren, Seite 1265-1298.* WILEY-VHC-Verlag, New York, 2. Auflage, 2000.

[6] A. E. Aplin and R. L. Juliano. Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the map kinase pathway. *J Cell Sci*, 112:695–706, 1999.

[7] A. Armulik. Splice variants of human beta 1 integrins: origin biosynthesis and functions. *Front Biosci*, 7:219–227, 2002.

[8] A. Armulik, G. Svineng, K. Wennerberg, R. Fassler, and S. Johansson. Expression of integrin subunit beta1b in integrin beta1-deficient gd25 cells does not interfere with alphavbeta3 functions. *Exp Cell Res*, 254:55–63, 2000.

[9] A. Armulik, T. Velling, and S. Johansson. The integrin beta1 subunit transmembrane domain regulates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent tyrosine phosphorylation of crk-associated substrate. *Mol Biol Cell*, 15:2558–2567, 2004.

[10] J. P. Arnoletti, D. J. Buchsbaum, Z. Q. Huang, A. E. Hawkins, M. B. Khazaeli, M. H. Kraus, and S. M. Vickers. Mechanisms of resistance to erbitux (anti-epidermal growth factor receptor) combination therapy in pancreatic adenocarcinoma cells. *J Gastrointest Surg*, 960:696–670, 2004.

[11] B. Z. B.-Z. Katz, L. Romer, S. Miyamoto, T. Volberg, K. Matsumoto, E. Cukierman, B. Geiger, and K. M. Yamada. Targeting membrane-localized focal adhesion kinase to focal adhesions: roles of tyrosine phosphorylation and src family kinases. *J Biol Chem*, 278:29115–29120, 2003.

[12] M. H. Barcellos-Hoff, C. Park, and E. G. Wright. Radiation and the microenvironment-tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer*, 5:867–857, 2005.

[13] J. Baselga. A review of egfr targeted therapy. *Clin Adv Hematol Oncol.*, 1:218–219, 2003.

[14] M. Baumann and M. Krause. Targeting the epidermal growth factor receptor in radiotherapy: radiobiological mechanisms, preclinical and clinical results. *Radiother Oncol*, 72:257–266, 2004.

[15] M. Baumann, M. Krause, E. Dikomey, K. Dittmann., W. Dorr, U. Kasten-Pisula, and H. P. Rodemann. Egfr-targeted anticancer drugs in radiotherapy: preclinical evaluation of mechanisms. *Radiother Oncol*, 83:238–248, 2007.

[16] C. Beinke, D. Van Beuningen, and N Cordes. Ionizing radiation modules of the expression and tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated proteins focal adhesion kinase (fak) and its substrates p130cas and paxillin in a549 human lung carcinoma cells in vitro. *Int J Radiat Biol*, 79:721–731, 2003.

[17] S. M. Bentzen, P. M. Harari, and J. Bernier. Exploitable mechanisms for combining drugs with radiation: Concepts, achievements and future directions. *Nature Clin Practi Oncol*, 4:172–180, 2007.

[18] E. J. Bernhard, E. J. Stanbridge, and S. Gupta. Direct evidence for the contribution of activated n-ras and k-ras oncogenes to increased intrinsic radiation resistance in human tumor cell lines. *Cancer Res*, 60:6597–6600, 2000.

[19] M. J. Bissell, P. A. Kenny, and D. C. Radisky. Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: the role of extracellular matrix and its degrading enzymes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 70:343–356, 2005.

[20] P. Blume-Jensen and T. Hunter. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411:355–365, 2001.

[21] C. Brakebusch, D. Bouvard, F. Stanchi, T. Sakai, and R. Fassler. Integrins in invasive growth. *J Clin Invest*, 109:999–1006, 2002.

[22] A. H. Braun, K. Stark, O. Dirsch, R. A. Hilger, S. Seeber, and U. Vanhoefer. The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib sensitizes colon cancer cells to irinotecan. *Anticancer Drugs*, 16:1099–1108, 2005.

[23] D. P. Brazil and B. A. Hemmings. Ten years of protein kinase b signalling: a hard akt to follow. *Trends Biochem Sci*, 26:657–664, 2001.

[24] J. Brognard, A. S. Clark, Y. Ni, and P. A. Dennis. Akt/protein kinase b is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res*, 61:3986–3997, 2001.

[25] K. Burridge, K. Fath, T. Kelly, G. Nuckolls, and C. Turner. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*, 4:487–525, 1988.

[26] M. B. Calalb, R. Polte, T, and S. K. Hanks. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for src family kinases. *Mol Cell Biol*, 15:954–963, 1995.

[27] D. A. Calderwood. Integrin activation. *J Cell Sci*, 117:657–666, 2004.

[28] D. A. Calderwood, Y. Fujioka, J. M. de, B. Garcia-Alvarez, T. Nakamoto, B. Margolis, C. J. McGlade, R. C. Liddington, and M. H. Ginsberg. Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:2272–2277, 2003.

[29] L. Chang and M. Karin. Mammalian map kinase signalling cascades. *Nature*, 410:37–40, 2001.

[30] S. Chasserot-Golaz, P. Hubert, D. Thierse, Vlahos C. J., and M. F. Bader. Possible involvement of phosphatidylinositide 3-kinases in regulated exocytosis: Studies in chromaffin cells with inhibitor ly294002. *J Neurochem*, 70:2347–2356, 1998.

[31] P. Chinnaiyan, S. Huang, G. Vallabhaneni, E. Armstrong, S. Varambally, S. A. Tomlins, A. M. Chinnaiyan, and M. P. Harari. Mechanisms of enhanced radiation response following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (tarceva). *Cancer Res*, 65:3328–3335, 2005.

[32] D. Chodniewicz and R. L. Klemke. Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a cas/crk scaffold. *Biochim Biophys Acta*, 1692:63–76, 2004.

[33] N. Cordes. Overexpression of hyperactive integrin-linked kinase leads to increased cellular radiosensitivity. *Cancer Res*, 64:5683–5692, 2004.

[34] N. Cordes. Integrin-mediated cell-matrix interactions for prosurvival and antiapoptotic signaling after genotoxic injury. *Cancer Lett*, 242:11–19, 2006.

[35] N. Cordes and C. Beinke. Fibronectin alters cell survival and intracellular signaling of confluent a549 cultures after irradiation. *Cancer Biol Ther*, 3:47–53, 2004.

[36] N. Cordes, C. Beinke, L. Plasswilm, and D. Van Beuningen. 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*, 180:157–164, 2004.

[37] N. Cordes, M. A. Blaese, V. Meineke, and D. Van Beuningen. Ionizing radiation induces up-regulation of functional beta1-integrin in human lung tumour cell lines in vitro. *Int J Radiat Biol*, 78:347–357, 2002.

[38] N. Cordes, B. Hansmeier, C. Beinke, V. Meineke, and D. Van Beuningen. Irradiation differentially affects substratum-dependent survival, adhesion, and invasion of glioblastoma cell lines. *Br J Cancer*, 89:2122–2132, 2003.

[39] N. Cordes and V. Meineke. Cell adhesion-mediated radioresistance (cam-rr). *Strahlenther Onkol*, 179:337–344, 2003.

[40] N. Cordes and V. Meineke. Cell adhesion-mediated radioresistance (cam-rr). extracellular matrix-dependent improvement of cell survival in human tumor and normal cells in vitro. *Strahlenther Onkol*, 179:337–344, 2003.

[41] N. Cordes and V. Meineke. Integrin signalling and the cellular response to ionizing radiation. *J Mol Histol*, 35:327–337, 2004.

[42] N. Cordes and V. Meineke. Modification of the cellular radiation survival and proliferation response by cell-matrix interactions: implications for integrin targeting in therapeutic approaches for radiation accident patients. *BJR Suppl*, 27:152–156, 2005.

[43] N. Cordes and C. C. Park. Betal integrin as a molecular therapeutic target. *Int J Radiat Biol*, 83:753–760, 2007.

[44] N. Cordes, J. Seidler, R. Durzok, H. Geinitz, and C. Brakebusch. beta1-integrin-mediated signaling essentially contributes to cell survival after radiation-induced genotoxic injury. *Oncogene*, 25:1378–1390, 2006.

[45] M. Cully, H. You, A. J. Levine, and T. W. Mak. Beyond pten mutations: the pi3k pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 6:184–192, 2006.

[46] D. O. D. O.Watermann, B. Gabriel, M. Jager, M. Orlowska-Volk, A. Hasenburg, A. Zur Hausen, G. Gitsch, and E. E. Stickeler. Specific induction of pp125 focal adhesion kinase in human breast cancer. *Br J Cancer*, 93:694–698, 2005.

[47] J. S. Damiano. Integrins as novel drug targets for overcoming innate drug resistance. *Curr Cancer Drug Targets*, 2:37–43, 2002.

[48] J. S. Damiano, A. E. Cress, L. A. Hazlehurst, A. A. Shtil, and W. S. Dalton. Cell adhesion mediated drug resistance (cam-dr): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Nat Rev Cancer*, 93:1658–1667, 1999.

[49] A. De Luca, A. Carotenuto, A. Rachiglio, M. Gallo, M. R. Maiello, D. Aldinucci, A. Pinto, and N. Normanno. The role of the egfr signaling in tumor microenvironment. *J Cell Physiol*, 214:559–67, 2008.

[50] M. Delcommenne, C. Tan, V. Gray, L. Rue, J. Woodgett, and S. Dedhar. 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 USA*, 95:11211–11216, 1998.

[51] P. Dent, D. B. Reardon, and J. S. Park. Radiation-induced release of transforming growth factor alpha activates the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase pathway in carcinoma cells, leading to increased proliferation and protection from radiation-induced cell death. *Mol Biol Cell*, 10:493–506, 1999.

[52] P. Dent, A. Yacoub, P. B. Fisher, M. P. Hagan, and S. Grant. Mapk pathways in radiation responses. *Oncogene*, 22:5885–5896, 2003.

[53] P. Dent, A. Yacoub, P. B. Fisher, M. P. Hagan, and S. Grant. Mapk pathways in radiation responses. *Oncogene*, 22:5885–5896, 2003.

[54] C. Dittrich. *Signaltransduktion in der Onkologie, Kapitel 1: Principles of Signal Transduction in Oncology.* UNI-MED-Verlag AG, Bremen, 1. Auflage, 2006.

[55] M. Dizdaroglu. Measurement of radiation-induced damage in dna at the molecular level. *Int J Radiat Biol*, 61:175–179, 1992.

[56] B. E. Drees, G. B. Mills, C. Rommel, and G. D. Prestwich. Therapeutic potential of phosphoinositide 3-kinase inhibitors. *Expert Opin Ther*, 14:703–725, 2004.

[57] I. Eke, V. Sandfort, A. Mischkus, M. Baumann, and N. Cordes. Antiproliferative effects of egfr tyrosine kinase inhibition and radiation-induced genotoxic injury are attenuated by adhesion to fibronectin. *Radiother Oncol*, 80:178–184, 2006.

[58] D. Estrugo, A. Fischer, Hess F., Scherthan H., Belka C., and Cordes N. Ligand bound beta1 integrins inhibit procaspase-8 for mediating cell adhesion-mediated drug and radiation resistance in human leukemia cells. *PLoS ONE.*, 72:269–285, 2007.

[59] R. D. Evans, V. C. Perkins, A. Henry, P. E. Stephens, M. K. Robinson, and F. M. Watt. A tumor-associated beta 1 integrin mutation that abrogates epithelial differentiation control. *J Cell Biol*, 160:589–596, 2003.

[60] M. A. Fabian, W. H. Biggs, D. K. Treiber, C. E. Atteridge, M. D. Azimioara, M. G. Benedetti, T. A. Carter, P. Ciceri, P. T. Edeen, M. Floyd, J. M. Ford, M. Galvin, J. L. Gerlach, R. M. Grotzfeld, S. Herrgard, M. A. Insko, A. G. Lai, J. M. Lelias, S. A. Mehta, Z. V. Milanov, A. M. Velasco, L. M. Wodicka, H. K. Patel, P. P. Zarrinkar, and D. J. Lockhart. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol*, 23:329–336, 2005.

[61] R. Fassler, M. Pfaff, J. Murphy, A. A. Noegel, S. Johansson, R. Timpl, and R. Albrecht. Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology adhesion and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts. *J Cell Biol*, 128:979–988, 1995.

[62] M. Fornaro, C. A. Steger, A. M. Bennett, J. J. Wu, and L. R. Languino. Differential role of beta(1c) and beta(1a) integrin cytoplasmic variants in modulating focal adhesion kinase protein kinase b/akt and ras/mitogen-activated protein kinase pathways. *Mol Biol Cell*, 11:2235–2249, 2000.

[63] S. M. Frisch and H. Francis. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 124:619–626, 1994.

[64] S. M. Frisch and E. Ruoslahti. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol*, 9:701–706, 1997.

[65] S. M. Frisch and R. A. Screaton. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, 13:555–562, 2001.

[66] M. Fukuoka, S. Yano, G. Giaccone, T. Tamura, K. Nakagawa, J. Y. Douillard, Y. Nishiwaki, J. Vansteenkiste, S. Kudoh, D. Rischin, T. Eek, R. AND Horai, K. Noda, E. Takata, I. AND Smit, S. Averbuch, A. Macleod, A. Feyereislova, and J. Dong, R. P. ANDBaselga. Multi-institutional randomized phase ii trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 21:2237–2246, 2003.

[67] G. G. Liu, C. D. Guibao, and J. Zheng. Structural insight into the mechanisms of targeting and signaling of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol*, 22:2751–2760, 2002.

[68] F. J. Geske and L. E. Gerschenson. The biology of apoptosis. *Hum Pathol*, 32:1029–1038, 2001.

[69] F. G. Giancotti and E. Ruoslahti. Integrin signaling. *Science*, 285:1028–1032, 1999.

[70] F. G. Giancotti and G. Tarone. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19:173–206, 2003.

[71] J. Gille. Antiangiogenic cancer therapies get their act together: Current developments and future prospects of growth factor- and growth factor receptor-targeted approaches. experimental dermatology. *Clin Exp Dermatol*, 15:175–186, 2006.

[72] T. Goldkorn, N. Balaban, M. Shannon, and K. Matsukuma. Egf receptor phosphorylation is affected by ionizing radiation. *Biochim Biophys Acta*, 1358:289–299, 1997.

[73] M. E. Gorre, M. Mohammed, K. Ellwood, N. Hsu, R. Paquette, P. N. Rao, and C. L. Sawyers. Clinical resistance to sti-571 cancer therapy caused by bcr-abl gene mutation or amplification. *Science*, 293:876–80, 2001.

[74] W. Guo and F. G. Giancotti. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5:816–826, 2004.

[75] S. K. Hanks and T. R. Polte. Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays*, 19:137–145, 1997.

[76] S. K. Hanks, L. Ryzhova, N. Y. Shin, and J. Brabek. Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front Biosci*, 8:d982–996, 2003.

[77] J. M. Haugh. Localization of receptor-mediated signal transduction pathways: the inside story. *Mol Interv*, 2:292–307, 2002.

[78] I. Hayashi, K. Vuori, and R. C. Liddington. The focal adhesion targeting (fat) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. *Nat Struct Biol*, 9:101–106, 2002.

[79] L. A. Hazlehurst, R. F. Argilagos, M. Emmons, D. Boulware, C. A. Beam, D. M. Sullivan, and W. S. Dalton. Cell adhesion to fibronectin (cam-dr) influences acquired mitoxantrone resistance in u937 cells. *Cancer Res*, 66:2338–2345, 2006.

[80] S. Hehlgans, I. Eke, and N. Cordes. An essential role of integrin-linked kinase in the cellular radiosensitivity of normal fibroblasts during the process of cell adhesion and spreading. *Int J Radiat Biol*, 10:1–11, 2007.

[81] S. Hehlgans, M. Haase, and N. Cordes. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta*, 1775:163–180, 2007.

[82] S. Hellman and R. R. Weichselbaum. Radiation oncology and the new biology. *Cancer J Sci Am*, 1:174–179, 1995.

[83] R. S. Herbst, M. Fukuoka, and J. Baselga. Gefitinib - a novel targeted approach to treating cancer. *Nat Rev Cancer*, 4:956–965, 2004.

[84] M. K. Hoellerer, M. E. M. Noble, G. Labesse, I. D. Campbell, J. M. Werner, and S. T. Arold. Molecular recognition of paxillin ld motifs by the focal adhesion targeting domain. *Structure*, 11:1207–1217, 2003.

[85] J. D. Hood and D. A. Cheresh. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*, 2:91–100, 2002.

[86] D. A. Hsia, S. K. Mitra, C. R. Hauck, D. N. Streblow, J. A. Nelson, D. Ilic, S. Huang, E. Li, G. R. Nemerow, J. Leng, K. S. R: Spencer, D. A. Cheresh, and D. D. Schlaepfer. Differential regulation of cell motility and invasion by fak. *J Cell Biol*, 160:753–767, 2003.

[87] M. J. Humphries. Integrin structure. *Biochem Soc Trans*, 28:311–339, 2000.

[88] R. O. Hynes. Integrins: bidirectional allosteric signaling machines. *Cell*, 110:673–687, 2002.

[89] R. O. Hynes and A. D. Lander. Contact and adhesive specificities in the associations migrations and targeting of cells and axons. *Cell*, 68:303–322, 1992.

[90] R. O. Hynes and Q. Zhao. The evolution of cell adhesion. *J Cell Biol*, 150:F89–96, 2000.

[91] S. Itoh, T. Maeda, M. Shimada, S. Aishima, K. Shirabe, S. Tanaka, and Y. Maehara. Role of expression of focal adhesion kinase in progression of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10:2812–2812, 2004.

[92] R. L. Juliano. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins cadherins selectins and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42:283–323, 2002.

[93] K. C. K. C. Prutzman, G. Gao, M-L. King, V. V. Iyer, G. A. Mueller, M. D. Schaller, and S. L. Campbell. The focal adhesion targeting domain of focal adhesion kinase contains a hinge region that modulates tyrosine 926 phosphorylation. *Structure*, 12:881–891, 2004.

[94] M. V. Karamouzis and A. Argiris. Update on the role of egfr inhibitors in cancer therapeutics. *Cancer Treat Res*, 135:257–275, 2007.

[95] T. Kasahara, E. Koguchi, M. Funakoshi, E. Aizu-Yokota, and Y. Sonoda. Antiapoptotic action of focal adhesion kinase (fak) against ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal*, 4:491–499, 2002.

[96] A. Khwaja, P. Rodriguez-Viciana, S. Wennstrom, P. H. Warne, and J. Downward. Matrix adhesion and ras transformation both activate a phosphoinositide 3-oh kinase and protein kinase b/akt cellular survival pathway. *Embo J*, 16:2783–2793, 1997.

[97] S. J. Kim, J. W. Park, J. .S. Yoon, J. O. Mok, Y. J. Y. J. Kim, H. K. Park, C. H. Kim, D. W. Byun, Y. J. Lee, S. Y. S. Y. Jin, k. I. Suh, and M. H. Yoo. Increased expression of focal adhesion kinase in thyroid cancer: immunohistochemical study. *J Korean Med Sci*, 19:710–715, 2004.

[98] W. G. King, M. D. Mattaliano, T. O. Chan, P. N. Tsichlis, and J. S. Brugge. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated akt and raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol Cell Biol*, 17:4406–4418, 1997.

[99] M. G. Kris, R. S. Natale, R. B. AND Herbst, T. J. Lynch, D. Prager, C. P. Belani, J. H. Schiller, K. Kelly, H. Spiridonidis, A. Sandler, K. S. Albain, D. Cella, M. K. Wolf, S. D. Averbuch, J. J. Ochs, and A. C. Kay. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA*, 290:2149–2158, 2003.

[100] K. Liang, K. K. Ang, L. Milas, N. Hunter, and Z. Fan. The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 57:246–254, 2003.

[101] R. C. Liddington and M. H. Ginsberg. Integrin activation takes shape. *J Cell Biol*, 158:833–839, 2002.

[102] J. B. Little. Cellular effects of ionizing radiation. *N Engl J Med*, 278:369–376, 1968.

[103] J. B. Little. Changing views of cellular radiosensitivity. *Radiat Res*, 140:299–311, 1994.

[104] S. Liu, D. A. Calderwood, and M. J. Ginsberg. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci*, 113:3563–3571, 2000.

[105] B. Lu, E. T. Shinohara, Edwards E., Geng L., Tan J., and Hallahan D. E. The use of tyrosine kinase inhibitors in modifying the response of tumor microvasculature to radiotherapy. *Technol Cancer Res Treat*, 4:691–698, 2005.

[106] Z. Lu, G. Jiang, P. Blume-Jensen, and T. Hunter. Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol*, 21:4016–4031, 2001.

[107] S. S. Martin and K. Vuori. Regulation of bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. *Biochim Biophys Acta*, 1692:145–157, 2004.

[108] Q. Meng, X. Chang, F. Jing, and J. Bing-Hua. Role of pi3k and akt specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70s6k1 pathway. *Cell Signal*, 12:2262–2271, 2006.

[109] J. Mulrooney, K. Foley, S. Vineberg, M. Barreuther, and L. Grabel. Phosphorylation of the beta1 integrin cytoplasmic domain: toward an understanding of function and mechanism. *Exp Cell Res*, 258:332–341, 2000.

[110] M. E. M. Noble, J. A. Endicott, and L. N. Johnson. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science*, 303:1800–1805, 2004.

[111] D. Oguey, P. W. George, and C. Ruegg. Disruption of integrin-dependent adhesion and survival of endothelial cells by recombinant adenovirus expressing isolated beta integrin cytoplasmic domains. *Gene Ther*, 7:1292–1303, 2000.

[112] G. M. O'Neill, S. J. Fashena, and E. A. Golemis. Integrin signalling: a new cas(t) of characters enters the stage. *Trends Cell Biol*, 10:111–119, 2000.

[113] J. T. Parsons. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*, 116:1409–1416, 2003.

[114] M. Pfaff, S. Liu, D. J. Erle, and M. H. Ginsberg. Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J Biol Chem*, 273:6104–6109, 1998.

[115] T. W. Poh and S. Pervaiz. Ly294002 and ly303511 sensitize tumor cells to drug-induced apoptosis via intracellular hydrogen preoxide production independent of the phosphoinositide 3-kinases-akt pathway. *Cancer Res*, 65:6264–6274, 2005.

[116] T. T. Puck and P. I. Marcus. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med*, 103:653–666, 1956.

[117] I. F. Raynaud, S. Eccles, and A. C. Clarke. Pharmacologic characterization of a potent inhibitor of class 1 phosphatidylinositide 3-kinases. *Cancer Res*, 67:5840–5850, 2007.

[118] H. R. Reiske, S. C. Kao, L. A. Cary, J. L. Guan, J. F. Lai, and H. C. Chen. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Biol Chem*, 274:12361–12366, 1999.

[119] M. Richter and H. Zhang. Receptor-targeted cancer therapy. *DNA Cell Biol*, 24:271–282, 2005.

[120] P. A. Riley. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*, 65:27–33, 1994.

[121] S. Roche, M. M. Koegl, and S. A. Courtneidge. The phosphatidylinositol 3-kinase alpha is required for dna synthesis induced by some, but not all, growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:9185–9189, 1994.

[122] H. P. Rodemann, K. Dittmann, and M. Toulany. Radiation-induced egfr-signaling and control of dna-damage repair. *Int J Radiat Biol*, 83:781–791, 2007.

[123] R. Roskoski. The erbb/her receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 319:1–11, 2004.

[124] J. E. Rundhaug. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 9:267–285, 2005.

[125] V. Sandfort, U. Koch, and N. Cordes. Cell adhesion-mediated radioresistance revisited. *Int J Radiat Biol*, 10:1–6, 2007.

[126] M. D. Schaller. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene*, 20:6459–6472, 2001.

[127] D. D. Schlaepfer, M. A. Broome, and T. Hunter. Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-src complex: involvement of the grb2 p130cas and nck adaptor proteins. *Mol Cell Biol*, 17:1702–1713, 1997.

[128] I. Schvartz, D. Seger, and S. Shaltiel. Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol*, 31:539–544, 1999.

[129] M. A. Schwartz. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol*, 11:466–470, 2001.

[130] M. A. Schwartz and M. H. Ginsberg. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol*, 4:E65–68, 2002.

[131] J. Seidler, R. Durzok, C. Brakebusch, and N. Cordes. Interactions of the integrin subunit beta1a with protein kinase b/akt, p130cas and paxillin contribute to regulation of radiation survival. *Radiother Oncol*, 76:129–134, 2005.

[132] T. Sethi, R. C. Rintoul, S. M. Moore, A. C. MacKinnon, D. Salter, C. Choo, E. R. Chilvers, I. Dransfield, S. C. Donnelly, R. Strieter, and C. Haslett. 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*, 5:662–668, 1999.

[133] N. P. Shah, C. Tran, F. Y. Lee, P. Chen, D. Norris, and C. L. Sawyers. Overriding imatinib resistance with a novel abl kinase inhibitor. *Science*, 305:399–401, 2004.

[134] Y. Shen and M. D. Schaller. Focal adhesion targeting: the critical determinant of fak regulation and substrate phosphorylation. *Mol Biol Cell*, 10:2507–2518, 1999.

[135] M. Shimaoka, J. Takagi, and T. A. Springer. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 31:485–516, 2002.

[136] D. J. Sieg, C. R. Hauck, D. Ilic, C. K. Klingbeil, E. Schaefer, C. H. C. H. Damski, and D. D. Schlaepfer. Fak integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol*, 2:249–256, 2000.

[137] E. L. Simon, H. L. Goel, N. Teider, T. Wang, L. R. Languino, and T. J. Fitzgerald. High dose fractionated ionizing radiation inhibits prostate cancer cell adhesion and beta(1) integrin expression. *Prostate*, 64:83–91, 2005.

[138] M. D. Sklar. The ras oncogene increases the intrinsic resistance of nih 3t3 cells to ionizing radiation. *Science*, 239:645–647, 1988.

[139] M. A. Stevenson, S. Pollock, and C. N. Coleman. X-irradiation, phorbolesters, and h2o2 stimulate mitogen-activated protein kinase activity in hih-3t3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res*, 54:12–15, 1994.

[140] K. Tachibana, T. Sato, N. D'Avirro, and K. Morimoto. Direct association of pp125fak with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125fak. *J Exp Med*, 182:1089–1099, 1995.

[141] S. Tadokoro, S. J. Shattil, K. Eto, V. Tai, R. C. Liddington, J. M. de, M. H. Ginsberg, and D. A. Calderwood. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science*, 302:103–106, 2003.

[142] J. Takagi, B. M. Petre, T. Walz, and T. A. Springer. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, 110:599–511, 2002.

[143] Y. Tamagiku, Y. Sonoda, M. Kunisawa, D. Ichikawa, Y. Murakami, E. Aizu-Yokota, and T. Kasahara. Down-regulation of procaspase-8 expression by focal adhesion kinase protects hl-60 cells from trail-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 15:445–452, 2004.

[144] S. M. Thomas and J. S. Brugge. Cellular functions regulated by src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13:513–609, 1997.

[145] G. C. Tucker. Alpha v integrin inhibitors and cancer therapy. *Curr Opin Investig Drugs*, 4:722–731, 2003.

[146] C. E. Turner. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol*, 2:231–236, 2000.

[147] J. H. Uhm, N. P. Dooley, A. P. Kyritsis, J. S. Rao, and C. L. Gladson. Vitronectin, a glioma-derived extracellular matrix protein, protects tumor cells from apoptotic death. *Clin Cancer Res*, 5:1587–1594, 1999.

[148] M. Ui, T. Okada, K. Hazeki, and O. Hazeki. Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein phosphoinositide 3-kinase. *Trends Biochem Sci*, 20:303–307, 1995.

[149] P. Vaupel. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol*, 14:198–206, 2004.

[150] T. Velling, S. Nilsson, A. Stefansson, and S. Johansson. beta1-integrins induce phosphorylation of akt on serine 473 independently of focal adhesion kinase and src family kinases. *EMBO Rep*, 5:901–905, 2004.

[151] C. J. Vlahos, W. F. Matter, K. Y. Hui, and R. F. Brown. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4h-1-benzopyran-4-one (ly294002). *J Biol Chem*, 269:5241–5248, 1994.

[152] K. Vuori, H. Hirai, S. Aizawa, and E. Ruoslahti. Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for src family kinases. *Mol Cell Biol*, 16:2606–2613, 1996.

[153] P. Workman. Inhibiting the phosphoinositide 3-kinase pathway for cancer treatment. *Biochem Soc Trans*, 32:393–396, 2004.

[154] M. A. Wozniak, K. Modzelewska, L. Kwong, and P. J. Keely. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta*, 1692:103–119, 2004.

[155] M. P. Wymann, G. Bulgarelli-Leva, M. J. Zvelebil, L. Pirola, B. Vanhaesebroeck, M. D. Waterfield, and G. Panayotou. Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of lys-802 a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol*, 16:1722–1733, 1996.

[156] J. P. Xiong, T. Stehle, S. L. Goodman, and M. A. Arnaout. New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood*, 102:1155–1159, 2003.

[157] K. M. Yamada and S. Even-Ram. Integrin regulation of growth factor receptors. *Nat Cell Biol*, 4:E75–76, 2002.

[158] T. J. Yeatman. A renaissance for src. *Nat Rev Cancer*, 4:470–480, 2004.

[159] J. Yu, Y. Zhang, J. McIlroy, T. Rordorf-Nikolic, G. A. Orr, and J. M. Backer. Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3′-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol*, 18:1379–1387, 1998.

[160] A. Zewail, M. W. Xie, Y . Xing, P . F . Zhang, W. Zou, J. P. Saxe, and J. Huang. Novel functions of the phosphatidylinositol metabolic pathway discovered by a chemical genomics screen with wortmannin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:3345–3350, 2003.

Abkürzungsverzeichnis

Thr	Threonin
Ser	Serin
HPR	engl. horseradish peroxidase
HER2	engl. human epidermal growth receptor
DNS	Desoxyribonukleinsäure
LIM	engl. lymphoid cancer-binding factor
LD-Motiv	Aminosäure-Sequenz Leucin(L)-Aspartat(D)
MBq	Megabecquerel
NEA	Nicht-essentielle Aminosäuren
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PBS	engl. Phosphate buffered saline
SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz
PFA	Paraformaldehyd
Gy	Gray
Grb	engl. growth factor receptor-bound protein
AP-1	Aktivierungsprotein-1
UV	Ultraviolett
EDTA	Ethylendiamin-tetra-Essigsäure
FAT	engl. focal adhesion targeting
ANOVA	engl. analysis of variance
APS	Ammonium Persulfat
BCA	Bicinchoninsäure Assay
DMEM	engl. Dulbecco's modified Eagle medium
RNS	Ribonukleinsäure
rmp	engl. rounds per minute
Tyr	Tyrosin
Ras	engl. rat sarcoma
Raf	engl. rapidly growing fibrosarkoma

EZR	Extrazelluärer Raum
ECM	Extrazelluläre Matrix
AS	Aminosäure
RTK	Rezeptor Thyrosin Kinase
MLCK	engl. myosin light-chain kinase
GF	engl. growth factor
CAMs	engl. cell adhesion molecules
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie zur Bindung von Phospholipiden
SH2	Src Homologie 2
SH3	Src Homolgie 3
EGF	engl. epidermal growth factor
PDGF	engl. platelet-derived growth factor
TGF	engl. transforming growth factor
PTB	Phosphotyrosin-Bindungsdomänen
FAK	Fokale Adhäsionskinase
ATP	Adenosintriphosphat
PKB	Proteinkinase B (Akt)
PLC	Phospholipase C
MAPK	Mitogenaktivierte Protein Kinase
SAPK	Stressaktivierte Protein Kinase
ILK	engl. Integrin-linked Kinase
SEK1	Stressaktivierte extrazelluläre Kinase
p130Cas	Crk assoziertes Substrat
Crk	engl. CT10 Regulator of kinase
Src	engl. src homology domain containing phosphatase-2
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3
JNK	C-Jun NH2-terminale Kinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PIP_2	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
PIP_3	Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat
PDK1	engl. Phosphatidyl-Inositol-dependent kinase
MMP	Matrix-Metalloprotease
GAG	Glycosaminglykan
RGD	Aminosäurensequenz Arginin-Glycin-Aspartat
MIDAS	engl. metal-ion-dependent-adhesion-site
NPxY Motiv	Aminosäure-Sequenz: N=Asparagin, P=Prolin, x=für jede beliebige AS und Y= Tyrosin

FERM Domäne	4.1-Protein (Four-point-one), Ezrin, Radixin, Moesin
FAT-Domäne	engl. fokal-adhesion-targeting-Domain
AP-1	Trankriptionsfaktorverstärker AP- 1
WB	Western Blot
MiPu	Milchpulver
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat; Negativkontrolle
IF	Immunofloreszenz
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM-RR	engl. cell adhesion mediated radioresistance
SD	Standardabweichung
Fn	Fibronectin
CollIII	Kollagen-III
Ln	Laminin
Vn	Vitronectin
β 1-IgG	Anti-β 1 Integrin IgG
Pll	Poly-L-Lysin

Abbildungsverzeichnis

2.1 Struktur eines Kollagen Moleküls 7

2.2 Struktur eines Fibronektin Dimers 8

2.3 Struktur eines Lamininmoleküles 10

2.4 Integrin Rezeptor im Bändermodell 11

2.5 Die Integrin Rezeptor Familie 12

2.6 Übersicht über Ligandenbindungs-Spezifitäten verschiedener Integrinunter-einheiten 14

2.7 Paxillin 15

2.8 Zusammensetzung der verschiedenen FAK-Domänen 16

2.9 Integrinabhängige Signalisierungswege 18

2.10 Aminosäuresequenzen der β1 Untereinheiten A und B 19

2.11 Integrin assozierte Signalwege nach genotoxischer Zellschädigung 20

2.12 Struktur des PI3Kinase Inhibitors Ly294004 22

2.13 Strukturformel von Wortmannin 22

4.1 Zeitliche Abfolge der Einzelschritte in Koloniebildungstests 37

5.1 Dosis Effektkurven auf Poly-L-Lysin 44

5.2 Dosis Effektkurven auf verschiedenen Substraten der ECM 45

5.3 Klonogenes Zellüberleben unter Inhibitoren/DMSO-Kontrolle 47

5.4 PI3K Inhibition auf Fibronektin und β1-IgG 48

5.5 Akt Aktivität nach Bestrahlung 49

5.6 Akt Aktivität unter PI3K Inhibition in An- und Abwesenheit von Wachstumsfaktoren 50
5.7 Akt Kinase Assay 51
5.8 Aktivität $\beta 1$ Integrin regulierter Proteine unter Variation verschiedener Bedingungen 52
5.9 FAK und JNK Phosphorylierung 30 Min nach Bestrahlung 54

6.1 Klinische angewandte RTK-Inhibitoren 57
6.2 Abgeschlossene und gegenwärtig laufende klinische Studien zu Integrin-Zieltherapien 59
6.3 Modell zur Rekrutierung von Src über Fak, Paxillin und Cas 61
6.4 Modell zur Regulation des Überlebens nach genotoxischer Zellschädigung über $\beta 1$ Integrine 63

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv. Doz. Dr. med. N. Cordes für die Überlassung des interessanten Themas und selbstverständlich für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Mit Engagement, Zuverlässigkeit und Menschenkenntnis hat er uns als Arbeitsgruppenleiter immer wieder an die Hand genommen, um die erforderliche Motivation und Strukturierung zu garantieren.

Herrn Prof. Dr. med. M. Molls danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit vor der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zu vertreten.

Die vorliegende Dissertation entstand im Forschungslabor des Institutes für Radiobiologie der Bundeswehr in München. Herrn Priv. Doz. Dr. med. Meinecke, Leiter des Institutes, danke ich für die Bereitstellung der Mittel sowie die Möglichkeit, die Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Für die geduldige Einführung in die Laborbarbeit, empathische Unterstützung und ausgezeichnete Zusammenarbeit danke ich Bärbel Reincke, Monika Kraus, den Mitarbeiten des Institutes für Radiobiologie, auch wenn sie hier nicht namentlich genannt sind, sowie meinen Mitdoktoranden Rita, Silke, Veit und Iris.

Bei Jan, Yuhao, Geoff und Andi bedanke ich mich für ihre endlose Geduld und konstruktive Begleitung, ohne die ich sicher das eine oder andere Mal verzweifelt wäre.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widme. Ihre bedingungslose Unterstützung, ihr liebevolles Verständnis und Vertrauen bildeten die Grundlage für das Gelingen der vorliegenden Arbeit und sind gleichzeitig meine Führung auf diesem langen und herausfordernden Weg der Ausbildung.

Lebenslauf

Adresse: Röschbachstraße 2, 69198 Heidelberg-Schriesheim
Geburtsort: Hamburg
Geburtsdatum: 3. Januar, 1980

Ausbildung:
1986 - 1990 Grundschule Glashütte, Norderstedt
1990 - 1999 Lise-Meitner-Gymnasium, Norderstedt, Abitur im Juli 1999
2000 - 2002 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg (Vorklinik)
2002 - 2007 Technische Universität München (Klinik); Masterstudiengang der Traditionell chinesischen Medizin an der Heidelberg School of Chinese Medicine
ab November 2007 Assistenzärztin Klinik für psychosomatische und allgemeine klinische Medizin der Universität Heidelberg

Praktisches Jahr:
Innere Medizin: Jikei University School of Medicine, Tokio, Japan
Pädiatrie: Klinikum dritter Orden, Passau
Chirugie: Fudan University, Shanghai, China

Examina:
März 2002: Physikum
August 2003: Erstes Staatsexamen
August 2005: Zweites Staatsexamen
Oktober 2006: Drittes Staatsexamen