

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

**Die Rolle von Zell-Matrix Interaktionen für die strahleninduzierte
Apoptose von humanen promyelozytischen HL60-Zellen**

Franziska C. Heß

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. J. G. Duyster
3. Univ.- Prof. Dr. M. Molls

Die Dissertation wurde am 27.09.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.03.2007 angenommen.

meinen Eltern gewidmet

„Das Bessere ist der Feind des Guten.“

(Voltaire, Dramatique, Dictionnaire philosophique portatif)

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

II. PROBLEMSTELLUNG

III. GRUNDLAGEN

3.1. Integrine

3.1.1. Struktur der Integrine und ihre Liganden

3.1.2. Aktivierung der Integrine

3.1.3. Integrin vermittelte Signaltransduktion

3.1.4. Integrine und Apoptose

3.1.5. Integrin vermittelte Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung –
cell adhesion-mediated radioresistance

3.1.6. Integrin vermittelte Adhäsion bei der Hämatopoese

3.1.7. Pathophysiologische Bedeutung der Integrine für Tumorgenese und
Tumoresistenz - klinischer Ausblick

3.2. Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen

3.3. Die extrazelluläre Matrix – Aufbau, Funktion und Bedeutung

3.4. Apoptose

3.4.1. Mechanismen des programmierten Zelltodes

3.4.2. Caspasen – zentrale Proteasen für Induktion und Ausführung des
apoptotischen Prozesses

3.4.3. Regulation der Apoptose

3.4.3.1. Rezeptor vermittelte Apoptoseinduktion (extrinsischer
Signalweg)

3.4.3.2. Mitochondriale Apoptoseinduktion (intrinsischer
Signalweg)

3.4.3.3. Gemeinsame Endstrecke des extrinsischen und
intrinsischen Apoptosesignalweges - Exekution des
apoptotischen Zelltodes

3.4.4. Klinischer Ausblick – proapoptotische therapeutische Substanzen in
der Tumorthherapie

IV. MATERIAL

- 4.1. Zelllinie
- 4.2. Medium
- 4.3. Reagenzien
 - 4.3.1. Reagenzien für den Western Blot
 - 4.3.2. Reagenzien für DAPI- und Immunfluoreszenzfärbungen
 - 4.3.3. Reagenzien für Durchflusszytometrie
- 4.4. Verwendetes Matrixprotein und Kontrollsubstrate
- 4.5. Verwendete Antikörper
- 4.6. Geräte und Hilfsmittel

V. EXPERIMENTELLE METHODEN

- 5.1. Zellkultur
- 5.2. Bestimmung der Zellzahl
- 5.3. Auftauen und Einfrieren von Zellen
- 5.4. Vorbereitung der Zellen für Experimente
 - 5.4.1. Wachstum der Zellen in mit Fibronectin- sowie Rinderserumalbumin-beschichteten Zellkulturflaschen
 - 5.4.1.1. Hintergründe für den Einsatz von serumfreien Medien
 - 5.4.2. Wachstum der Zellen in unbeschichteten Zellkulturflaschen als Kontrollgruppe
- 5.5. Bestrahlung der Zellen
- 5.6. Verdünnungsanalyse (*Limiting Dilution Analysis*)
 - 5.6.1. Prinzip der Verdünnungsanalyse
 - 5.6.2. Versuchsdurchführung
 - 5.6.3. Auswertungen
- 5.7. DAPI-Färbungen
 - 5.7.1. Prinzip der DAPI-Färbung
 - 5.7.2. Versuchsdurchführung
 - 5.7.3. Auswertungen
- 5.8. Western Blot
 - 5.8.1. Prinzip des Western Blots
 - 5.8.2. Durchführung des Western Blots

- 5.8.2.1. Extraktion der zellulären Gesamtproteine
- 5.8.2.2. Bestimmung der Gesamtproteinmenge
- 5.8.2.3. SDS-Gelelektrophorese
- 5.8.2.4. Blotten
- 5.8.2.5. Proteinmarkierung
- 5.8.3. Analyse und Auswertung
- 5.9. Durchflusszytometrie
 - 5.9.1. Die Methode der Durchflusszytometrie
 - 5.9.2. Darstellung der Messergebnisse
 - 5.9.3. Versuchsansatz und durchgeführte Messungen
 - 5.9.3.1. Messung der Caspasen-Aktivität
 - 5.9.3.2. Messung des transmembranen Mitochondrienpotentials ($\Delta\psi_m$)
 - 5.9.4. Auswertungen
- 5.10. Immunfluoreszenz
 - 5.10.1. Prinzip der Immunfluoreszenz
 - 5.10.2. Versuchsansatz und durchgeführte Färbungen
 - 5.10.2.1. Immunfärbungen von Bax und Cytochrom c
 - 5.10.2.2. Färbung der Mitochondrien
 - 5.10.3. Auswertung
- 5.11. Statistische Auswertungen und graphische Darstellung

VI. ERGEBNISSE

- 6.1. Strahleninduzierte Apoptose - morphologische Zellkernuntersuchungen mittels DAPI-Färbung
- 6.2. Verdünnungsanalyse (*Limiting Dilution Analysis* - LDA) – Abhängigkeit des Überlebens bestrahlter HL60-Kulturen von Substrat und Zelldichte
 - 6.2.1. Der positive Einfluss von Fibronectin auf das Zellüberleben von HL60-Zellen nach Bestrahlung
 - 6.2.2. Einfluss von Zell-Zell-Interaktionen auf die Überlebensrate von HL60-Zellen nach Strahlenexposition

-
- 6.3. Strahleninduzierte Veränderungen im Expressionsmuster von Schlüsselproteinen der Integrinsignalkaskade – Resultate der Western Blot-Untersuchungen
 - 6.3.1. *Integrin-linked Kinase* (ILK)
 - 6.3.2. Glykogensynthasekinase-3 β (GSK-3 β)
 - 6.3.3. *Focal Adhesion Kinase* (FAK)
 - 6.3.4. Einflüsse von Fibronektin auf die Aktivierung der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade
 - 6.3.4.1. Bcl-2
 - 6.3.4.2. Bax
 - 6.3.4.3. Der Bcl-2/Bax-Quotient – Maßstab für das Zellüberleben
 - 6.3.4.4. Die Rolle der Mitochondrien
 - 6.3.4.4.1. Veränderungen an der äußeren mitochondrialen Membran – Cytochrom c-Expression
 - 6.3.4.4.2. Veränderungen an der inneren Mitochondrienmembran anhand durchflusszytometrische Analysen des transmembranen Mitochondrienpotentials ($\Delta\psi_m$)
 - 6.4. Exekution der Apoptose – Durchflusszytometrische Messungen der Caspasenaktivität
 - 6.5. Untersuchungen zur Zellmorphologie und zur Lokalisation ausgewählter Zellproteine an bestrahlten HL60-Zellen mittels Immunfluoreszenz

VII. DISKUSSION

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

A. ANHANG

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

LITERATURVERZEICHNIS

DANKVERMERK

LEBENS LAUF

I. EINLEITUNG

Akute Leukämien, die ersten Erkrankungen, die mit zytostatischer und/oder Strahlentherapie behandelt wurden, stellen auch heute noch ein schwieriges therapeutisches Problem dar [16; 27].

Akuten Leukämien liegt die maligne Entartung von frühen Vorläuferzellen der normalen Hämatopoese zugrunde [16; 27]. Dabei verlieren leukämische Zellen durch Mutationen die Fähigkeit der Ausreifung zu funktionsfähigen Blutzellen und unterliegen dadurch nicht mehr den normalen Kontrollmechanismen von Zellwachstum und Differenzierung. Es kommt zur Expansion der leukämischen Zellpopulation und zur Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark. Die Folgen sind Verminderungen der Erythrozyten, der Granulozyten sowie der Thrombozyten. Die betroffenen Patienten leiden an einer schweren Anämie, haben ein hohes Risiko, an rasch und gefährlich verlaufenden Infektionen zu erkranken, und neigen verstärkt zu Blutungen [16].

Die bisherige Therapie akuter Leukämien ist darauf ausgerichtet, die leukämischen Zellen zu zerstören und die normale Blutbildung wiederherzustellen. Mit Hilfe intensiver Radiochemotherapiekombinationen gelingt es heute, bei ca. 60 – 80% der Patienten 99 – 99,9% der Leukämiezellpopulationen vorübergehend zu unterdrücken und eine Remission zu erreichen. Die verbleibenden klonogenen leukämischen Zellen lassen sich aber in der Mehrzahl der Fälle trotz intensiver Konsolidierungstherapie nicht vernichten und ermöglichen so einen Rückfall der Erkrankung mit letztendlich tödlichem Ausgang. Nach einem Jahr leben noch über 50% und nach fünf Jahren noch 20 – 40% der betroffenen Patienten. Eine Heilung ist derzeit trotz wesentlicher Verbesserungen der Radiochemotherapien und supportiver Maßnahmen nur sehr begrenzt möglich [16; 27; 109].

Diese oben genannten Überlebensdaten zeigen, dass ein optimales Therapieregime noch nicht gefunden wurde. Somit muss vor allem auch auf molekularer Ebene nach neuen Ansätzen gesucht werden, um weitere Therapieoptionen zu entwickeln bzw. das Versagen der derzeitigen Therapieschemata zu ergründen.

Dank neuer Methoden der Zytogenetik, Molekulargenetik und der funktionellen Zellanalytik konnten in den letzten Jahren viele tiefgreifende und innovative Einblicke in die Regulationen von Zellüberleben, Proliferation, Differenzierung, Zellzyklus und Apoptose gewonnen werden. Eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung dieser für einen mehrzelligen Organismus lebensnotwendiger Prozesse spielen adhäsive Kontakte von Zellen – untereinander und zur umgebenden extrazellulären Matrix (EZM). Vermittelt werden diese adhäsiven Kontakte durch Zelladhäsionsrezeptoren, deren bedeutenste und größte Gruppe die Familie der Integrine darstellt. Integrine sind transmembrane Glykoproteine, die aus einer α - und β -Untereinheit bestehen. Sie sind für die direkten Verbindungen zwischen Zellzytoskeletts und EZM verantwortlich. Darüber hinaus sind Integrine in ein komplexes Netzwerk von Signaltransduktionsprozessen involviert, wodurch sie mannigfaltige Aufgaben übernehmen, die essentiell für Erhalt, Integrität und Funktionalität der verschiedenen Zell- und Gewebetypen sind [45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 78; 117; 118; 119; 120]. Modulationen in diesem Signalnetzwerk führen zu schwerwiegende pathologische Veränderungen wie Karzinogenese oder Entwicklung von Resistenzen gegenüber Radiochemotherapien. Solche Mechanismen, gekoppelt mit Modifikationen der Zelltod-/Apoptosekontrolle werden auch bei den Rezidiven und dem Nichtansprechen auf konventionelle Therapien bei akuten Leukämien vermutet. Daher stellen Integrine und ihre Signalkaskaden auch über 30 Jahre nach ihrer Entdeckung ein äußerst wichtiges Forschungsobjekt dar, um einerseits größeres Verständnis ihrer Signal- und Regulationsmechanismen zu erhalten, und um andererseits die Grundlage für die Entwicklung und Optimierung multimodaler Antitumortherapien zu schaffen.

Bei der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinie HL60 handelt es sich um eine akute promyeloische Leukämie (AML). Der Fokus der experimentellen Untersuchungen lag auf der Modulation strahleninduzierter Apoptose durch Zell-Matrix-Interaktionen.

II. Problemstellung

Nicht nur normale humane Körperzellen profitieren von den Kontakten mit der EZM, sondern auch menschliche Tumorzellen. Diese können durch Interaktionen mit der EZM einen Überlebensvorteil gegenüber der Exposition mit genotoxischen Substanzen, wie z. B. ionisierender Strahlung, erwerben. Das Mitwirken von Integrinen an diesen für die Tumorentstehung und -progression sowie für die Ausbildung von Therapieresistenzen enorm wichtigen Prozessen konnte in einer Großzahl von Untersuchungen und Studien bei adhärent wachsenden Zellen nachgewiesen werden [45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 78; 82; 104; 144; 186; 220; 221].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob auch die in Suspension wachsende Zelllinie HL60 durch Kontakt mit dem EZM-Protein Fibronectin (FN) einen Überlebensvorteil gegenüber Strahlenexposition erlangen kann. In An- und Abwesenheit von FN wurde die Apoptose auf morphologischer sowie auf molekularer Ebene in bestrahlten HL60-Zellen beleuchtet [108].

Im ersten Teil der Arbeit wurden die morphologischen Veränderungen der Zellen bei der Exekution der Apoptose sowie die Apoptosesignalwege untersucht. Im zweiten Teil der Untersuchungen lag das Augenmerk auf wichtigen regulatorischen Schaltstellen, im Besonderen Proteinkinasen, im Verlauf der Integrin-Signaltransduktionsprozesse. Da die beteiligten Signalwege auf einer Vielzahl von Ebenen engmaschig miteinander verknüpft sind, müssen diese Regulationssysteme für das Verständnis der durch Zell-Matrix-Kontakt erworbenen Bestrahlungsresistenz isoliert betrachtet werden.

III. GRUNDLAGEN

3.1. Integrine

Die spezifischen Interaktionen zwischen Zellen und der EZM werden hauptsächlich durch Integrine vermittelt. Diese Interaktionen nehmen teil an der Regulation zellulärer Funktionen wie Zellüberleben, Migration, Differenzierung, Zellform, Zellmorphologie, Zytoskelettorganisation, Zellzyklus, Proliferation, Gentranskription sowie Apoptose [91]. Daneben sind Integrine in eine Vielzahl pathologischer Prozesse wie z. B. Tumorwachstum, rheumatoide Arthritis, Retinopathie, chronische Entzündungen und vieles mehr involviert (weiteres siehe 3.3.2.).

Der Begriff „*Integrin*“ wurde erstmalig von Tamkun et al. verwendet [203], um eine Familie strukturell, immunochemisch und funktionell ähnlicher Oberflächenrezeptoren zu beschreiben, die als integrale Membranproteine bei der Wechselwirkung der EZM mit dem intrazellulären Zytoskelett beteiligt sind [203]. Sie „integrieren“, lokalisiert in fokalen Adhäsionskomplexen (FA) durch die Zellmembran hindurch das Zytoskelett der Zelle an das Gerüst der EZM [117]. Über mechanische Funktionen hinaus vermitteln Integrine Signale, sowohl von außen nach innen (*outside-in signaling*) als auch von innen nach außen (*inside-out signaling*; siehe auch 3.2.1.) [91; 117; 118; 176]. Unter *outside-in signaling* fallen die Organisation des Zytoskeletts sowie die Aktivierung von Signalkaskaden. Unter *inside-out signaling* versteht man die Modulation der Rezeptoraffinität und damit der Adhäsion und Migration [91; 117; 118; 176].

Auf einer Zelle gibt es typischerweise ca. 100.000 Integrine. Sie befinden sich in der Zellwand bevorzugt in cholesterin- und glykosphingolipidreichen Bereichen, den so genannten *rafts* [226].

3.1.1. Struktur der Integrine und ihre Liganden

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glykoproteine, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen [117; 118]. Es sind 18 α -Untereinheiten (120 – 180 kDa) und 8 β -Untereinheiten (90 – 110 kDa) bekannt, die untereinander kombiniert 24 verschiedene Integrine bilden, welche sich hinsichtlich ihrer physiologischen Struktur und ihrer Liganden unterscheiden (Abb. 1) [91; 117;

175].

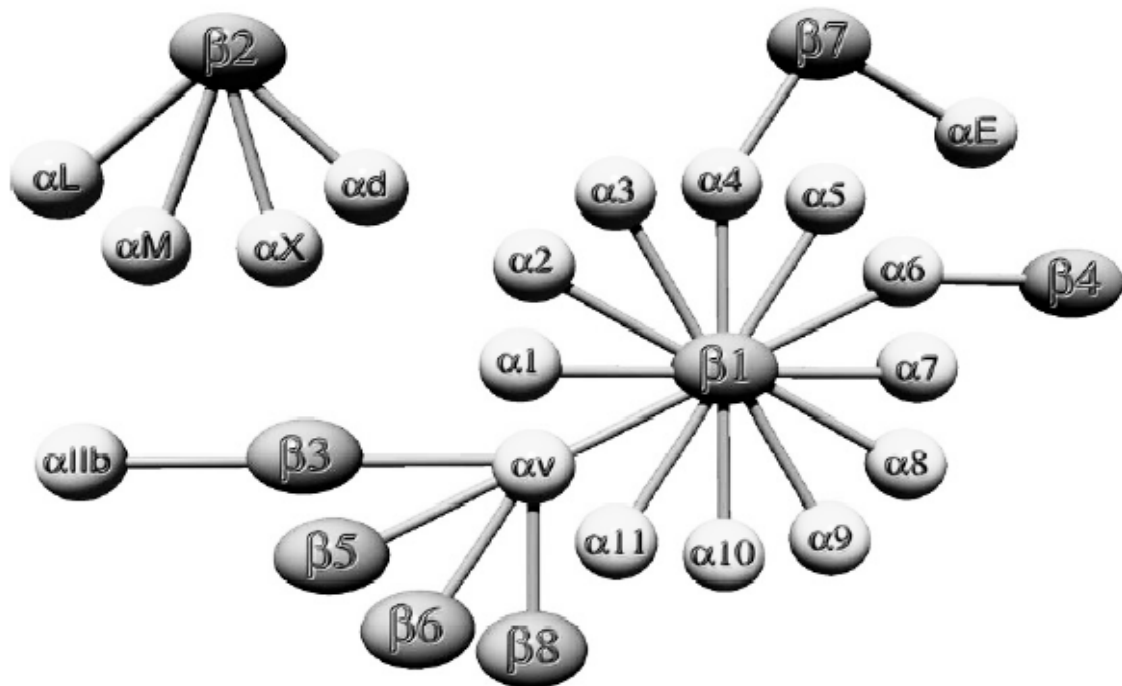


Abb. 1: Die Integrinfamilie der Zelladhäsionsmoleküle

Die 24 bisher bekannten Integrine, die sich aus Kombinationen der verschiedenen α - und β -Untereinheiten zusammensetzen. Man kann verschiedene Integrin-Subfamilien unterscheiden, z. B. die β 1- oder die β 2-Integrine (nach Hynes (2002) [118]).

Die größten Integrinfamilien sind die beiden β -Untereinheiten β 1 (12 Integrine) und β 2 (4 Integrine) sowie die α v-Familie mit 5 Integrinen. Beide Untereinheiten sind Glykoproteine mit einer extrazellulären Domäne, die den größten Teil darstellt. Sie besteht aus einer Kopf-Region, aus der eine gestreckte Stelzen-Region hervorgeht. Über eine sich jeweils anschließende kurze Transmembranhelix (20 – 30 Aminosäuren (AS)) und eine kleine zytoplasmatische Domäne ohne Enzymaktivität (ca. 20 – 50 AS) ist das Integrin mit Proteinen des Zytoskeletts verknüpft [116; 117]. Dabei ist die zytoplasmatische Domäne essentiell für die korrekte Ausbildung der

Heterodimeren-Struktur. Jede Untereinheit durchspannt die Membran nur einmal (Abb. 2).

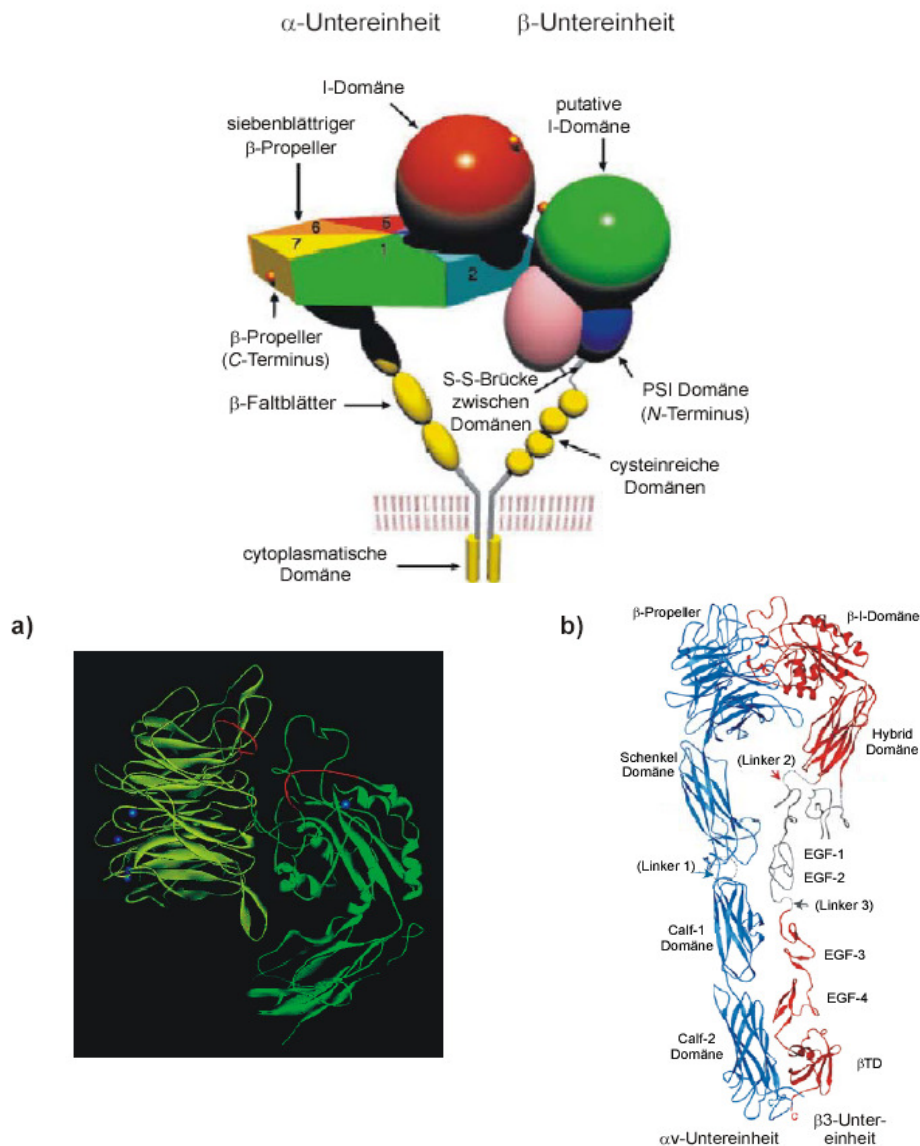


Abb. 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der Integrine

Die Kopfgruppe der α -Untereinheit besteht aus einem siebenblättrigen β -Propeller. Einige α -Untereinheiten (z. B. $\alpha 1$, $\alpha 2$, αM , nicht αv !) besitzen zwischen dem zweiten und dritten Propellerblatt eine zusätzliche eingeschobene I-Domäne, die ähnlich auch in der β -Untereinheit als sog. I-ähnliche Domäne gefunden wird (modifiziert Berman et al (2003) [17]).

a) und b): Darstellung von $\alpha v \beta 3$ -Integrin

a) Grenzflächenregion zwischen αv - und $\beta 3$ -Kopfgruppe, rot dargestellt ist die vermutete Bindungsregion.

b) Korrigierte Röntgenstruktur des extrazellulären Teils von $\alpha v \beta 3$ mit vier Domänen der α -Untereinheit und acht Domänen der β -Untereinheit (verändert nach Xiong et al (2001) [224]).

Die Untereinheiten sind nicht kovalent miteinander verknüpft und müssen zunächst N-glykosyliert werden, bevor sie im endoplasmatischen Retikulum (ER) $\alpha\beta$ -Heterodimere ausbilden können [116; 117; 118]. Durch Veränderungen des

Glykosylierungsmusters wird die Integrin-vermittelte Adhäsion variiert, bis hin zum Verlust der Adhäsionsfähigkeit. Einige Tumorzelllinien weisen abweichende Glykolisierungsmuster auf [116].

Die **größere α -Untereinheit** besitzt ca. 1.100 AS und besteht aus zwei meist unterschiedlich langen AS-Ketten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die extrazellulären, N-terminalen Regionen aller α -Untereinheiten enthalten sieben hintereinander angeordnete, sich wiederholende Sequenzeinheiten von jeweils 60 – 70 AS (*repeat domains*; Domäne I - VII), die in Form eines siebenblättrigen β -Propellers gefaltet sind (Abb. 3) [198].

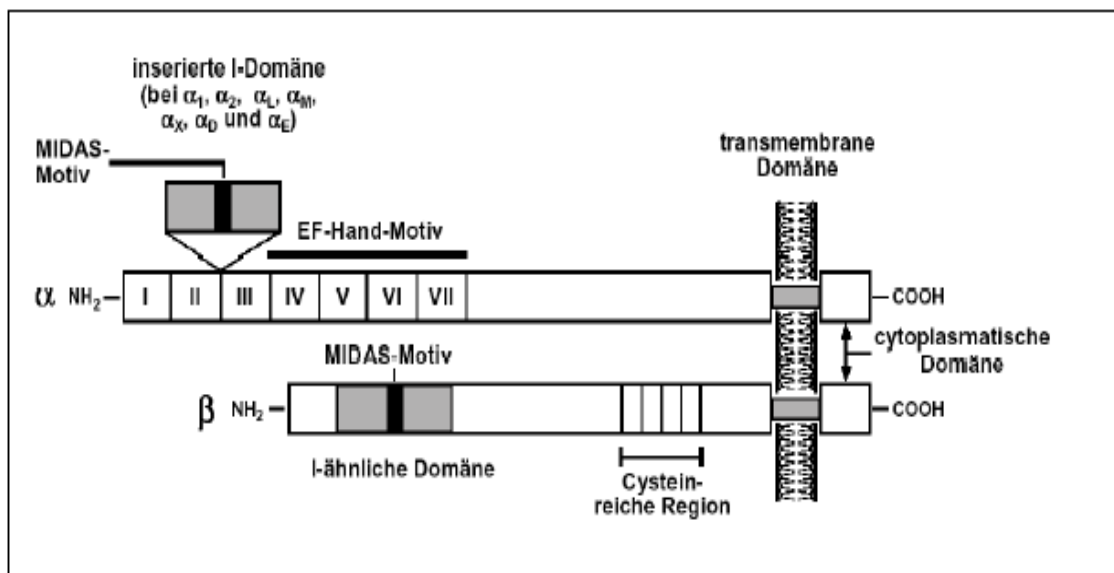


Abb. 3: Schematische Darstellung der Integrin-Struktur

Integrine sind transmembrane Glykoproteine, die aus einer α -Untereinheit (120 - 180 kD) und einer β -Untereinheit (90 - 110kD) bestehen. Beide Untereinheiten bestehen aus einer großen extrazellulären, einer transmembranen und einer kleinen zyttoplasmatischen Domäne.

Domäne I-VII: repetitive Sequenzeinheiten, die jeweils 60 – 70 AS beinhalten. Domänen IV – VII der α -Untereinheit besitzen Bindungsstellen divalenter Kationen, die als EF-Hand-Motiv bezeichnet werden. Die I-Domäne enthält eine konservierte Mg²⁺/Mn²⁺-Bindungsstelle, die auch als metallionenabhängige Adhäsionsstelle MIDAS (metal ion dependent adhesion site) bezeichnet wird (verändert nach Mould et al (1996) [152]).

Einige α -Untereinheiten (z. B. $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, αD , αM , αL , nicht jedoch αv) enthalten zwischen dem zweiten und dritten Propellerblatt (Domäne II und III) eine zusätzliche sog. I-Domäne (*inserted domain* von 200 AS) [112; 202]. In dieser I-Domäne, befindet sich eine konservierte Mg^{2+}/Mn^{2+} -Bindungsstelle, die als metallionenabhängige Adhäsionsstelle MIDAS (*metal ion dependent adhesion site*) bezeichnet wird. Das Kation ist von fünf AS-Resten des Integrins umgeben, während an die sechste, freie Bindungsstelle möglicherweise ein Carbonsäurerest des Liganden binden kann [118] (Abb. 3). Durch das Auslösen von Konformationsänderungen modulieren diese zweiwertigen Kationen indirekt die Affinität und die Spezifität des Integrins (siehe auch unter 3.1.3.) [117].

Die Domänen IV – VII besitzen ebenfalls, abhängig von der α -Untereinheit, Konsensussequenzen für drei bis vier mögliche Bindungsstellen divalenter Kationen. Diese Domänen werden als EF-Hand-Motiv bezeichnet [152; 202].

Die zytoplasmatischen Domänen der α -Untereinheiten sind einander wenig homolog, besitzen aber eine hochkonservierte membranproximale KXGFFFKR-Sequenz. Durch die Deletion dieser Sequenz kommt es zur konstitutiven Aktivierung der Integrine [159]. Verschiedene Splice-Varianten der α -Untereinheit erhöhen die Heterogenität der zytoplasmatischen Domäne. Diese Sequenz spielt eine wesentliche Rolle bei der Ligandenbindung, der Signalweiterleitung und der adhäsiven Aktivität. Verschiedene zytosolische Proteine, die an die zytoplasmatische Sequenz der α -Untereinheiten binden, konnten identifiziert werden. Das F-Aktin interagiert mit der $\alpha 2$ -Integrin-Untereinheit. Diese Wechselwirkung ist für die Lokalisation in den fokalen Adhäsionen wichtig und erhöht die Bindungsfähigkeit von Kollagen. Calreticulin stellt einen weiteren Interaktionspartner dar und bindet an die membranproximale Sequenz der α -Untereinheiten. Diese Interaktion moduliert die Zelladhäsion und die Signaltransduktion [44]. Caveolin-1, das ein transmembranäres Adapter-Protein darstellt, bindet ebenfalls an verschiedene α -Untereinheiten, unter anderem an die $\alpha 1$ -Untereinheit. Diese Interaktion erleichtert die Lenkung von Integrinen zu Tyrosin-Kinasen [218].

Die **β -Untereinheit** besteht mit Ausnahme von $\beta 4$ (ca. 1.750 AS) aus knapp 800 AS. Die primäre Struktur der β -Untereinheiten ist weniger variabel als die der α -

Untereinheiten. Jede β -Untereinheit besitzt im N-Terminus, im extrazellulären Teil, einen großen *Loop*, eine konservierte Domäne von etwa 250 AS. Diese weist Struktur-Homologie zur I-Domäne der α -Integrin-Untereinheiten auf. Aus diesem Grund wird dieser Bereich als I-ähnliche Domäne bezeichnet. In Analogie zu den I-Domänen besitzt auch die I-ähnliche Domäne ein MIDAS-Motiv [133; 140]. In der Nähe der transmembranen Region enthält die β -Untereinheit vier hochkonservierte zysteinreiche Domänen, die jeweils etwa 40 AS lang sind und Homologie zum EGF-Motiv aufweisen [152] (Abb. 3).

Die zytoplasmatischen Domänen der β -Untereinheiten bestehen aus 15 – 65 AS und verbinden über intrazelluläre Proteine wie Talin, Vinculin und α -Actinin den Rezeptor mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts. Im Gegensatz zur α -Integrin-Untereinheit sind die zytoplasmatischen Domänen der β -Untereinheiten sehr homolog [180]. Für die $\beta 1$ -, $\beta 3$ - und $\beta 4$ -Integrin-Untereinheiten sind ebenfalls Splicevarianten beschrieben worden [175]. Alle β -Untereinheiten besitzen ein hochkonserviertes Motiv, die HDRR-Sequenz im membranproximalen Bereich. Diese Sequenz interagiert mit dem hochkonservierten GFFKR-Motiv der α -Untereinheit [210].

Bei der Wechselwirkung der Integrine mit Liganden sind beide Untereinheiten beteiligt [26; 117; 118; 176]. Durch Kombination der verschiedenen α - und β -Untereinheiten entstehen Integrine mit bestimmter Ligandenspezifität. Während einige Integrine mit hoher Selektivität nur einen Liganden binden, z. B. $\alpha\beta 6$ an das EZM-Protein Laminin (LN), sind andere Integrine in ihrem Ligandenbindungsverhalten eher promisk, wie z. B. $\alpha\beta 3$, welches zwar bevorzugt an Osteopontin (Opn) und Vitronektin (VN), aber noch mindestens an sieben weitere EZM-Proteine bindet [117; 118; 165; 176]. Die Liganden der jeweiligen Integrine aus EZM und Zelloberfläche sind in Tab. 1 zusammengefasst. Weiterhin gibt es lösliche Integrinliganden, u. a. Matrix-Metalloproteinasen (MMP), aber auch xenogene wie Bakterien, Viren und die gerinnungshemmenden Disintegrine aus Schlangengiften und Speichel von Blutegel und Zecken [117; 165; 176].

Integrin	Ligand	Integrin	Ligand
$\alpha 1\beta 1$	Col, LN	$\alpha D\beta 2$	VCAM-1, ICAM-3
$\alpha 2\beta 1$	Col, LN	$\alpha L\beta 2$	ICAM-1, ICAM-2
$\alpha 3\beta 1$	Col, LN, FN	$\alpha M\beta 2$	iC3b, Fg, FN, Faktor X, ICAM-1, ICAM-2
$\alpha 4\beta 1$	FN, In, Opn, VCAM-1	$\alpha X\beta 2$	iC3b, Fg
$\alpha 5\beta 1$	FN, Fg	$\alpha 11\beta 3$	Fg, FN, VN, vWF, Tsp
$\alpha 6\beta 1$	LN	$\alpha v\beta 3$	VN, LN, FN, vWF, Tsp, Tn, Opn, Fib, Fbu
$\alpha 7\beta 1$	LN	$\alpha v\beta 5$	VN, FN, Opn, Fg, vWF
$\alpha 8\beta 1$	FN, VN, Tn, POEM, Neph	$\alpha v\beta 6$	FN, Fg, Tn
$\alpha 9\beta 1$	Col, LN, Tn, VCAM-1, Opn	$\alpha v\beta 8$	VN
$\alpha 10\beta 1$	Col	$\alpha 4\beta 7$	MAdCAM-1, VCAM-1, FN
$\alpha 11\beta 1$	Col	$\alpha 6\beta 4$	LN
$Av\beta 1$	VN, FN, Opn, Fg	$\alpha E\beta 1$	E-Cadherin

Tab. 1: Liganden der verschiedenen Integrine aus EZM und Zelloberfläche [165].

Verwendete Abkürzungen der Integrinliganden (alphabetisch): **Col** = Kollagen; **Ep** = Epiligrin; **Faktor X** = Blutgerinnungsfaktor X; **Fbu** = Fibulin; **Fib** = Fibrillin; **Fg** = Fibrinogen; **iC3b** = inactivate complement factor 3; **In** = Invasin; **MAdCAM** = mucosal addressing cell adhesion molecule; **Neph** = Nephronectin; **Opn** = Osteopontin; **POEM** = preosteoblast epidermal growth factor-like repeat protein with meprin; **Tn** = Tenascin; **Tsp** = Thrombospondin (Grau hinterlegte Felder kennzeichnen Integrine mit RGD-abhängiger Ligandenbindung).

Als Bindungsepitop für Integrine wurde 1984 das Tripeptid RGD (AS-Sequenz Arginin (R), Glycin (G), Aspartat (D)) von Ruoslathi und Pierschbacher entdeckt und als minimale Zelladhäsionssequenz in FN identifiziert [176]. Es konnte gezeigt werden, dass immobilisierte RGD-Peptide ähnlich wie EZM-Proteine integrinvermittelte Zelladhäsion bewirken, während lösliche RGD-Peptide antagonistisch zur EZM adhärenzte Zellen ablösen [176]. Die RGD-Sequenz wurde seitdem in vielen anderen EZM-Proteinen nachgewiesen, z. B. in VN, Fibrinogen, von Willebrand Faktor (vWF), Kollagen, LN, Opn, Tenascin (Tn) und Thrombospondin, (Tsp) aber auch in den oben erwähnten xenogenen Integrinliganden. Die verschiedenen Proteine können trotz des gemeinsamen RGD-Motivs eine hohe Integrinselektivität aufweisen. Dies kann mehrere Ursachen haben: Zum einen besitzen EZM-Proteine weitere spezifitäts- (und affinitäts-) steigernde Adhäsionssequenzen für den Kontakt mit anderen

Bindungsregionen auf den jeweiligen Integrinen [176]. Weiterhin nimmt man an, dass die jeweiligen RGD-Sequenzen, obwohl sie üblicherweise in flexiblen Schleifen (*loops*) präsentiert werden, in einer bevorzugten Konformation vorliegen und so unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Integrinsubtypen aufweisen [176]. Außerdem tragen die Seitenketten der benachbarten AS zur Integrinselektivität bei. Neben der RGD-Sequenz wurden in den letzten Jahren noch viele weitere integrinbindende Peptidsequenzen gefunden [117; 175; 176].

3.1.2. Aktivierung der Integrine

Der Aktivierungszustand von Integrinen kann im Wesentlichen durch zwei Ereignisse reguliert werden:

1. durch eine Affinitätsänderung, die durch eine Konformationsänderung hervorgerufen wird, sowie
2. durch eine Aviditätsänderung, die durch veränderte Aggregation der Integrin-Moleküle auf der Zelloberfläche ausgelöst wird.

Konformationsänderungen sind bei Integrinen mehrstufig. Man kennt unter anderem einen niedrigaffinen, ruhenden Zustand, in dem Liganden kaum gebunden werden, einen höheraffinen, ligandenbindenden (ligandenkompetenten) Status, bewirkt durch verschiedene Stimuli (z. B. divalente Kationen (siehe unter 3.1.1.), Regulation durch Proteine des Zytoskeletts, RGD-Liganden), eine Adenosindiphosphat- (ADP-) vermittelte affinitätsneutrale Veränderung, so dass auch weniger exponierte Liganden gebunden werden können, einen ligandengebundenen Zustand sowie einen geöffneten Zustand nach Ligandenbindung [93; 94; 95; 152].

Aviditätsveränderungen sind vermutlich die Folge einer erhöhten lateralen Integrin-Mobilität, die durch temporäre Entkopplung des Integrins vom Aktin-Zytoskelett erleichtert wird [198].

Die Funktion der Integrine unterliegt einem raschen Wechsel zwischen dem inaktiven und dem aktiven Zustand der Moleküle. Verschiedene Modelle wurden dabei aufgestellt, um die Aktivierung bzw. Inaktivierung von Integrinen zu beschreiben. Ein anschauliches und heute favorisiertes Modell wurde von K. Gottschalk entworfen und als Klappmesser-Modell der Signaltransduktion bezeichnet [94] (Abb. 4).

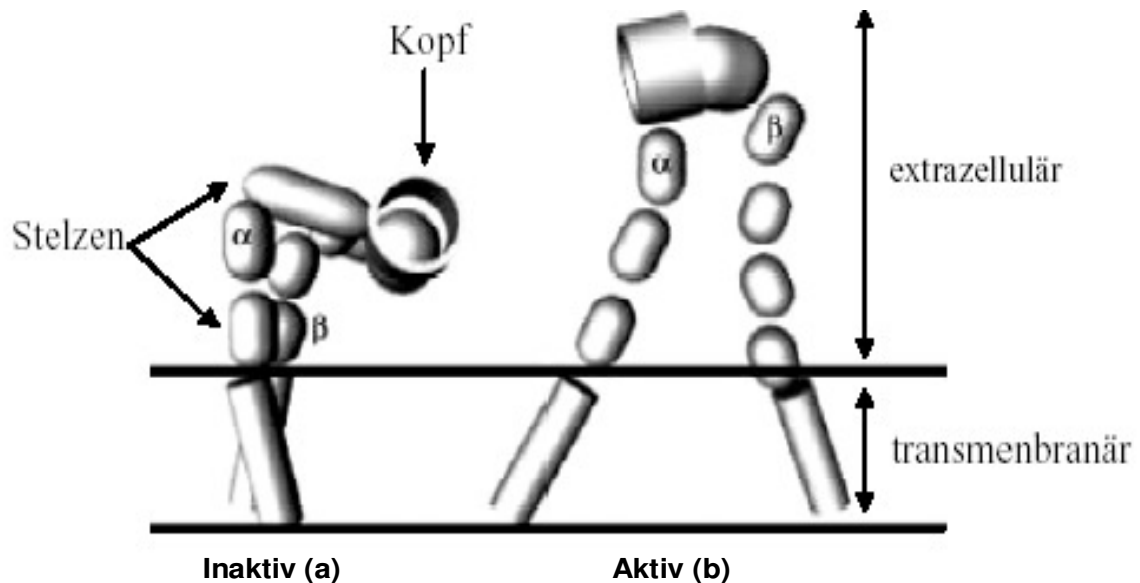


Abb. 4: Klappmesser-Modell der Signaltransduktion

Dieses Modell der Transduktion wurde durch Kombination der Ergebnisse aus Röntgenstrukturanalysen, elektronenmikroskopischer Studien und NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Stelzen-Region der Integrine abgeleitet (verändert nach Gottschalk und Kessler (2002, 2004) [93; 94; 95]).

Abb. a zeigt den inaktiven, ruhenden Zustand. Nach Ligandenbindung erfolgt eine scherenförmige Bewegung. Das Scherengelenk ist nahe der Integrin-Kopfgruppe lokalisiert. Dadurch bleiben die Kopfgruppen assoziiert. Bei den Stelzen-Regionen handelt es sich um zwei lineare Regionen, auch als „Stalk“-Regionen bekannt, die sich in den extrazellulären Bereichen der α - und β -Untereinheiten befinden. Nach Aktivierung durch Ligandenbindung richten sich beide Integrin-Untereinheiten auf (**Abb. b**).

Nach Modellrechnungen, die aus elektronenmikroskopischen Bildern gewonnen wurden, beruht der Übergang zwischen dem niedrigaffinen und dem ligandenkompetentem Status auf einer Verdrehung der α - und β -Untereinheit zueinander [94; 95]. Durch Bindung eines Liganden wird eine scherenartige Bewegung der Untereinheiten bewirkt, wobei das Scherengelenk nahe der Integrinkopfgruppe lokalisiert ist. Dadurch bleiben die Kopfgruppen assoziiert. Die Transmembrandomänen haben dabei sowohl bei der Verdrehung als auch bei der Öffnung scharnierartig Kontakt miteinander.

Somit richten sich beide Integrin-Untereinheiten auf, um mit der EZM in Kontakt zu treten [94; 95].

3.1.2.1. Aufbau und Funktion der fokalen Adhäsionen

Die Bindung eines Liganden löst den Zusammenschluss mehrerer Integrine zu Clustern aus, was eine verstärkte Wechselwirkung zwischen Ligand und Zelle bewirkt sowie die Signaltransduktion beeinflusst. Das Clustern der Integrine führt zu einer Steigerung von Ligandenbindungsstärke und –geschwindigkeit, bewirkt eine Übertragung von Signalen, die von der monovalenten Ligandenbindung verschieden ist, und induziert die Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen (FAs) [181; 193; 200]. FAs stellen eine spezielle Form der organisierten Zell-Matrixkontakte dar, stabilisieren die Aktin-Mikrofilamente und sind an morphogenetischen Zellveränderungen wie Spreiten, Bildung von Filopodien und Lamelipodien beteiligt [28; 138]. Eine weitere Rolle der FAs besteht darin, die Botenstoffe, welche die Signale weiterleiten, zu konzentrieren und in den Zellkern zu leiten [90; 210]. Dazu befinden sich im Bereich der FAs Proteinkinasen wie FAK (*focal adhesion kinase*) und ILK (*integrin-linked kinase*) sowie die Signalmoleküle Src und p130cas, welche direkt an die membranproximale Seite der Integrin-Untereinheiten binden können [2; 28; 181].

In letzter Zeit wird in der Literatur darauf hingewiesen, dass auch das Auflösen der FAs ein physiologisch wichtiger Vorgang ist [153]. Dies wurde durch die Beobachtung stimuliert, dass bestimmte EZM-Proteine die Auflösung von FAs bewirken: Tenascin-C über den Rezeptor Annexin II, Thrombospondin über Calreticulin und SPARC (*secreted protein, acidic and rich in cysteine*) über einen unbekanntes Rezeptor [153]. Ein gewisses Maß an Integrinclustern kann dabei erhalten bleiben. Diesem sog. *intermediate cell adhesion state* wird eine große Bedeutung für Morphogenese, Wundheilung und Migration beigemessen. Er wird weiterhin als Übergang in den Apoptose induzierenden Zustand interpretiert [153] (siehe auch unter 3.1.4.).

3.1.3. Integrin vermittelte Signaltransduktion

Dass Signaltransduktion keinen einfachen linearen Pfad biochemischer Interaktionen darstellt, sondern ein interagierendes Netzwerk, zeigt sich deutlich am Beispiel der Integrine (Abb. 5).

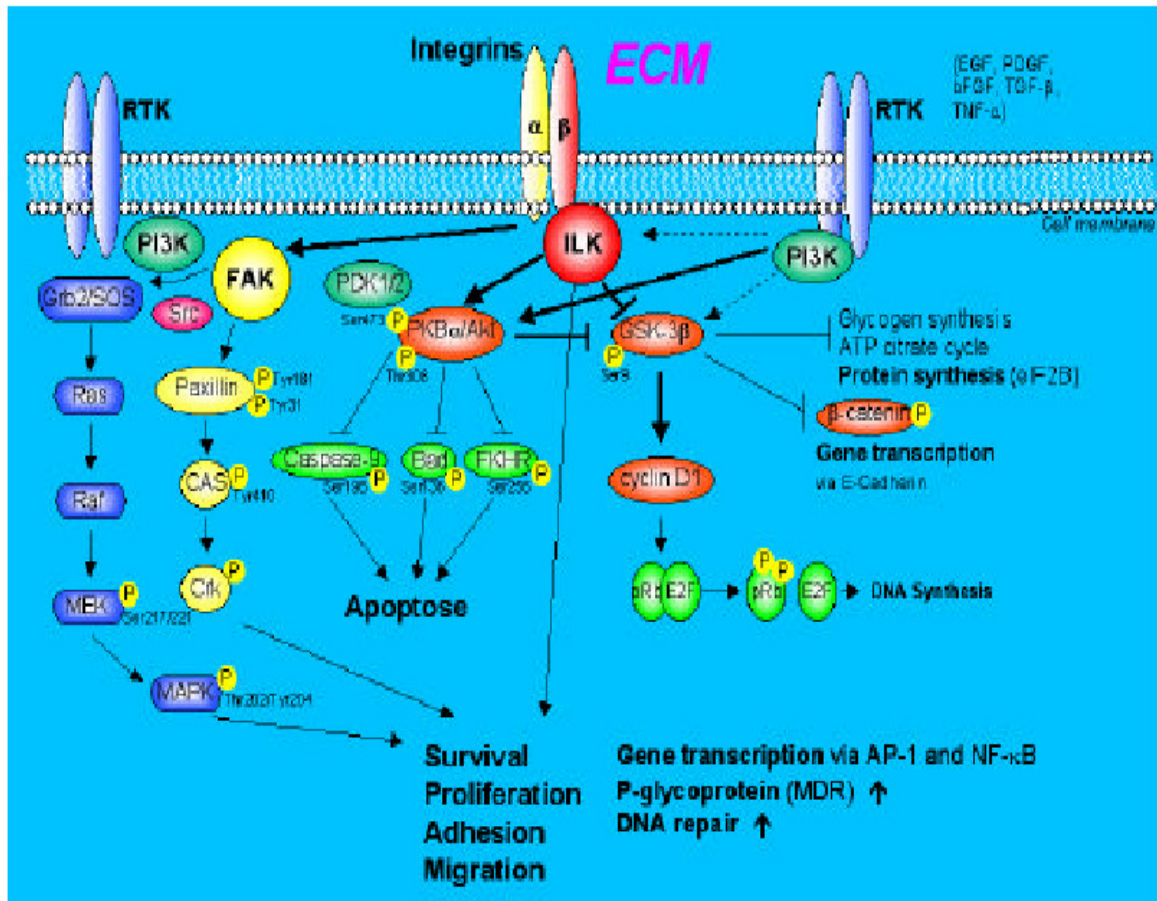


Abb. 5: integrin-vermittelte Signaltransduktion und Crosstalk mit Wachstumsfaktor-Rezeptoren (RTKs)

Der Integrin-abhängige Signalweg moduliert die Aktivität von FAK und Src und reguliert somit Zellzyklus und Proliferation. Weiterhin kontrollieren Integrine die Zelladhäsion und Proliferation über die Aktivierung von Caveolin, Fyn, Shc und Grb2, was zur Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade führt. Der RTK-abhängige Signalweg: Die Phosphorylierung der RTK wie TrkA durch die Bindung an NGF moduliert zum einen die Aktivierung der PI3-Kinase und Akt, die in die Regulation von Überleben und Zellproliferation involviert sind, zum anderen wird der Src/Grb2/SOS-Signalweg aktiviert, der über Ras und Raf in die MAP-Kinase-Kaskade übergeht und zur Zelldifferenzierung beiträgt. Gemeinsame Signalwege zwischen den Integrinen und RTKs stellen die PI3-Kinase und die PLCγ dar. Aktivierte PI3-Kinase inhibiert über Akt die proapoptischen Proteine BAD und Caspase 9, was das Überleben der Zellen fördert (übernommen von Lisiak und Cordes(2004) [137]).

Integrine können zusätzlich zu ihrer adhäsiven Funktion intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktivieren. So wird Integrin-abhängig z. B. die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht, Tyrosin- und Serin/Threonin-Phosphorylierungen induziert, der Inositollipid-Metabolismus beeinflusst sowie die Aktivität der Familie der GTPasen moduliert [7; 47; 48; 51; 52; 61; 91; 137; 187;

188; 190]. Integrin-abhängige Signalwege können durch unterschiedliche Mechanismen induziert werden:

Zum einen können durch einen Rezeptor-*Crosstalk* zwischen Wachstumsfaktoren und Integrinen Informationen über parallele Wege geleitet werden, die in die Phosphorylierung von *Downstream*-Signalproteinen münden [66; 190; 226].

Sowohl Integrine als auch Wachstumsfaktoren mit den an sie gekoppelten RTKs (*receptor tyrosine kinases*) können unabhängig voneinander zu einer transienten, leichten Aktivierung der Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalkette führen. Die Kombination beider Wege führt jedoch zu einer Verstärkung des Signals und damit zur verstärkten Aktivierung dieses Signalweges [38; 47; 51; 52; 53; 54; 55; 137, 182]. Nach Aktivierung und Durchlaufen der einzelnen Signalstationen phosphoryliert MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) entweder in der Zelle verschiedene zytoplasmatische Substrate oder wird in den Zellkern transloziert, wodurch Transkriptionsfaktoren phosphoryliert werden. Dies ist für Proliferation, Adhäsion, Migration und Zellüberleben sowohl für normale als auch für maligne Zellen essentiell (Abb. 5).

Der zweite Mechanismus zur Aktivierung Integrin-abhängiger Signale erfolgt durch das oben erwähnte Clustern der Integrine, was wiederum die Reorganisation des Zytoskeletts und den Aufbau von FAs zur Folge hat. Der Mechanismus der Integrin-abhängigen Signaltransduktion kann dabei FAK-abhängig (1) oder FAK-unabhängig (2) verlaufen.

1. Der Integrin stimulierte FAK-abhängige Signalweg beginnt mit der Oligomerisierung der Integrine, was zur Rekrutierung und Dimerisierung der assoziierten FAK führt [37; 47; 51; 52; 53; 54; 55; 137; 181]. Die Aktivierung von FAK führt zur Autophosphorylierung an Tyr³⁹⁷ [31] und bildet somit eine Bindungsstelle für die Familie der Src-Kinasen, welche FAK an weiteren Tyrosinresten phosphorylieren können. Dadurch entstehen Bindungsstellen für SH2-Domänen-tragende Proteine wie das Adapter-Protein Grb2 (*growth factor receptor-bound protein*). Dieses koppelt FAK über SOS (*son-of-sevenless*) an den Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalweg [47; 51, 52; 53, 54; 55; 137], welcher wie bereits beschrieben von Integrinen oder Wachstumsfaktoren oder beiden zusammen vermittelt werden kann (Abb. 5).

Zudem kann der FAK-Src-Komplex p130cas phosphorylieren und damit über die Adaptorproteine Crk und Nrk [183] eine Verbindung und Aktivierung zum

JNK (JUN-N-Terminal-Kinase)/MAPK-Weg herstellen. Aktiviertes JNK transloziert in den Zellkern und phosphoryliert dort Transkriptionsfaktoren wie c-JUN, welches mit c-Fos interagiert und den AP-1-Transkriptionsfaktor-Komplex bildet, der die Gene, die für die Zellproliferation und für das Zellüberleben von Bedeutung sind, reguliert [205]. Dabei kommt es zur Expression von Apoptoseinhibitoren, insbesondere von Mitgliedern der IAP-Familie (cIAP1, cIAP2, XIAP), welche durch Bindung an Effektor-Caspasen (siehe unter 3.4.2.) deren Aktivierung und damit die Induktion von Apoptose verhindern können [179]. Neben der Proliferation und dem Überleben reguliert der FAK-abhängige Signalweg auch Migration und Adhäsion, wobei in diesem Zusammenhang Paxillin und Tensin potentielle Substrate für den FAK-Src-Komplex sind (Abb. 5). Sie können phosphoryliert werden, wodurch eine Zytoskelett-Reorganisation bewirkt werden kann [47; 51; 52; 53; 54; 55; 110; 137].

2. Einen FAK-unabhängigen Signalweg stellt die Signalkette über die Serin/Threonin-Kinase ILK dar [103]. ILK, welches mit der zytoplasmatischen Domäne der β 1-, β 2- und β 3-Untereinheit interagiert, kann in einer PI3K- (Phosphoinositol 3-Kinase) abhängigen Weise [206] die GFR-assoziierte Proteinkinase B α (PKB α /Akt) an Ser473 [68; 145] sowie die Glykogensynthasekinase-3 β (GSK-3 β) an Ser9 phosphorylieren [207]. Diese Effekte gipfeln zum einen in einer Apoptoseinhibition sowie zum anderen in einer Progression des Zellzyklus.

PKB α /Akt fördert das Zellüberleben durch Inhibition der Apoptose, indem proapoptotische Proteine wie Caspase 9 und proapoptotische Mitgliedern der Bcl-2- (*B-cell lymphoma 2*) Familie wie Bad phosphoryliert und damit inaktiviert werden [47; 51; 52; 53; 54; 55; 63; 64; 91; 128; 137] (Abb. 5). Zudem kann PKB α /Akt den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor Kappa B*) aktivieren, welcher sowohl die Expression einer Reihe von antiapoptotischen Proteinen wie Osteoprotegerin induziert, als auch die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, welche den Schlüsselschritt im mitochondrialen Signalweg der Apoptosekaskade darstellt, verhindert [128; 207].

Die Progression sowie Regulation des Zellzyklus kommt durch die GSK-3 β -abhängige Proteolyse von Cyclin D1 zustande [69]. Zudem kann GSK-3 β die Gentranskription über NF- κ B und AP-1 induzieren [111; 206].

Ein weiterer FAK-unabhängiger Signalweg basiert auf der Assoziation des transmembranen Teils der α -Untereinheiten einiger Integrine (α 6 β 4, α 1 β 1, α 5 β 1 und α v β 3) mit dem kleinen Membranprotein Caveolin. Dadurch werden Fyn und Shc zu den FAs rekrutiert und letzteres phosphoryliert [218]. Obwohl Caveolin auch mit anderen α -Untereinheiten (α 2, α 3) assoziiert, können diese nicht Shc rekrutieren. Die Assoziation mit Shc aktiviert den Ras/Erk-Signalweg, die Transkription des Fos-Serum-Response-Elements (SRE) und induziert den Eintritt der Zelle in die G1-Phase des Zellzyklus in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren. Shc, was nicht an Integrine gekoppelt ist, aktiviert weder SRE-abhängige Transkription noch die mitogene Stimulation der Mitogenese [218].

Neben diesen Signalwegen existieren noch unzählige weitere Möglichkeiten von großer Komplexität. Zudem existieren überall Querverbindungen und Schnittstellen zwischen den einzelnen Signalabschnitten, so wie der oben beschriebene ausgeprägte *Crosstalk* zwischen Integrin- und Wachstumsfaktorrezeptorkaskaden [190; 226]. Hierbei zeigt sich, dass die verschiedenen Rezeptoren identische intrazelluläre Signalwege benutzen, allerdings häufig an verschiedenen Stellen der Signalkaskade [190]. Nur das Zusammenspiel aller Signalwege garantiert einen reibungslosen und optimalen Ablauf der Regulation von Zellproliferation, Zellzyklusprogression, Zellüberleben, Differenzierung, Migration, Zytoskelettorganisation und vieles mehr [91; 188; 190]. Das Ausbleiben dieser Signale kann zur Apoptose führen (siehe 3.1.4.).

3.1.4. Integrine und Apoptose

Schon relativ früh war bekannt, dass Zellen, die physiologischerweise adhären wachen, bei Verlust des EZM-Kontaktes über Apoptose sterben können. In etlichen Studien konnten Integrine als Ursachen für das Überleben bzw. deren Fehlen für das Absterben der Zellen identifiziert werden [78; 79; 81]. Dieses schlichte Modell muss heute allerdings erweitert werden, weil man Beispiele dafür kennt, dass adhären Zellen absterben, weil nicht das richtige Integrin gebunden

wird [200; 201], dass adhärenzte Zellen trotz multivalenter Liganden wegen zu geringer Substratkontaktfläche in Apoptose übergehen, und dass auch Suspensionszellen durch Kontakt zu Integrinliganden selbst zytotoxische Substanzen und ionisierende Strahlung überleben können, was in dieser Arbeit näher untersucht wurde [108].

Entsprechend den vielfältigen Möglichkeiten der Signalübertragung sind Integrine in die komplexen Mechanismen des Überlebens und der Apoptose zellspezifisch an verschiedenen Stationen der Signalketten involviert. Ein zusammenhängendes Bild hierzu steht allerdings noch aus.

Wie bereits erwähnt, werden über Integrine Überlebenssignale übermittelt, welche Zellen im speziellen Milieu der EZM-Proteine sogar vor zytotoxischen und damit Apoptose auslösenden Stimuli bewahren können [3; 47; 59; 60; 200]. Dies kann unter anderem über die in 3.1.3. beschriebene Aktivierung des ILK/PI3K/PKB/Akt-Signalweges erfolgen, welcher die Inhibierung proapoptotischer Proteine (Bad und Caspase 9) sowie die Expression antiapoptotischer Proteine (Mitglieder der Bcl-2- und IAP-(*inhibitor of apoptosis protein*) Familie) zur Folge hat [3; 177].

Kommt es im Umkehrschluss zum Ausbleiben der über Integrine vermittelten Überlebenssignale, nimmt die Expression der antiapoptotischen Proteine ab und die der proapoptotische zu [3; 177].

In jüngster Zeit wurden für zwei proapoptotische Signale spezielle Mechanismen vorgestellt:

- a) Das Bmf-Protein aus der Bcl-2-Familie assoziiert normalerweise mit dem Zytoskelett. Eine Inhibierung der Aktinpolymerisation setzt Bmf frei und es überträgt gleichsam als Sensor der Zelladhäsion proapoptotische Signale an die Mitochondrien [150].
- b) Weiterhin wurde gezeigt, dass β 1- und β 3-Integrine, die nicht an einen EZM-Liganden gebunden sind, direkt über eine zytoplasmatische Peptidsequenz Caspase 8 aktivieren und so Apoptose einleiten können, was auch als *integrin mediated death* (IMD) bezeichnet wird [199]. Allerdings ist noch nicht abschließend geklärt, welche Eigenschaften des ungebundenen Integrins für den IMD verantwortlich sind. Denkbar wären fehlende Zugkräfte, strukturelle Effekte (z. B. durch Verbergen der Caspase-Aktivierungssequenz durch Konformationsänderung, Integrinclustern oder Rekrutierung weiterer

Bindungspartner) oder fehlende, andere Integrin vermittelte Überlebenssignale (Phosphorylierung von FAK, Aktivierung von PKB α /Akt, Rekrutierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Nutzung der antiapoptotischen Stimuli durch die im Adhäsionsmedium enthaltenen Wachstumsfaktoren).

3.1.5. Integrin vermittelte Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung – *cell adhesion-mediated radioresistance*

Zellkontakte zur EZM beeinflussen stark zelluläre Mechanismen, die u. a. *in vitro* zu einem verbesserten Überleben sowohl von normalen Körperzellen als auch von Tumorzellen unterschiedlicher Entitäten nach Bestrahlung führen können [47; 48; 49; 51; 52; 53; 54; 55; 59; 104]. Wichtig für die Bedeutung der Effekte der EZM bei dieser so genannten zelladhäsionsbedingten Radioresistenz ist die Kenntnis sowohl der Integrin-, Wachstumsfaktoren- sowie der Zellzyklus-abhängigen Signalwege (siehe 3.1.3.). Denn Interaktionen zwischen diesen Signalketten können in vielfältiger Art und Weise die EZM modulieren, was zur Ausprägung eines Resistenzmechanismus gegenüber ionisierender Strahlung im Sinne einer Strahlen induzierten Apoptoseinhibition führen kann [47; 48; 104; 191].

Ionisierende Strahlung greift an verschiedenen Punkten in die zytoplasmatischen Signalkaskaden der Integrine ein [45; 47]. Diese Phänomene sind sehr gut an der β 1-Untereinheit untersucht worden. So kommt es durch Bestrahlung zunächst zu einer vermehrten Expression der β 1-Untereinheit an der Zelloberfläche, was in einer verstärkten Adhäsion an EZM-Proteine wie FN oder LN resultiert. Dadurch werden im Folgenden auch verschiedene *Downstream*-Ereignisse in den Signalkaskaden beeinflusst: Bestrahlung stimuliert die Aktivierung von ILK [207], die ihrerseits PKB/Akt sowie GSK-3 β aktivieren kann, welche über die unter 3.1.3. dargelegten Signalwege zu einer Inhibition von Apoptose sowie zu einer Progression des Zellzyklus führen können [45; 47; 48; 51; 52; 53; 59; 60; 207]. Diese Effekte sind jedoch individuell von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich stark ausgeprägt.

All diese Phänomene beruhen auf Untersuchungen an adhärennten Zellkulturen. Für Suspensionskulturen sind nur sehr wenige Daten vorhanden, ein Gesamtüberblick liegt nicht vor, weshalb im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, inwiefern auch Suspensionszellen durch Integrin vermittelte Adhäsion an

EZM-Proteinen unter Bestrahlung profitieren können, und ob ähnliche Strahlenresistenzphänomene beobachtet werden können.

3.1.6 Integrin vermittelte Adhäsion bei der Hämatopoese

Im Knochenmark findet die Reifung hämatopoetischer Zellen statt, die zwischen Gefäßen, Stromazellen und EZM-Proteinen (FN, Kollagen, etc.) eingebettet sind. Nach ihrer Ausdifferenzierung passieren reife Blutzellen die Knochenmark-Blut-Schranke, die aus Adventitiazellen, Basalmembran und Endothelzellen besteht. β 1-Integrine spielen bei den notwendigen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion zur kontrollierten Adhäsion, Differenzierung und Migration hämatopoetischer Zellen eine entscheidende Rolle [142]. α 4 β 1- und α 5 β 1-Integrine sind die wichtigsten Rezeptoren für myeloetische Vorläuferzellen [127]. α 4 β 1 bindet das CS-1-Segment in FN und VCAM-1 auf Endothelzellen, während α 5 β 1 das RGD-Peptid im FN erkennt [214]. *In vitro* und *in vivo* ändert sich das α 4 β 1/ α 5 β 1-Expressionsmuster auf der Zelloberfläche von Myelozyten in Abhängigkeit ihres Reifegrades. Die schon im frühen Differenzierungsstadium reduzierte α 5 β 1/FN-Interaktion durch α 5 β 1-Expressionsabnahme sowie die allmählich stärker werdende Interaktion von VCAM-1-aktivierten Stroma- und Endothelzellen mit α 4 β 1 dient der Passage reifer Blutzellen ins periphere Blut [127].

Die aus dem Knochenmark stammende promyeloische HL60-Zelllinie adhärert α 4 β 1-/ α 5 β 1-abhängig auf FN und kann durch Spreizung Zellkontakte zu Stromazellen aufbauen [212]. In geringer Zahl können HL60-Zellen zu migrierenden Zellen differenzieren [88]. Ihre spontane Differenzierung ist möglicherweise durch autokrine TNF α -Sekretion erklärbar [223]. *In vitro* können HL60-Zellen durch langfristige DMSO-Inkubation (3 – 4 Tage) granulozytär differenzieren. Sie exprimieren weniger α 5 β 1 auf der Zelloberfläche, behalten aber α 4 β 1 im Gegensatz zum peripheren Granulozyten. Ihre herabgesetzte Adhäsion auf FN korreliert mit einer α 5 β 1-Abnahme [227].

In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die Adhäsion von HL60-Zellen an FN auf die strahlenbedingte Apoptose hat, und wie dies mit den hier beschriebenen Erkenntnissen korreliert werden kann.

3.1.7. Pathophysiologische Bedeutung der Integrine für Tumorgenese und Tumorresistenz - klinischer Ausblick

Da Integrine auch bei der Entstehung von Krankheiten eine wichtige Rolle spielen, sind sie ideale Ziele für die Entwicklung von Medikamenten. Ausgehend von natürlichen Binderegionen wie der RGD-Peptidsequenz wurden eine Vielzahl peptidischer und nicht-peptidischer Integrinliganden entwickelt, die sich in Rezeptoraffinität und –selektivität voneinander unterscheiden und den natürlichen Liganden zum Teil deutlich überlegen sind. Da Peptide ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften besitzen, wurde ab Mitte der 90er Jahre der Schwerpunkt auf die Synthese von peptidähnlichen (peptidomimetischen) bzw. nicht-peptidischen Verbindungen z. B. als potentielle, oral verfügbare Tumorthapeutika gelegt.

Prinzipiell gibt es unterschiedliche Wirkungsweisen von synthetischen Integrinliganden mit medizinischer Relevanz (Abb. 6).

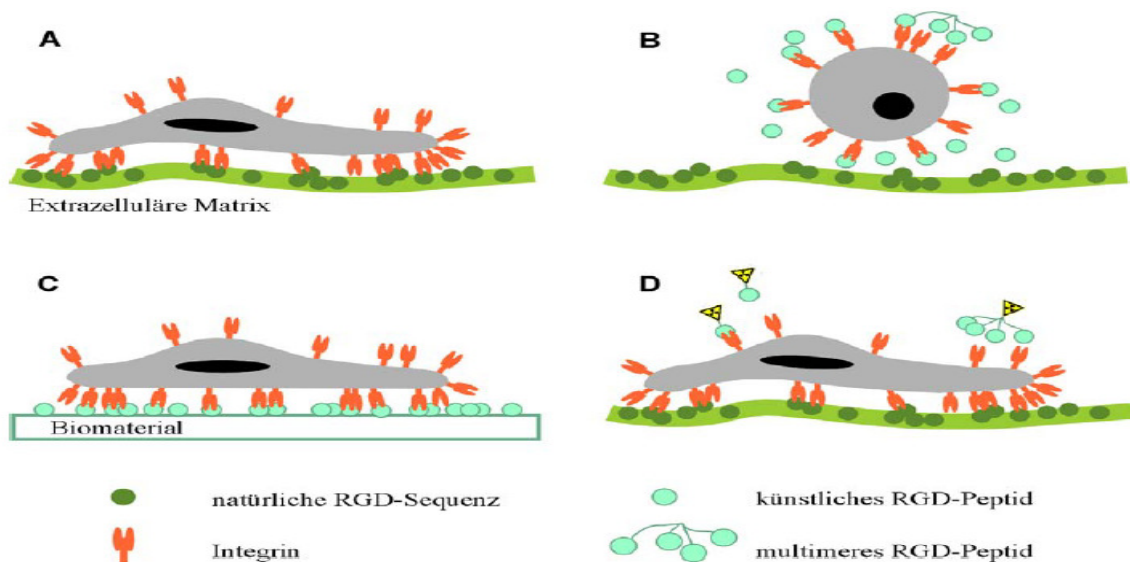


Abb. 6: Therapieansätze und Verwendungsmöglichkeiten von synthetischen Integrin-Liganden

A: Adhärenz Zelle in natürlicher Umgebung

B: RGD-Peptide als lösliche Integrin-Antagonisten der EZM zur Zellablösung, z. B. in der Tumorthherapie. Nach Ablösung gehen viele adhärenz wachsende Zellen in den programmierten Zelltod/Apoptose über.

C: RGD-Peptide als immobilisierende Integrin-Agonisten der EZM zur Stimulierung der Zelladhäsion auf Biomaterialien.

D: RGD-Peptide zum gezielten Transport einer weiteren Funktionalität (z. B. Radionukleotid, Wirkstoff).
(modifiziert nach Dechantsreiter et al (1999) [64] und nach Kantlehner et al (2000) [123]).

A) Lösliche, niedermolekulare Integrinliganden können an Stelle der EZM-Proteine an die Integrinrezeptoren binden. Die Zelle wird daraufhin von der EZM abgelöst, verliert dabei ihre Polarität, wodurch Apoptose (Anoikis) induziert wird. Hierdurch kann die im Folgenden ausführlicher beschriebene tumorinduzierte Angiogenese unterdrückt werden [19; 20; 21; 22]. Exprimieren Tumorzellen selbst bestimmte Integrine, so kann durch kompetitive Bindung von Integrinen mit synthetischen Liganden die Migration gestört und die Metastasierung über dieses Integrin behindert werden. Ob im Gegensatz hierzu auch überlebensfördernde Stimuli auf die Tumorzellen einwirken, wird zur Zeit in der Literatur im Sinne der Antagonist-Agonist-Theorie kontrovers diskutiert [119].

Die Inhibierung der Tumorangiogenese stellt eines der vielversprechenden Einsatzgebiete für künstliche Integrinliganden dar, denn Mitglieder der Integrinfamilie nehmen eine Schlüsselposition beim Wachstum von neuen Blutgefäßen ein. Für die Angiogenese sind die Integrine $\alpha\beta 3$ und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch $\alpha\beta 5$ von großer Bedeutung [22; 40]. Exprimiert auf normalen Endothelzellen, auf fast allen Zelltypen mesenchymalen Ursprungs sowie auf einigen invasiven Tumoren, wie z. B. auf dem metastasierenden Melanom und dem Glioblastom im Spätstadium, binden sie an eine Reihe von EZM-Proteinen, welche die RGD-Peptidsequenz aufweisen. Antikörper und synthetische RGD-Peptide, die gegen die Integrine $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$ gerichtet sind, hemmen *in vitro* die Formation von Endothelzellen in Matrigel-Assays [19; 20; 21; 22]. Die entscheidenden Untersuchungen, dass Integrin $\alpha\beta 3$ auch in der Tumorangiogenese eine wichtige Rolle spielt, kamen von D. Cheresh und P. Brooks [19; 20; 21; 22; 40]. Sie konnten in der Chorioallantoismembran (CAM) im Modell des befruchteten Hühnereis zeigen, dass die Blockierung des Integrins mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper LM 609 (Vitaxin) die Funktion proteolytischer Enzyme wie den Matrixmetalloproteinasen (MMP) beeinträchtigen und in Endothelzellen Apoptose induzieren kann [21]. Resultat war eine Inhibition der Angiogenese in der CAM mit dem Vorteil, dass nur das Wachstum neuer Blutgefäße verhindert wurde ohne die zuvor bestehenden Gefäße merklich zu beeinflussen. Darüber hinaus blockierte die Unterdrückung neuer Gefäße

nicht nur das Tumorwachstum, sondern führte sogar in manchen Fällen zu einer Tumorregression [19; 20; 21; 22]. Histologisch waren nach dem Einsatz von $\alpha\beta 3$ -Antagonisten nur noch wenige oder gar keine vermehrungsfähigen Tumorzellen nachweisbar [19; 20; 21; 22].

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Expression der Integrine $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$ auf dem mikrovaskulären Endothel mit der Aggressivität des Neuroblastoms sowie mit dem Metastasierungspotential von Melanomzellen korreliert werden kann [73].

Die therapeutischen Möglichkeiten dieser gegen α -Integrine gerichteten Antagonisten werden zur Zeit in klinischen Prüfungen der Phasen I und II bei Tumoren im Spätstadium (Melanom, Gliome) untersucht. Z. B. hat der gegen $\alpha\beta 3$ -Integrin humanisierte monoklonale Antikörper LM 609 (Vitaxin) die Prüfung der Phase I erfolgreich beendet. Von 14 ausgewerteten Patienten zeigten 8 einen Stillstand des Tumorwachstums und einige sogar eine objektiv messbare Tumorremission. Entscheidend allerdings war, dass in keiner Dosierungsstufe Nebenwirkungen auftraten. Diese klinischen Daten spiegeln im Wesentlichen die Wirkungen wider, die in den experimentellen Tiermodellen erhoben worden waren [20; 21; 22]. Gegenwärtig werden klinische Studien der Phase II bei Tumorerkrankungen durchgeführt, um die Wirkungen von LM 609 weiter zu erforschen.

- B) Immobilisierte natürliche und künstliche Integrinliganden können die Migration und die Adhäsion von Integrin-exprimierenden Zellen auf Oberflächen stimulieren [107]. Es wird ein Ausbreiten der Zelle bewirkt, was ihr eine Polarität verleiht, wodurch die Zelle überlebt und proliferiert. Durch den Integrinliganden erhält die Zelle das gleiche Signal wie durch die EZM-Proteine. Besonders in der Implantationsmedizin ist dies von großem Interesse. Die natürlichen Fremdkörperabwehrreaktionen sollen minimiert werden, wodurch ein guter Gewebe-Implantat-Kontakt und ein schnelleres und besseres Einwachsen der Implantate in das Gewebe ermöglicht wird. Dieses Konzept scheint nach ersten *in vivo* Untersuchungen ein vielversprechender Beitrag zur Entwicklung klinisch relevanter bioaktiver Implantate zu sein [107].
- C) In einem relativ jungen Ansatz werden Integrinliganden nicht als Effektoren, sondern zum gezielten Transport verschiedener Funktionalitäten zu Integrin-

überexprimierenden Zellen verwendet (*targeting*). Auf diesem Gebiet werden RGD-Peptid-Konjugate mit Kontrastmitteln oder Radiotracern für bildgebende Verfahren in der Tumordiagnostik zur Bestimmung von Wachstumsgeschwindigkeit und Metastasenbildung von malignen Tumoren (*tumor imaging*) oder Konjugate mit DNA-Derivaten zum Gentransfer erforscht [89].

3.2. Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen

Der Begriff Zelladhäsion beschreibt alle Formen zellulärer Kommunikation, die durch direkten Kontakt von Zellen untereinander (Zell-Zell-Adhäsion) oder durch Wechselwirkung von Zellen mit der sie umgebenden EZM (Zell-Matrix-Adhäsion) gekennzeichnet sind.

Adhäsive Kontakte von Zellen steuern das Zellverhalten und die Zellentwicklung (z. B. Adhäsion, Migration, Maturation, Differenzierung und Zellüberleben) [25]. In mehrzelligen Organismen spielen sie eine entscheidende Rolle beim Erhalt und der Neubildung verschiedener Gewebsstrukturen und sind unter anderem bei Embryogenese, Hämostase, Wundheilung und Immunantwort [25], aber auch bei pathologischen Prozessen wie tumorinduzierter Angiogenese, Tumormetastasierung, Thrombose, Osteoporose, Retinopathie, Arthritis und akutem Nierenversagen von Bedeutung [113; 176].

Zelladhäsion wirkt sowohl auf der Ebene funktioneller makroskopischer Prozesse als auch auf dem Niveau molekularer Mechanismen [113; 176]. Diese Interaktionen besitzen einerseits eine mechanische Funktion, die für die Elastizität und Zugfestigkeit, also für Gewebeintegrität, sowie die Zellwanderung von Bedeutung sind. Andererseits spielen sie eine wichtige Rolle bei Signaltransduktionsprozessen [113; 176].

Die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen werden durch Proteine der Zelloberfläche, sog. Zelladhäsionsrezeptoren, vermittelt, die in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden können: Integrine, Selektine, Cadherine und Immunglobulin- (Ig-) Superfamilie [25; 113].

Dabei bilden Integrine die größte und vielseitigste Rezeptorfamilie. Sie werden auf praktisch allen Zellen in unterschiedlicher Art und Weise exprimiert und werden bereits früh während der Embryonalentwicklung benötigt (ausführlich unter 3.1.) [117; 118; 176].

Selektine sind Lektin-artige Rezeptoren, die heterotypische Zell-Zell-Adhäsionen durch Bindung an sialylierte Glykane vermitteln. Sie werden auf Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert. Während entzündlicher Prozesse initiieren Selektine die Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen, dem das Auswandern der Zellen aus dem Blut ins Gewebe folgt [25; 113].

Cadherine sind homotypische Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle, die in spezialisierten Membranbereichen wie der Zonula adherens oder den Desmosomen von Epithelzellen, lokalisiert sind. In der Zonula adherens bilden sie enge Zell-Zell-Verbindungen, welche als selektive Diffusionsbarrieren dienen. In diesen Kontaktstellen stehen sie mit dem Zytoskelett in Verbindung. Sie sind essentiell für die Entwicklung und den Erhalt von Gewebestrukturen, vor allem von epithelialen Interaktionen [25; 113].

Die Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Familie (Ig-CAMs) besitzen eine oder mehrere Ig-Domänen. Sie vermitteln sowohl homotypische Interaktionen, wie z. B. Interaktionen bei der neuronalen Differenzierung, als auch heterotypische, wie sie bei den Adhäsionsrezeptoren im Immunsystem vorkommen [25; 113].

Spezialformen der Zell-Zell-Interaktionen stellen die *tight junctions* und *gap junctions* dar. *Tight junctions* werden durch epitheliale Zellverbände ausgebildet und ermöglichen die vollständige Versiegelung der Zellzwischenräume. Diese Art der interzellulären Wechselwirkung ist z. B. für die Auskleidung des Dünndarms von Bedeutung. *Gap junctions* zeichnen sich durch spezielle Verknüpfungsstellen zwischen den Zellmembranen aus, die eine kleine Lücke aufweisen und so einen Stoffaustausch zwischen den Zellen ermöglichen. So wird beispielsweise durch den Austausch von als second messenger wirkender Substanzen eine effiziente hormonelle Stimulierung der Zellen ermöglicht [113; 176].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Adhäsionsvorgänge nicht nur für die Aufrechterhaltung der morphologischen und funktionellen Integrität von Organen, sondern auch zur Signalübertragung genutzt werden. Dementsprechend sind Zelladhäsions-Rezeptoren nicht nur statische Haltemoleküle, sondern sie sind vielmehr als dynamische Systembestandteile für die zelluläre Organisation und Kommunikation zu sehen.

3.3. Die extrazelluläre Matrix – Aufbau, Funktion und Bedeutung

Die EZM ist ein komplexes Organell aus sezernierten Proteinen und Kohlenhydraten, das strukturelle und enzymatische Aufgaben besitzt, viele Entwicklungsantworten einschließlich der Regulation von Wachstum, Differenzierung, Wundheilung und Pathogenabwehr vermittelt und auch eine wichtige Rolle bei der Antwort auf Stresssituationen sowie bei der Anpassung auf Veränderungen in der Umgebung des Organismus spielt. Sie versorgt Zellen mit biologischen Informationen und bildet ein mechanisches Gerüst für Adhäsion und Migration [11].

Die EZM besteht aus verschiedenen Strukturen, welche die spezielle Histoarchitektur eines jeden Organs bestimmen. Traditionell werden die überwiegend durch Fibroblasten gebildeten Bestandteile der EZM in Kollagene, Glykoproteine und Proteoglykane eingeteilt, wobei eine Abgrenzung der einzelnen Strukturen untereinander oft schwierig ist.

Kollagen, die häufigste EZM-Komponente, lässt sich mittlerweile in 17 Subtypen gliedern [11; 142]. Es handelt sich dabei um homo- und heterotrimere Moleküle, welche aus verschiedenen α -Ketten bestehen. Mehr als 34 verschiedene α -Ketten sind bis jetzt sequenziert worden [11; 142]. Die Sequenz der verschiedenen α -Ketten beinhaltet eine variable Anzahl des Gly-X-Y-Motivs, welche die so genannten kollagenen- und nicht-kollagenen Domänen verschiedener Länge und Lage bilden. Die kollagenen Domänen dreier homo- oder heterologer α -Ketten sind zu einer dreisträngigen Helix-Struktur gefaltet, die den Kollagenen ihre Grundstruktur gibt [11; 142]. Aufgrund der Eigenschaft von Kollagenen sich zu hochorganisierten Polymeren zusammenzulagern, kann man sie in fibrillen- (Kollagen I, II, III, V und XI) und nichtfibrillenbildende Kollagene einteilen. Hauptvertreter der fibrillenbildenden Kollagene ist Kollagen I, das sich in Haut, Sehne, Knochen und Kornea findet und dort ca. 89 - 99% aller Kollagenarten ausmacht [11; 142]. Die am häufigsten gefundene Struktur in Basalmembranen ist Kollagen IV, welches keine Fibrillen sondern ein zweidimensionales Netz bildet [11; 142].

Ein weiterer Bestandteil der EZM sind Glykoproteine. Glykoproteine formen Netzwerke und sind sowohl im Bindegewebe als auch in Basalmembranen vertreten. Sie steuern die Anordnung weiterer Komponenten der EZM sowie die

Anheftung der Zellen an die Matrix und beeinflussen Gestalt und Bewegung der Zellen [11]. Einer der bekanntesten Vertreter ist Fibronectin (FN) (Abb.7).

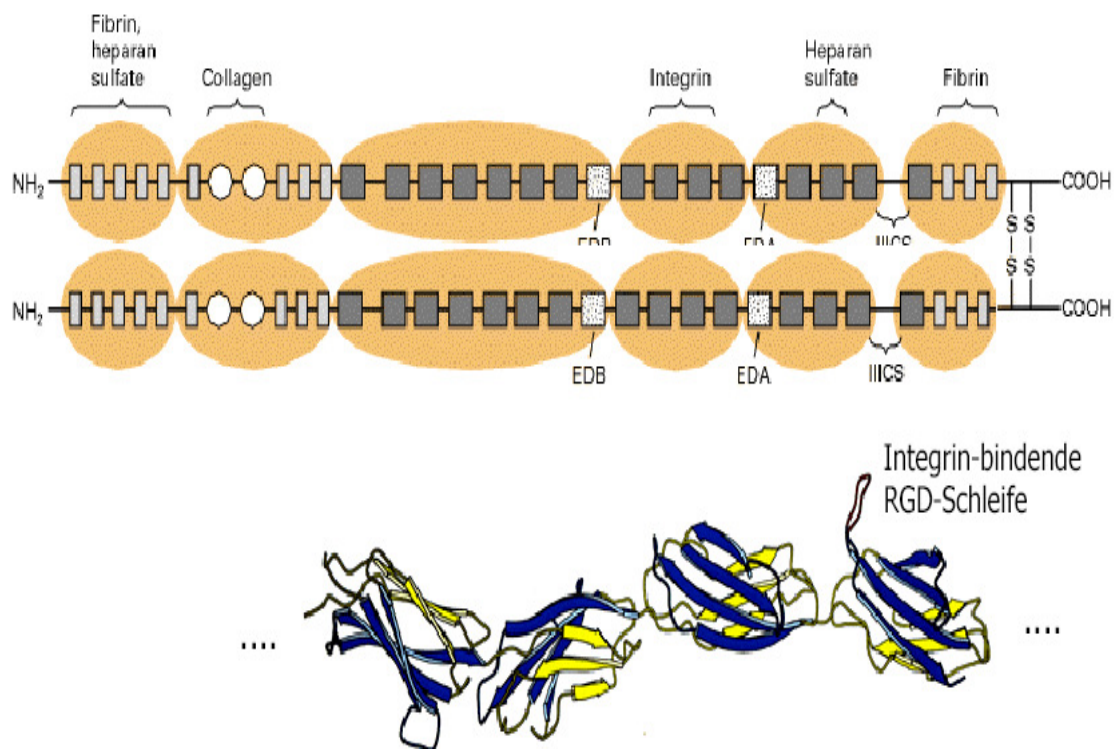


Abb. 7: Fibronectinmolekül

Dargestellt ist ein Fibronectinmolekül mit Domänenstruktur und den Bindungsstellen für Kollagen, Integrine, Fibrin und Heparansulfat. Fibronectine sind Dimere; jede Kette besteht aus etwa 2.500 AS. Durch alternatives Spleißen existieren viele Variationen. In der AS-Sequenz von Fibronectin lassen sich 3 repetitive Homologien, bestehend aus verschiedenen Motiven, erkennen, welche bis zu 6 Domänen bilden können, die für die spezifischen Bindungsstellen des Fibronectinmoleküls verantwortlich sind (modifiziert nach Lodish et al (2001) [139]).

FN hat ein Molekulargewicht von 440 – 550 kDa und spielt bei zellulären Haftprozessen wie Zellwanderung und Wundheilung eine wichtige Rolle. Es handelt sich bei FN um ein Dimer, das aus zwei durch Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten besteht. In der AS-Sequenz von FN lassen sich drei wiederholende, aus so genannten Motiven bestehende Homologien erkennen: 12 Motive der Typ I Homologie (FN I), 2 Motive der Typ II Homologie (FN II) und 15 –

17 Motive der Typ III Homologie (FN III) konnten bis jetzt nachgewiesen werden [11; 139; 142]. Diese Homologien bilden im FN-Molekül bis zu sechs Domänen, welche für die spezifische Bindung an Zellrezeptoren verantwortlich sind [11; 139] (Abb. 7). FN-Moleküle nehmen eine β -Faltblatt Struktur ein, können diese aber bedarfsweise ändern [11; 139]. FN polymerisiert zu Fibrillen, welche durch Disulfidbrücken stabilisiert werden. Diese Fibrillen können sich mit Kollagenstrukturen zusammenlagern und tragen so zur Stabilität der Matrix bei [11; 139]. Bis heute sind 20 Fibronektine bekannt, die durch alternatives Spleißen des RNA-Transkripts aus einem FN-Gen entstehen [11; 139; 142].

Ein weiterer Bestandteil der EZM sind Glykosaminoglykane, bzw. in Verbindung mit Proteinen, so genannte Proteoglykane. Typische Vertreter sind Hyaluronsäure, Fibromodulin und Agrin [11; 142]. Sie sind wichtige Bestandteile der EZM, agieren als Verbindungsstücke zwischen Kollagenen und Glykoproteinnetzwerken und tragen somit erheblich zur Regulation, Stabilisierung und Hydratation der EZM bei [11].

Jede EZM unterliegt einem ständigem Umbau. Kommt es zu Störungen in der Bildung oder in der Aufrechterhaltung der EZM, können mannigfaltige Krankheitsbilder entstehen.

3.4. Apoptose

3.4.1. Mechanismen des programmierten Zelltodes

Apoptose ist ein zellulärer Mechanismus, der essentiell für die Regulation der Zellzahl eines Organismus ist. Die Auslösung des apoptotischen Programms hat einen kontrollierten Selbstzerstörungsprozess der betroffenen Zelle zur Folge. Der Begriff Apoptose wurde 1972 zum ersten Mal von *Kerr et al.* [126] verwendet, um eine bestimmte Zellmorphologie zu beschreiben, die sich deutlich vom nekrotischen Zelltod unterscheidet [126]. Dabei handelt es sich um ein evolutionär konserviertes Prinzip, das zu solch archaischen Organismen wie dem Wurm *Caenorhabditis elegans* und wahrscheinlich noch älteren Organismen wie Schleimpilzen und sogar Bakterien zurückverfolgt werden kann.

Apoptose ist durch mehrere äußere Merkmale gekennzeichnet. Die Zellen schrumpfen merklich und zeigen blasenartige Ausstülpungen in der Zellmembran bis hin zur Bildung von so genannten *apoptotic bodies* [126]. Im Zuge des apoptotischen Programms kondensiert das im Zellkern befindliche Chromatin und

wird kontrolliert zu Stücken von rund 180 Basenpaaren oder deren Vielfaches fragmentiert. Der Zellkern löst sich auf [72]. In der Endphase der Apoptose werden die *apoptotic bodies* schließlich von Makrophagen oder anderen phagozytosefähigen Zellen aufgenommen [75]. Ziel dieses geordneten Prozesses ist die Eliminierung potentiell schädlicher Zellen. Darunter fallen unter anderem Zellen mit beschädigter DNA oder Zellen mit Virusbefall, aber auch „normale“ Zellen während der Embryogenese, während der Reifung der T-Zellen im Thymus sowie während Anpassungsprozessen im späteren Leben. Daher ist es nicht verwunderlich, dass fehlgesteuerte Apoptose direkt mit einer Vielzahl von Krankheitsbildern verbunden ist. Ein Übermaß an Apoptose wurde in Zusammenhang mit neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer, multipler Sklerose und Parkinson beobachtet. Auch bei AIDS und Infarkten kann Apoptose zum Krankheitsbild beitragen [168]. Sind durch Apoptose wesentliche Komponenten des Immunsystems geschwächt, kann es zu vermehrten Infektionen, beispielsweise mit Herpes- oder Adenoviren, kommen. Zuwenig Apoptose kann dagegen zu einer verstärkten humoralen Immunantwort und Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematosus führen, da autoreaktive Lymphozyten nicht ausreichend eliminiert werden. Auch Krebs ist ein mögliche Folge reduzierter Apoptose [168]. Häufig werden transformierte Zellen dem Organismus durch Apoptose entzogen, so dass es gar nicht erst zur Manifestation einer Neoplasie kommt. Ist die Apoptoserate in einem Gewebe jedoch erniedrigt, z. B. durch Überexpression des Apoptoseinhibitors Bcl-2, steigt die Wahrscheinlichkeit der Tumorbildung. Vermutlich ist dies durch die Verlängerung der Lebensspanne der Zellen bedingt, die zudem den Erwerb weiterer onkogener Mutationen wahrscheinlicher macht [168].

Aufgrund dieser breitgefächerten Rolle der Apoptose besitzen die beteiligten Moleküle und das Verständnis ihrer Funktion eine große Bedeutung als Ansatzpunkte für die Entwicklung neuartiger Therapieoptionen [169] (siehe auch unter 3.3.).

3.4.2. Caspasen – zentrale Proteasen in der Induktion und Ausführung des apoptotischen Prozesses

Um von der Entscheidung, eine Zelle zu eliminieren, oder vielmehr die Zelle zur Eigenelimination zu bewegen, bis hin zur kontrollierten Entsorgung der

Zellfragmente, sicher zustellen, dass dieser Prozess streng in einer Richtung abläuft, muss eine genaue molekulare Regulation gewährleistet sein. Andernfalls könnten „halbtote“ Zellen entstehen, die das Potential zu maligner Transformation und somit unkontrollierter Proliferation in sich bergen. Analog zu anderen Prozessen, die eine zielgerichtete Signaltransduktion benötigen, wie die Blutgerinnung oder das Komplementsystem, spielt in der Auslösung und Ausführung des apoptotischen Programms eine Kaskade aus Proteasen, den Caspasen (*cysteine-dependent aspartate specific protease*), eine Schlüsselrolle [13; 15]. Durch Aktivierung dieser Caspasen-Signalkaskade wird eine lawinenartige Verstärkung des initialen Signals erreicht, wodurch die irreversible Zerstörung der Zelle eingeleitet wird.

Bei den Caspasen handelt es sich um Cysteinproteasen [13; 15]. Ihren Namen haben sie von ihrer Präferenz zur Spaltung einer AS-Sequenz nach einem Aspartatrest an der Position P1 [15]. Sie werden zunächst als Zymogene (Procaspasen) translatiert und erfahren im Zuge eines apoptotischen Signals eine Aktivierungsspaltung.

Caspasen werden nach ihrer Primärstruktur bzw. Domänenanordnung sowie Funktion in drei Klassen eingeteilt (Abb. 8). Die Caspasen 4 und 5 zeigen Homologie zur Caspase 1. Diese drei Caspasen sind nicht direkt in die Apoptose involviert, sondern werden zu den so genannten inflammatorischen Caspasen gerechnet, die an der Cytokin-Aktivierung beteiligt sind [36]. Die anderen beiden Caspasen-Klassen umfassen die Initiator- und die Effektor-Caspasen. Vertreter der Initiator-Caspasen sind Caspase 8 und 9, deren Aufgabe es ist, die nachgeschalteten Effektor-Caspasen (Caspase 3, 6 und 7) zu aktivieren [36]. Die Effektor-Caspasen spalten dann spezifisch eine Anzahl von Proteinsubstraten, was letztendlich den apoptotischen Phänotyp der Zelle zur Folge hat [36].

Die Caspasen 2 und 10 werden aufgrund ihrer Homologie zu den Initiator-Caspasen gerechnet, obwohl ihre exakte Funktion noch nicht vollständig erfasst ist. Die Klassifizierung von Caspase 14 ist derzeit noch unklar [36].

Der allgemeine Aufbau von Caspasen ist in Abb. 8 dargestellt.

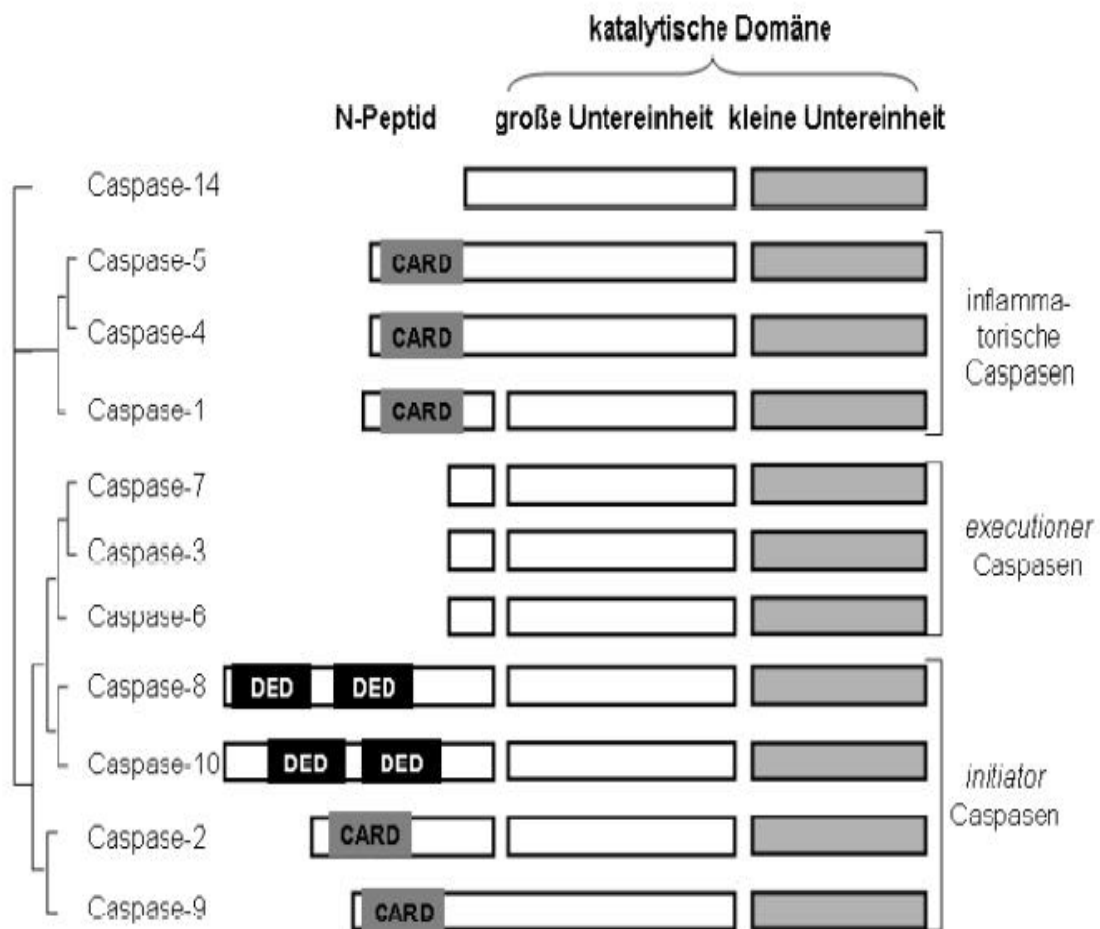


Abb. 8: Humane Caspasen

Gezeigt ist die Domänenstruktur und Verwandtschaft bzw. Klassifizierung der Caspasen. Die sequentielle Verwandtschaft ist durch Klammern (links) dargestellt. Die funktionelle Einteilung in inflammatorische, Effektor- und Initiator-Caspasen ist rechts im Bild gekennzeichnet. Caspasen bestehen aus einem „N-Peptid“, dessen Länge von 22 bis über 200 AS zwischen den Caspasen variiert, und der eigentlichen katalytischen Domäne, die in der Regel ca. 250 Reste umfasst. Das N-Peptid kann aus mehreren Adapterdomänen, wie DEDs (*death effector domains*) oder CARDs (*caspase activator recruitment domains*) bestehen oder, wie im Falle der Effektor-Caspasen, nur eine Länge von wenigen AS aufweisen. Im Zuge der Zymogenprozessierung kommt es zur Abspaltung des N-Peptids (außer bei Caspase 9 und 14) und zur eigentlichen Aktivierungsspaltung in der katalytischen Domäne, so dass eine große und eine kleine Untereinheit entstehen (verändert nach Stennicke and Salvesen (1998) [197], Shi (2002) [194] sowie Zimmermann et al (2001) [229]).

Alle Caspasen besitzen ein N-Peptid, das im Zuge der Reifung abgespalten wird [194; 197; 229]. Dieser N-terminale Abschnitt kann Adapterdomänen wie DEDs (*death effector domains*) oder CARDs (*caspase activator recruitment domains*) enthalten, oder wie bei den Effektor-Caspasen nur aus einem relativ kurzen Sequenzabschnitt bestehen [36; 194; 197; 229]. Die Funktion des N-Peptids besteht im Falle der inflammatorischen und Initiator-Caspasen in der Bindung der Caspase zu anderen Faktoren [36], so sind z. B. die DEDs der Caspase 8 für die

Bindung an die so genannten „Todesrezeptoren“ (siehe unten) nötig. Die Rolle der kurzen N-Peptide der Effektor-Caspasen ist noch nicht abschließend geklärt. Erste experimentelle Ergebnisse scheinen zumindest für Caspase 7 auf eine Funktion in der subzellulären Lokalisation der Caspase hinzuweisen [36; 229].

Dem N-Peptid folgt die eigentliche Proteasedomäne mit einem Molekulargewicht von rund 30 kDa. Im Rahmen der Zymogenprozessierung kommt es zur Abspaltung des N-Peptids, was nur eine geringe [197] oder keine Auswirkung auf die Aktivität der Caspasen hat [194; 197; 229], und zur eigentlichen Aktivierungsspaltung in der katalytischen Domäne, so dass eine große (20 kDa) und eine kleine (10 kDa) Untereinheit entstehen [194; 197].

Da die Caspasen Schlüsselenzyme der Apoptose sind, unterliegen sie strengen Kontrollmechanismen. Zum einen bedingt ihre molekulare Struktur die Lokalisation und Bindung an andere Faktoren. Zum anderen wird ihre katalytische Aktivität genau kontrolliert, was auf zweierlei Art und Weise erfolgen kann:

- a) Caspasen werden als Zymogene exprimiert und unterliegen einer Aktivierungsspaltung [194].
- b) Bereits aktivierte Caspasen können inhibiert werden, was durch Mitglieder der IAP-Familie (*inhibitor of apoptosis protein*) bewerkstelligt werden kann [179]. Diese Caspase-Inhibition kann allerdings durch den erst kürzlich identifizierten Faktor Smac (*second mitochondrial activator of caspases*) [71] bzw. sein murines Homolog DIABLO (*direct IAP binding protein with low pI*) [215] aufgehoben werden.

3.4.3. Regulation der Apoptose

Apoptose ist ein zentraler, aber auch fataler Prozess für die Zelle. Daher unterliegt das apoptotische Programm einer komplexen Regulation durch distinkte Signale und Signalwege. Ein diesen Signalwegen gemeinsames Prinzip ist die Ausbildung eines zytosolischen Signaltransduktionskomplexes DISC (*death-inducing signaling complex*), an die sich eine kaskadenartig verstärkte Aktivierung einander nachgeschalteter Apoptose fördernder Faktoren anschließt, welche die Aktivierung der Caspasen vermitteln [62; 131].

Das apoptotische Programm kann über zwei Haupt-DISC-Signalwege eingeleitet werden: Über einen extrinsischen, rezeptorvermittelten Signalweg, oder über eine intrinsische, mitochondriale Signalkaskade (Abb. 9) [62; 131].

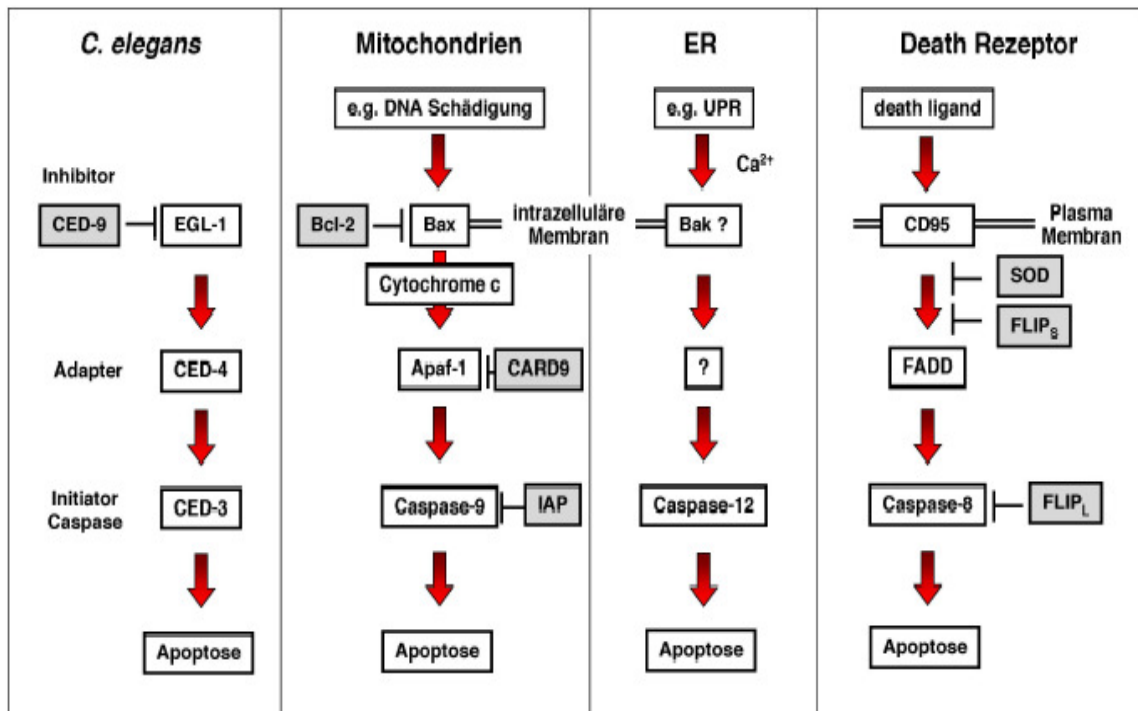


Abb. 9: Apoptose-Signalwege

Das grundlegende Konzept der Aktivierung und Hemmung der Apoptose-Signalkaskade kann evolutionsgeschichtlich bis zu arachnischen Organismen wie dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* zurückverfolgt werden. Der humane Apoptosehemmer Bcl-2 ist ein Homolog des *C. elegans* ced-9 Gens (*C. elegans* death Gen 9), das Apoptose-fördernde Bax ist ein Homolog von egl-1. Apaf-1 enthält eine Domäne mit Homologie zu ced-4 und Caspase 3 ist ein Homolog von ced-3. Die Aktivierung eines Zelltod-Effektors wie Bax führt zur Bildung eines Apoptose-induzierenden Signalkomplexes (Death-inducing signaling complex, DISC) und zur Aktivierung von Initiator-Caspasen. Bak lokalisiert besonders ausgeprägt auch im ER und kann dort Apoptose nach ER-Stress induzieren. Analog hierzu wird bei Aktivierung von Death-Rezeptoren durch die entsprechenden Liganden ein zytoplasmatischer DISC aus z. B. dem Adapterprotein FADD und der Procaspase 8 gebildet. Die Initiator-Caspasen aktivieren downstream-Caspasen, die den apoptotischen Zelltod exekutieren. Inhibitoren können diese Signalwege auf jeder Ebene inhibieren; auf der Ebene der Aktivatoren (z. B. Bcl-2), der Adapter (z. B. Bcl-2, Flip, SOD, CARD-9) bzw. auf der Ebene der Caspasen: Flip_L und IAPs [58] (modifiziert nach Kramer (2000) [131] und Daniel (2000) [62]).

Seit kurzem gibt es Hinweise, dass auch andere Zellkompartimente wie das ER Apoptose induzieren können, z. B. bei Stressreaktionen des ER im Rahmen deregulierter Entleerung des Calcium-Speichers oder massiver Akkumulation pathologischer Proteine bei Virusinfektionen oder Amyloid-Protein beim M.

Alzheimer [62]. Daneben können Zelltodsignalwege auch durch andere Organellen oder funktionelle Strukturen der Zelle aktiviert werden. Einige Hinweise deuten darauf hin, dass DNA-Schäden über Komponenten des DNA-Reparatursystems nukleäre Apoptose aktivieren.

3.4.3.1. Rezeptor vermittelte Apoptoseinduktion (extrinsischer Signalweg)

Hierbei erfolgt die Apoptoseinduktion durch die Bindung eines so genannten Todesliganden an einen Zelltod- (*Death*)-Rezeptor [15]. Diese in der Plasmamembran lokalisierten und im nicht stimulierten Zustand frei beweglichen Transmembran-Rezeptoren sind durch ihre Primärstruktur repetitiver zysteinreicher extrazellulärer Domänen charakterisiert, welche die Trimerisierung dieser Rezeptoren vermitteln und die Bindung der ebenfalls trimeren Liganden ermöglichen [8]. Zusätzlich enthalten sie im intrazellulären Teil eine als *Death-Domain* (DD) bezeichnete AS-Sequenz, welche die Bindung von signaltransduzierenden Adaptorproteinen und die Bildung des DISC vermittelt [8; 15; 41]. Gegenwärtig sind sechs *Death*-Rezeptoren bekannt: Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF-R1), CD95/Fas, TRAIL- (*TNF related apoptosis inducing ligand*) Rezeptoren DR3, 4 und 5, sowie DR6, für den noch kein Ligand identifiziert wurde (Abb. 10) [8].

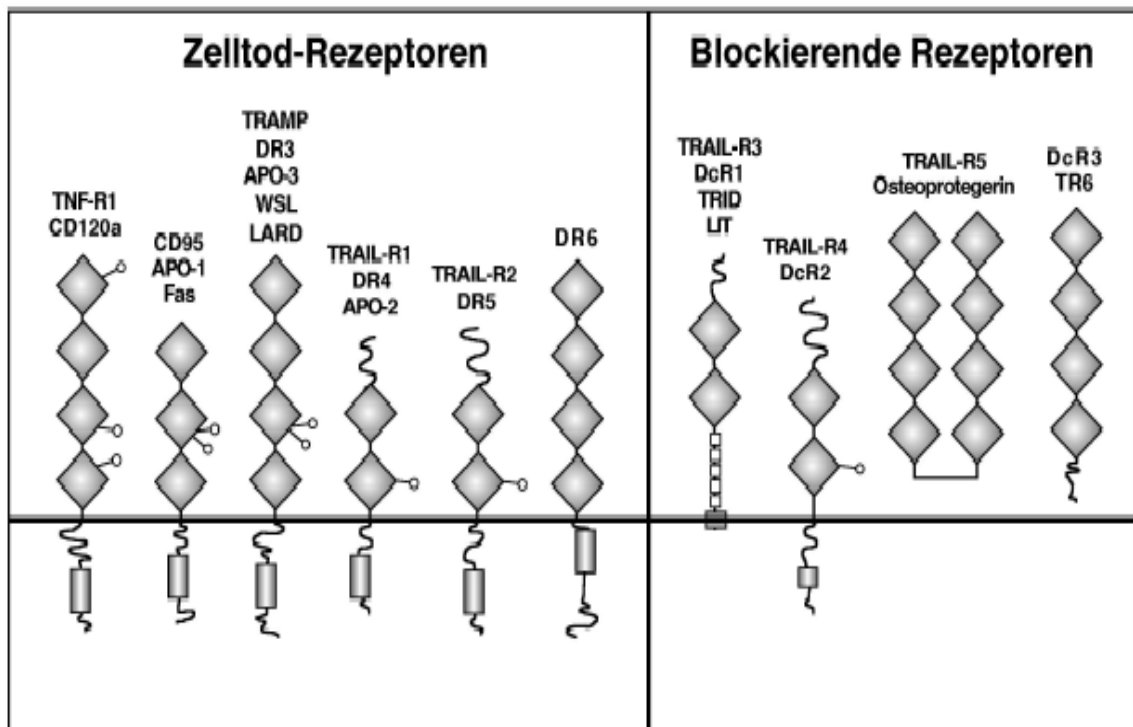


Abb. 10: Schematische Darstellung von Death-Rezeptoren und neutralisierenden Decoy-Rezeptoren

Mitglieder dieser Untergruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie sind durch ihre intrazelluläre Death-Domäne (DD) charakterisiert, die als graue Box schematisch dargestellt ist. Die zwei bis vier Boxen im extrazellulären Teil symbolisieren homologe, zysteinreiche Domänen, die für die Bindung der Death-Liganden und Trimerisierung der Rezeptoren verantwortlich sind. Den TRAIL Decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 fehlt die intrazelluläre Domäne bzw. sie enthalten nur eine trunkierte, funktionell inaktive DD. Osteoprotegerin (OPG) und DcR3 werden sezerniert und sind lösliche, nicht membranständige Moleküle. Angegeben sind die jeweils gebräuchlichen Bezeichnungen und deren Synonyme für die verschiedenen Death- und Decoy-Rezeptoren (modifiziert nach Daniel (2000) [62]).

So genannte Decoy-Rezeptoren können Liganden der *Death*-Rezeptoren binden und sequestrieren, da es sich entweder um lösliche Moleküle oder Rezeptoren ohne funktionelle zytoplasmatische DD handelt [8]. Die biologische Funktion der Decoy-Rezeptoren für die Apoptoseregulation, vor allem *in vivo* und für experimentelle Tumorthérapien mit *Death*-Liganden wie TRAIL (siehe unten), ist

noch völlig ungeklärt, insbesondere die Frage, ob hierdurch Resistenzen gegenüber diesen Apoptose-induzierenden Liganden ausgelöst werden können. Die Bindung eines entsprechenden Liganden (CD95/Fas Ligand, TNF- α oder TRAIL) vermittelt die Trimerisierung der Death-Rezeptoren und erhöht die lokale Konzentration der Rezeptoren am Ort der Liganden-Bindung [8]. Hierdurch wird die Rekrutierung des Adapterproteins FADD (*Fas associated death domain*) zur DD des Rezeptor-Oligomers vermittelt (Abb. 9 und 10) [8; 15; 62]. Die geclusterten Rezeptoren rekrutieren über FADD Initiator-Procaspasen, die hierdurch zu aktiven Caspasen prozessiert werden, wobei zunächst Caspase 8 aktiviert wird [8]. Diese verlässt den DISC, aktiviert weitere nachgeordnete Caspasen, vor allem Caspase 3, und leitet so das proapoptotische Signal weiter [8; 229].

Aktive Caspase 8 kann nicht nur direkt weitere Caspasen aktivieren, sondern aktiviert parallel dazu – wenigstens in einigen Fällen - auch den mitochondrialen Apoptoseweg und zwar durch die proteolytische Spaltung des Bcl-2-Homologs Bid, was zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium führt [15; 131]. Auf diese Weise wird nicht nur das proapoptotische Signal verstärkt, sondern es werden auch antiapoptotische Signale eliminiert, z. B. durch Ausschüttung von Smac/DIABLO aus den Mitochondrien [15; 71; 96; 97; 215].

Die rezeptorvermittelte Apoptoseinduktion kann auf verschiedenen Ebenen inhibiert werden: So können SOD-Proteine (*silencer of death domain*) die Rekrutierung von FADD hemmen. Ebenso können FLIP-Proteine (*Fas-linked inhibitory proteins*) die Bindung von Procaspase 8 (kurze und lange Spleissvariante: FLIP_S, FLIP_L) bzw. die Aktivierung der Procaspase 8 inhibieren [8; 15].

3.4.3.2. Mitochondriale Apoptoseinduktion (intrinsischer Signalweg)

Von zentraler Bedeutung für diesen Signalweg sind die Mitglieder der Bcl-2- (*B-cell lymphoma 2*) Familie. Alle Mitglieder besitzen mindestens eine der vier hoch konservierten Proteindomänen, die im prototypischen Familienmitglied Bcl-2 vorhanden sind [1]. Daher werden diese Sequenzen auch Bcl-2-Homologiedomänen (BH-Domänen) genannt [1].

Man findet sie im Zytoplasma, aber auch assoziiert an Membranen, wie die äußere Mitochondrienmembran, die äußere Kernmembran oder die Membran des

ER. Es sind bereits 15 verschiedene Mitglieder der Familie bekannt [1], die sich in zwei Gruppen unterteilen lassen, und zwar in pro- und in antiapoptotische Proteine [36]. Die antiapoptotischen Proteine umfassen unter anderem Bcl-2 sowie Bcl-XL und hemmen sowie kontrollieren die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges [1]. Im Gegensatz dazu stehen die proapoptotischen Familienmitglieder Bax (*Bcl-2 associated x protein*), Bak, Bok, Bad, Bik, Bmf, Bim, Bid und einige weitere [1], die direkt die Mitochondrien zu aktivieren vermögen (Abb. 11).

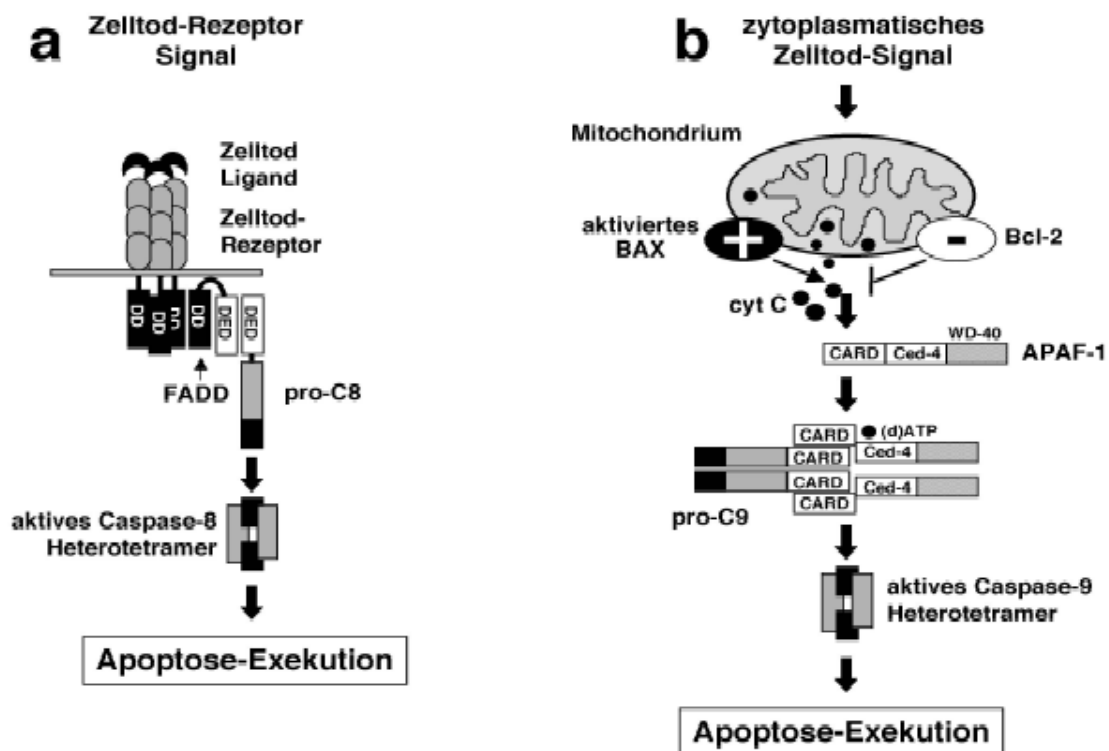


Abb. 11: Aktivierung des mitochondrialen und des Death-Rezeptor-vermittelten Apoptose-Signalwegs

a: Aktivierung von Death-Rezeptoren führt zur Bildung eines DISC. Im Fall des CD95/Fas Rezeptors führt die Bindung des trimeren Fas Liganden an ein Rezeptor-Trimer zur DISC-Bildung: das FADD-Adapterprotein wird über die Death-Domänen in CD95 und FADD rekrutiert. Dies stimuliert die Bindung von Procaspase 8 (C8) über die Death-Effektor Domäne (DED) in Pro-C8, wodurch die Aktivierung von Pro-C8 zur aktiven C8 induziert wird.

b: Der mitochondriale Apoptose-Signalweg kann z. B. über strahleninduzierte mitochondriale Schädigung aktiviert werden. Über Bax wird die Freisetzung von Cytochrom c induziert. Dies führt zur Aktivierung des Apaf-1 Adapterproteins, wodurch die Rekrutierung von Pro-C9 in den Komplex ausgelöst wird. Pro-C9 wird autokatalytisch aktiviert und die Effektor-Caspase-Signalkaskade aktiviert (modifiziert nach Belka [15] (2003) sowie nach Daniel (2000) [62]).

Der Verlust der Bax-Expression ist in den meisten Tumoren mit der Resistenz gegen zytotoxische Therapiemodalitäten verbunden [1; 36].

Der Apoptose regulierende Mechanismus der Bcl-2-Familienmitglieder ist, obwohl Bcl-2 als eines der ersten Gene in dieser Signalkaskade identifiziert wurde, immer noch nicht vollständig klar. Als gesichert gilt, dass Bax und dessen Homologe Bak und Bok direkt Mitochondrien aktivieren können, die daraufhin Cytochrom c und ATP aus dem Raum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran freisetzen. Dieser Vorgang kann durch Bcl-2 gehemmt werden [1; 15] (Abb. 11). Die Aktivierung der Mitochondrien kann hierbei in distinkte Schritte unterteilt werden:

(1) Die Konformationsänderung im N-Terminus von Bax löst die Translokation vom Zytoplasma und Insertion in die äußere Mitochondrienmembran aus. (2) Dies führt als ein sehr frühes Ereignis zur Öffnung von Kanälen und Freisetzung von Cytochrom c und ATP (3). Die Atmungskette als Energielieferant bleibt aktiv (4) [96]. Erst später kommt es durch den Einstrom zytosolischer Ionen und Wasser zum Zusammenbrechen des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) mit Anschwellen der Mitochondrien und Platzen der äußeren und später auch der inneren Membran und letztlich (5) dem Zusammenbrechen der Atmungskette [15; 96; 97; 169]. Die Bildung dieser Kanäle ist noch nicht ganz klar. Sowohl für Bcl-2 als auch Bax konnte gezeigt werden, dass diese Proteine nicht nur über die BH-Domänen dimerisieren, sondern auch oligomerisieren können, um selbst Kanäle zu bilden [1; 195]. Neben dieser Kanalbildung regulieren Bcl-2 und Bax aber auch spannungsabhängige mitochondriale Kanäle, die in der äußeren Membran durch das VDAC-Protein (*voltage dependent anion channel*) und in der inneren Membran durch das ANT-Protein (Adenin-Nukleotid Transporter) gebildet werden [195]. Die Aktivität dieser Kanäle kann durch den peripheren Benzodiazepin-Rezeptor, der auch in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert ist, reguliert werden, was bei der Entwicklung neuer Therapiekonzepte eine wichtige Rolle spielen könnte [18] (siehe unter 3.4.7.).

Das nun freigesetzte Cytochrom c bindet an das Verbindungsprotein Apaf-1. Gemeinsam mit der Bindung von ATP bzw. dATP an Apaf-1 wird eine Konformationsänderung in Apaf-1 ausgelöst, wodurch seine CARD-Domäne exponiert wird [96]. Dies ermöglicht die Bindung der Procaspase 9. Dadurch entsteht der DISC, der einem Multiproteinkomplex aus Cytochrom c, Apaf-1, dATP/ATP und Procaspase 9 entspricht, und früher auch als „Apoptosom“ bezeichnet wurde [62; 131]. Dieser DISC führt zur autokatalytischen Aktivierung

von Caspase 9. Aktive Caspase 9 wiederum aktiviert durch limitierte Proteolyse die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 und leitet hiermit die Exekution der Apoptose ein [15; 96; 97; 196].

Neben Cytochrom c werden noch weitere Proteine aus den apoptotischen Mitochondrien freigesetzt:

(1) AIF (*apoptosis inducing factor*), der in den Zellkern transloziert und dort eine Caspase-unabhängige DNA-Fragmentierung in hochmolekulare Fragmente auslöst [141].

(2) Smac/DIABLO, das die Aktivierung der anti-apoptotischen IAPs hemmt und hierdurch die Exekution der Apoptose verstärkt [71; 215].

(3) HSP10, das anti-apoptotische Funktion hat und die Aktivierung der Procaspase 9 hemmt.

Darüber hinaus kann der mitochondriale Weg der Apoptoseinduktion auch durch reaktive Sauerstoffintermediate aktiviert werden, die direkt die Öffnung der Kanäle in den Mitochondrien bewirken. Auch γ - und UV-Strahlung sowie zahlreiche Chemikalien aktivieren diesen Weg, unter anderem durch Bildung proapoptotisch wirkender reaktiver Sauerstoffintermediate oder indirekt durch Aktivierung des Tumorsuppressors p53 [15]. Dieser wird durch DNA-Schädigung, Hitzeschock oder oxidativem Stress aktiviert und veranlasst entweder einen Proliferationsstopp, und damit einhergehend die Reparatur der entstandenen Schäden, oder er induziert über den mitochondrialen Weg Apoptose [15]. Dabei ist seine Funktion als Transkriptionsfaktor, nicht aber sein Einfluss auf die Zellzyklusregulation relevant [15]. Wesentliches Zielprotein für die p53-vermittelte Transkription ist Bax, welches dann über die oben geschilderten Mechanismen die Apoptosekaskade in Gang bringt. Über die Aktivierung von Bax wirken auch Ceramide apoptoseinduzierend, nachdem sie strahleninduziert freigesetzt wurden [15].

Auch Effektor-Caspasen können Mitochondrien für die Apoptoseinduktion aktivieren: So aktiviert das von zytotoxischen T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen ausgeschüttete Granzym B, nachdem es in die Zielzelle gelangt ist, Caspase 3, welche dann die Aktivierung der Mitochondrien bedingt [15].

3.4.3.3. Gemeinsame Endstrecke des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweges – Exekution des apoptotischen Zelltodes

Die Effektor-Caspasen aktivieren weitere Proteasen, wodurch eine Vielzahl regulatorischer und struktureller Proteine inaktiviert wird, die für die Aufrechterhaltung der Integrität und für das Überleben der Zellen von Bedeutung sind. Insbesondere werden Zytoskelett, Kernmembran und andere Strukturproteine zerstört. Zudem aktivieren Caspasen durch proteolytische Spaltung auch anti-apoptische Proteine zu pro-apoptischen Faktoren, so kann Caspase 3 Bcl-xL zu einem Molekül mit Bax-ähnlicher Wirkung aktivieren [1; 36]. Zusätzlich werden Inhibitoren von Endonukleasen gespalten und Endonukleasen werden zu aktiven DNasen, welche die genomische DNA in oligonukleosomale, etwa 180 Basenpaare oder deren Vielfaches messende DNA-Fragmente zerschneiden [72]. Die Zerstörung der Kernmembran und die Aktivierung von Chromatin-spaltenden DNasen führt zur Kondensation des nukleären Chromatins. Die Zerstörung des Zytoskeletts hat die Bildung der *apoptotic bodies* durch Abschnürung von Zellanteilen zur Folge, was auch als Zeiose oder *Blebbing* bezeichnet wird [126]. In der Spätphase der Apoptose kommt es zur Depletion des ATP-Pools und hierdurch zur Inaktivierung von ATP-abhängigen Pumpen. Dies führt zur Vakuolisierung von Zellorganellen [126]. Mitochondrien und ER schwellen an [81; 126]. Die von innen heraus degradierte Zelle kann nun von umliegenden Phagozyten wie Gewebemakrophagen eliminiert werden [75], was *in vivo* sehr rasch erfolgt.

Allerdings kann Apoptose je nach Zell- und Gewebetyp sehr unterschiedlich exekutiert werden und auch die Morphologie ist somit nicht einheitlich. Selbst Charakteristika wie oligonukleosomale DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation sind nicht zwingend obligat.

3.4.4. Klinischer Ausblick – proapoptische therapeutische Substanzen in der Tumorthherapie

Nahezu alle nicht chirurgische Tumorthapien basieren auf dem Prinzip, Apoptose oder Zellzyklus-Arrest in Tumorzellen auszulösen.

Ziele gegenwärtig neuer Therapieansätze sind daher unter anderem, Apoptose in Tumorzellen zu induzieren. Die immer genauer werdende Kenntnis der molekularen Grundlagen liefert dabei neue, erfolgversprechende Ansätze:

- (1) Einige Strategien zielen auf die Entwicklung niedermolekularer, pharmakologischer Substanzen, die mit den Zelltodsignalwegen interagieren. Die großen Hoffnungen, mit Tumornekrosefaktor (TNF- α), dem Prototyp eines Zelltod auslösenden Transmitters, direkt Tumoren behandeln zu können [15], wurden enttäuscht. Zu groß waren die systemischen Nebenwirkungen [15]. Im Unterschied zur Situation bei TNF- α wurde nachgewiesen, dass TRAIL, ein verwandtes Molekül aus dieser Familie, in vielen Tumorzelllinien Apoptose induziert, jedoch zu keinerlei Toxizität in Normalgeweben führt [15]. Als besonders TRAIL-sensitive Zelllinien haben sich dabei verschiedene Darm-, Lungen-, Mamma-, Nieren-, ZNS- und Hauttumorzelllinien erwiesen. Ob der Einsatz beim Menschen sinnvoll ist, müssen weitere Studien zeigen und bestätigen, derzeit werden Studien an Primaten durchgeführt.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte eine weitere therapeutische Option bezüglich TRAIL auf. Fulda et al. konnten nachweisen, dass die Blockade der Apoptose durch das Smac-Protein aufgehoben und damit die Resistenz von Tumoren gegenüber zytostatischen Therapien überwunden werden kann [87]. Smac sensibilisiert resistente Tumoren für zelltodauslösende Moleküle wie TRAIL. Die zellgängigen Smac-Peptide sind imstande, die Wirksamkeit von TRAIL gegenüber verschiedenen Tumoren entscheidend zu verstärken [87]. Durch Experimente in einem Tumormodell für Gliome an der Maus *in vivo* wurde die Wirkung des kombinierten Einsatzes von Smac-Peptiden und TRAIL belegt [87]. Es konnte eine vollständige Vernichtung des Tumors bei den Versuchstieren herbeigeführt werden, ohne große toxische Nebenwirkungen zu induzieren. Alle Mäuse überlebten die Therapie [71; 87].

- (2) Andere Strategien zielen auf die Inaktivierung von Bcl-2, z. B. durch Antisense-Oligonukleotide, die aktuell bereits in klinischen Studien bei Patienten mit B-Zell-Lymphomen und malignen Melanom evaluiert werden [129]. Grundlage dieser Strategie ist die Bcl-2-Antisense-mRNA G-3139 (5`-d(thio)TCT-CCC-AGC-GTG-CGC-CAT-3`), welche den *open reading frame* der Bcl-2-mRNA blockiert. Dadurch wird das Gleichgewicht zwischen den pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie zugunsten der proapoptotischen verschoben, was eine gesteigerte Empfindlichkeit der

Zellen für apoptotische Signale zur Folge hat [129]. Bei den Studienpatienten mit malignem Melanom zeigten 43% unter der Behandlung mit G-3139 einen positiven Krankheitsverlauf. Ebenso kam es bei 43% der Patienten mit B-Zell-Lymphomen zu einer Stabilisierung und bei 14% sogar zu einer Verbesserung, inklusive Heilung der Krankheitssymptomatik, was große Hoffnungen für die Zukunft weckte [34; 35].

- (3) Weitere Therapieansätze haben die direkte Aktivierung des mitochondrialen DISC zum Ziel, durch Substanzen, die an den peripheren Benzodiazepin-Rezeptor binden und damit eine mitochondriale Permeabilitätssteigerung auslösen [18]. Eine weitere Möglichkeit zur Induktion des DISC stellen Peptide mit Sequenzhomologie zur BH3-Domäne dar, um hierdurch Bax und seine Homologen aus der inhibierenden Bindung an Bcl-2/Bcl-xL zu befreien.
- (4) Vergleichbare Ziele werden auch durch gentherapeutische Ansätze verfolgt, in denen Apoptose fördernde Gene mit Hilfe von viralen Vektoren in Tumorzellen eingeschleust werden, um diese in die Apoptose zu treiben.

Einige dieser Therapiestrategien zeigen bereits Wirksamkeit in klinischen Phase I/II Studien, und es darf mit Spannung erwartet werden, wann sich dies in verbesserten Therapie-Modalitäten im klinischen Alltag niederschlagen wird.

IV. MATERIAL

4.1. Zelllinie

Für alle Experimente wurde die humane Leukämiezelllinie HL60¹ verwendet. Diese Zelllinie wurde 1976 aus dem peripheren Blut einer 36-jährigen Patientin mit der Diagnose einer akuten Promyelozyten-Leukämie, nach der French-American-British (FAB)-Klassifikation M3 etabliert [88]. Seither wurden HL60-Zellen in vielen Publikationen als Promyelozytenleukämie repräsentierende Zelllinie bezeichnet. Mittlerweile gibt es berechtigte Zweifel an dieser Herkunft. Dalton Jr. et. al. postulierten 1988 eine Neuklassifikation der HL60-Zelllinie nach FAB als M2-Typ, welcher einer akuten myeloischen Leukämie (AML) entspricht [57]. Dies ist auch der aktuelle Standpunkt hinsichtlich der Herkunft dieser Zelllinie. Die HL60-Zellen bieten ein großes Forschungsfeld im Bereich der Leukämogenese, Differenzierung, Adhäsion und Apoptose.

Die spontane Verdopplungszeit in der exponentiellen Wachstumsphase beträgt im Mittel 25 Stunden.

4.2. Medium

Zur Kultivierung der HL60-Zelllinie diente das RPMI-1640 Medium². Folgende Zusätze komplettierten dieses zum Gebrauchsmedium:

- Fetales Kälberserum (hitzeinkubiert)² 10 %
- Nicht essentielle Aminosäuren³ 1 %
- ad 500 ml Medium
- pH 7,4
- Lagerung steril bei 4 °C

4.3. Reagenzien

4.3.1. Reagenzien für Western Blot:

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS):

- Natriumchlorid 16 g

¹ Firma ATCC (American Type Culture Collection), Rockville, MD, USA (www.atcc.org)

² Firma PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria

³ Firma GIBCO Life Technologies GmbH, Karlsruhe

-
- Kaliumchlorid 0,4 g
 - Na₂HPO₄ • 2 H₂O 2,3 g
 - KH₂PO₄ 0,4 g
 - ad 1000 ml Aqua bidest.
 - pH 7,4
 - Lagerung bei Raumtemperatur (RT)

Waschpuffer:

- PBS 200 ml
- Tween 20¹ (Polyoxyethylen (20) – sorbitan – monolaurat) 0,1 %
- ad 2000 ml Aqua bidest.
- Lagerung bei 4° C

RIPA-Lysepuffer:

Lösung 1:

- Tris-HCL (pH 7,4) 50 mM
- NP-40² 1 %
- Natrium deoxycholate 0,25 %
- Natriumchlorid 150 mM
- EDTA (Ethylendiamintetraacetat) 1 mM
- ad 50 ml Aqua bidest.
- Lagerung bei 4° C

Lösung 2:

- COMPLETE™-Proteasen-Inhibitor-Cocktail Tabletten²
- Stammlösung: 1 Tablette ad 2 ml Aqua bidest.
- Lagerung lichtgeschützt bei - 20 ° C

Lösung 3:

- Natriumorthovanadat 5 mM
- Lagerung lichtgeschützt bei - 20° C

¹ Firma Serva Feinbiochemia GmbH & Co, Heidelberg

² Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Lösung 4:

- Natriumfluorid 5 mM
- Lagerung lichtgeschützt bei - 20° C

Gebrauchslösung: Kurz vor jeder Anwendung Lösung 2 – 4 zu Lösung 1 je nach Bedarf hinzufügen.

Trenngelpuffer (4-fach Ansatz):

- Tris-Base¹ 18,17 g
- ad 100 ml Aqua bidest.
- pH 8,8
- Lagerung bei RT

Sammelgelpuffer (4-fach Ansatz):

- Tris-Base¹ 6,06 g
- ad 100 ml Aqua bidest.
- pH 6,8
- Lagerung bei RT

Elektrophorese-Auftragpuffer (Probenpuffer):

- Glycerol² 20 %
- Sammelgelpuffer 0,096 M
- 10%ige SDS- (Natriumdodezylsulfat-) Lösung² 2 %
- β -Mercaptoethanol² 5 %
- Bromphenolblau³
- ad 10 ml Aqua bidest.
- Gebrauchslösung: 4-fach, d. h. 1 Teil Probenpuffer und 4 Teile Proteinlysate
- Lagerung bei 4° C

¹ Firma Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

² Firma Merck, Darmstadt

³ Firma Serva Feinbiochemia GmbH & Co, Heidelberg

Elektrophorese-Laufpuffer:

- Glycin¹ 72,05 g
- SDS¹ 5 g
- Tris-Base 15,15 g
- ad 1000 ml Aqua bidest.
- pH 8,6
- Lagerung bei 4 ° C

Trenngel: Mengenangaben für zwei 15% ige SE 250 Hofer Vertikal-Gele:

- Trenngelpuffer (4-fach) 2,4 ml
- SDS¹ 10% 100 µl
- Aqua bidest. 2,5 ml
- Acrylamid² 15% 5,0 ml
- Ammoniumpersulfat³ 10% 100 µl
- TEMED³ (N, N, N', N'-Tetramethylethylenendiamin) 10 µl

Sammelgel: Mengenangaben für zwei SE 250 Hofer Vertikal-Gele:

- Sammelgelpuffer (4-fach) 0,9 ml
- SDS 10% 37,5 µl
- Aqua bidest. 2,25 ml
- Acrylamid 4,5% 562,5 µl
- Ammoniumpersulfat 10% 100 µl
- TEMED 5 µl

Blottingpuffer:Lösung 1: **Anodenpuffer:**

- Borsäure⁴ 3,1 g/l
- SDS 10% 4 ml
- Methanol¹ 200 ml
- ad 1000 ml Aqua bidest.
- pH 9,0

¹ Firma Merck, Darmstadt

² Firma Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

³ Firma Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

⁴ Firma Serva Feinbiochemia GmbH & Co., Heidelberg

- Lagerung bei 4° C

Lösung 2: Kathodenpuffer:

- Borsäure 3,1 g/l
- SDS 10% 4 ml
- Methanol 50 ml
- ad 1000 ml Aqua bidest.
- pH 9,0
- Lagerung bei 4° C

Blocking-Puffer:

- Magermilchpulver¹ 5 %
- in PBS gelöst

ECL™ Western blotting Detektion Reagenz²:

- Lagerung bei 4° C
- Gebrauchslösung: Detection reagent 1 und 2 zu gleichen Teilen mischen, die benötigte Menge errechnet sich aus der Größe der Membran:
 $0,3 \text{ ml ECL-Reagenzgemisch/cm}^2\text{-Membran} = \text{anzusetzende Menge Reagenz.}$

Film-Entwickler:

- GBX-Developer-Kodak³ 100 ml
- ad 400 ml Aqua bidest.
- Lagerung bei RT, lichtgeschützt im Dunkeln

Film-Fixierer:

- GBX-Fixer-Kodak³ 100 ml
- ad 400 ml Aqua bidest.
- Lagerung bei RT, lichtgeschützt im Dunkeln

¹ Firma Merck, Darmstadt

² Firma Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

³ Firma Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

BCA (Bicinchoninsäure)-Protein Assay A und BCA-Protein Assay B¹:

- Lagerung bei RT, lichtgeschützt
- Gebrauchslösung: 50 Teile Reagenz A plus 1 Teil Reagenz B

Ponceau S Lösung² für Elektrophorese:

- Lagerung bei RT

GelCode® Blue Stain Reagent³:

- Lagerung bei 4 °C

Bench Mark™ Protein Ladder⁴:

- Lagerung bei - 20° C

4.3.2. Reagenzien für DAPI- und Immunfluoreszenzfärbungen:**Ethanol³:**

- 70 % Lagerung bei RT,
- 80 % Lagerung bei - 20° C

Mito Tracker® Red CMX Ros⁵:

- 1H, 5H,11H,15H-Xantheno(2,3,4-ij:5,6,7-i`j`)-diquinolizin-18-ium, 9-(4-(chloromethyl) phenyl)-2,3,6,7,12,13,16,17-octahydro-, chlorid
(C₃₂ H₃₂ Cl₂ N₂ O) 1 mM
- gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO), Verdünnung 1:1000
- Lagerung bei - 20° C, steril, lichtgeschützt

Fluorochrom:

- 4',6-Diamidino-2-phenylindol-2 HCl (DAPI)² 10 µg/ml
- Lagerung bei 4° C

¹ Firma Pierce Biotechnologie – Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn

² Firma Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg

³ Firma Merck, Darmstadt

⁴ Firma Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe

⁵ Firma Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande

Vectashield® Mounting Medium for fluorescence¹**Mowiol 4-88 Reagent²:**

- Polyvinylalkohol mit hoher Klebekraft, gutem Bindevmögen sowie „Antibeschlageigenschaften“, Lagerung bei 4° C

4.3.3. Reagenzien für Durchflusszytometrie:**TMRE³:**

- Tetramethylrhodamine ethyl ester (C₂₆ H₂₇ Cl I N₂ O₇) 25 µM
- Gelöst in Aqua bidest., Verdünnung 1:1000
- Lagerung bei - 20° C, steril, lichtgeschützt

CaspACE™ FITC-VAD-FMK In situ Marker⁴: 5 mM

- gelöst in DMSO, Verdünnung 1:50
- Lagerung bei 4° C, lichtgeschützt

Negativkontrolle FITC⁵:

- Maus IgG1 Negativkontrolle FITC
- Lagerung bei 4° C

FACS-Flow⁶

- Lagerung bei 4° C

DMSO⁷:

- Dimethyl Sulfoxid (C₂ H₆ OS)
- Lagerung bei RT, steril

¹ Firma Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

² Firma Calbiochem® - Merck Biosciences, Darmstadt

³ Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

⁴ Firma Promega GmbH, Mannheim

⁵ Firma Serotec GmbH, Düsseldorf

⁶ Firma Becton Dickinson, Heidelberg

⁷ Firma Serva Feinbiochemia GmbH & Co, Heidelberg

4.4. Verwendetes Matrixprotein und Kontrollsubstrate

Fibronectin¹ (rein, aus Humanplasma):

- | | | |
|-------------------------------|---|--------------------|
| - Stammlösung | 1 | mg/ml |
| - Gebrauchslösung | 5 | µg/cm ² |
| - Lagerung steril bei - 20° C | | |

BSA² (Bovines Serumalbumin, Fraktion V):

- | | | |
|-------------------------------|---|--------------------|
| - Stammlösung 1 | 1 | mg/ml |
| - Gebrauchslösung | 5 | µg/cm ² |
| - Lagerung steril bei - 20° C | | |
|
 | | |
| - Stammlösung 2 | 2 | mg/ml |
| - Lagerung bei - 20° C | | |

4.5. Verwendete Antikörper

- | | | |
|---|---|-------|
| - anti-Cytochrom C ³ (monoklonal, Maus IgG 2 _b , clone 7H8.2C12) | 2 | µg/ml |
| - Verdünnung 1:1000, mit Blocking-Puffer (siehe unter 2.3.1.) | | |
|
 | | |
| - anti-Bcl-2 ⁴ (Ab-1, monoklonal, Maus, clone 100) | 5 | µg/ml |
| - Verdünnung 1:1000, mit Blocking-Puffer | | |
|
 | | |
| - anti-Bax ⁵ (P-19, sc-526, polyklonal, Hase) | 5 | µg/ml |
| - Verdünnung 1:500, mit Blocking-Puffer | | |
|
 | | |
| - anti-ILK (Integrin-linked Kinase), clone 65.1.9 ⁶ (monoklonal, Maus IgG 2 _b) | 2 | µg/ml |
| - Verdünnung 1:500, mit Blocking-Puffer | | |

¹ Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

² Firma Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

³ Firma BD Pharmingen – BD Biosciences, San Jose, CA, USA

⁴ Firma Oncogene™ research products – Merck Biosciences, Darmstadt

⁵ Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg

⁶ Firma Upstate Biotechnology, Hamburg

- anti-GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β)¹ (monoklonal, Maus IgG 1, clone 7) 250 $\mu\text{g/ml}$
- Verdünnung 1:500, mit Blocking-Puffer
- anti-Phospho-GSK-3 β -Ser 9² (polyklonal, Hase) 1 $\mu\text{g/ml}$
- Verdünnung 1:500, mit Blocking-Puffer
- anti-FAK (Focal Adhesion Kinase)³ (monoclonal, Maus IgG 1, clone 77) 250 $\mu\text{g/ml}$
- Verdünnung 1:2000, mit Blocking-Puffer
- anti- β -Actin⁴ (monoklonal, Maus) 1 $\mu\text{g/ml}$
- Verdünnung 1:2000, mit Blocking-Puffer
- anti-Maus- und anti-Hase-Sekundärantikörper⁵, IgG-HRP (*horse radish peroxidase*) konjugiert 2 $\mu\text{g/ml}$
- Verdünnung 1:2000, mit Blocking-Puffer
- CyTM2-conjugated AffiniPure Ziege anti-Hase IgG und –anti-Maus IgG⁶ 1 $\mu\text{g/ml}$
- Verdünnung 1:100, mit DMSO
- CyTM3-conjugated AffiniPure Hase anti-Maus IgG² 1 $\mu\text{g/ml}$
- Verdünnung 1:100, mit DMSO

4.6. Geräte und Hilfsmittel

- Falcon® Zellkulturflaschen⁷: 25 cm², 75 cm², 175 cm²
- Wasserbad⁸

¹ Firma Transduction Laboratories – BD Biosciences, San Jose, CA, USA

² Firma New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.

³ Firma Transduction Laboratories – BD Biosciences, San Jose, CA, USA

⁴ Firma Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

⁵ Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg

⁶ Firma Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA

⁷ Firma Becton Dickinson, Heidelberg

⁸ Firma Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach

- Begasungsbrutschrank¹
- Falcon® 96-Well Flachboden Mikrotiterplatte²
- Falcon® Röhrchen²: 15 ml, 50 ml
- 3 MM Whatman Filterpapier³
- Protran-Nitrocellulose Membran⁴
- Hyper™ECL™ Filme⁵ (18 x 24 cm)
- Objektträger (76 x 26 mm) und Deckgläschen⁶ (18 x 18 mm)
- Bestrahlungsgerät Isovolt 320/10⁷ mit Duplex Dosimeter⁸
- Durchflusszytometer (FACScan)²
- Mikrotiterplatten-Reader: Spectra max® 190⁹
- Inverses Mikroskop Axiovert 10¹⁰
- Neubauer® Zählkammer¹¹
- Laser-scan-Mikroskop¹²
- 3D- / Wipp-Schüttler¹³
- Power Supply¹⁴
- Hofer™ Dual Gel Caster¹⁵
- SE 250 Mighty Small II Mini-Vertical Elektrophorese¹⁵
- Multiphor II Nova Blot mit Graphitplatte¹³
- Kleinschüttler¹⁶
- Präzisionswaage¹⁷
- Kühlmikroliterzentrifuge 202 MK¹⁸
- Magnetrührer und Heizplatte¹⁹

¹ Firma Heraeus Instruments, Hanau

² Firma Becton Dickinson, Heidelberg

³ Firma Bender-Hobein, München

⁴ Firma Schleicher und Schuell GmbH, Dassel

⁵ Firma Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

⁶ Firma Menzel Gläser®, Gehard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co.KG, Braunschweig

⁷ Firma Seifert, Ahrensburg

⁸ Firma PTW, Freiburg

⁹ Firma Molecular Devices Ltd., Wokingham, UK

¹⁰ Firma Carl Zeiss Jena GmbH, Jena

¹¹ Firma Baacklab, Schwerin

¹² Firma LEICA Instruments & Microsystems GmbH, Wetzlar

¹³ Firma Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach

¹⁴ Firma Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

¹⁵ Firma Hofer,

¹⁶ Firma Buehler GmbH, Düsseldorf

¹⁷ Firma Satorius AG, Göttingen

¹⁸ Firma Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

¹⁹ Firma Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach

-
- Vortexer¹
 - Zytocentrifuge Cytospin 3²
 - CELLQuest Pro software³
 - ImageQuant version 5.0 software⁴
 - Sigma-Plot 2000⁵
 - Microsoft®Excel (windows XP)⁶
 - TCS NT software⁷

¹ Firma Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

² Firma Shandon-Thermo Electron GmbH, Dreieich,

³ Firma Becton Dickinson, Heidelberg

⁴ Firma Molecular Dynamics, Krefeld

⁵ Firma SPSS Science Software GmbH, Erkrath

⁶ Firma Microsoft, USA

⁷ Firma LEICA Instruments & Microsystems GmbH, Wetzlar

V. EXPERIMENTELLE METHODEN

5.1. Zellkultur

Bei der Kultivierung von Zellen unter artifiziellen Bedingungen müssen zur Gewährleistung von Vergleichsmöglichkeiten und zur Qualitätskontrolle genau definierte und standardisierte Abläufe eingehalten werden.

HL60-Zellen wurden in der Erhaltungkultur in 75 cm²- oder 175 cm²-Zellkulturflaschen (ZKF) in RPMI 1640 Medium, welches mit 10% hitzeinkubiertem fetalem Kälberserum (FCS) sowie 1% nicht essentiellen Aminosäuren versetzt war, gehalten. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gewechselt, abhängig von der Zelldichte. Dabei betrug die optimale Zellkonzentration zwischen 0,5 – 1 x 10⁶ Zellen/ml. Bei Erreichen einer Zelldichte von maximal 2 x 10⁶ Zellen/ml war ein Mediumwechsel angezeigt. Dieser erfolgte zum einen durch mikroskopische Bestimmung der Zellzahl (siehe 5.2.) und anschließender Aussaat der optimalen Zellkonzentration von 0,5 x 10⁶ Zellen/ml in 10 bzw. 30 ml frischem Medium in neue Zellkulturflaschen. Zum anderen wurde die gesamte Zellsuspension zentrifugiert (800 rpm, 4° C, 5 min), mit 1x Phosphat gepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen, die Zellzahl bestimmt und anschließend die optimale Zellmenge in frischem Medium aufgenommen und in neue ZKF überführt. Dieses Prozedere wurde bis zu einer Passage von maximal 30 durchgeführt.

Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37° C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Zur Konstanthaltung des pH-Wertes von 7,35 wurde die Atmosphäre mit 5% CO₂ angereichert.

In regelmäßigen Abständen wurden die kultivierten Zellen lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Zelluntergang oder mikrobiologischer Verunreinigung inspiziert.

Für die Versuche wurden jeweils nur Zellen verwendet, die sich in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befanden.

5.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch unter Verwendung einer Neubauer® Zählkammer. Diese Zählkammern dienen der visuellen Bestimmung

der Teilchenzahl (hier HL60-Zellen) pro Volumeneinheit einer Flüssigkeit (hier Medium).

Die mit „L“ gekennzeichneten vier Großquadrate in den Ecken sind in je 16 Quadrate unterteilt und wurden für die HL60-Zellzählung verwendet.

Dabei wurden immer vier Großquadrate ausgezählt und anschließend wurde die Zellzahl/ml nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zählergebnis}}{4} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

In der Regel folgte eine Doppelbestimmung mit Mittelwertbildung.

5.3. Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die dauerhafte Aufbewahrung vitaler HL60-Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Für die Konservierung wurden 1×10^7 Zellen nach Waschen mit 1x PBS pelletiert, in je 1 ml Kulturmedium ohne weitere Zusätze resuspendiert und mit dem je gleichen Volumen Einfriermedium in Kryoröhrchen gegeben. Nach dem Einfrieren bei -80°C wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und bei -134°C aufbewahrt.

Aufgetaut wurden die Zellen bei Raumtemperatur (RT) und sofort in 25 cm^2 ZKF überführt. Nach 24 Stunden wurden die HL60-Zellen abzentrifugiert und zweimal mit frischem Medium gewaschen, um sowohl tote Zellen und ausgetretenen Zellinhalt als auch das im Einfriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen. Anschließend wurden sie unter Standardmethoden kultiviert (siehe unter 5.1.). Um gleich bleibende Bedingungen zu gewährleisten, wurden die HL60-Zellen vor ihrer Verwendung für Versuche zunächst zweimal passagiert.

Einfriermedium: 80 % FCS (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert),
 20 % DMSO

5.4. Vorbereitung der Zellen für Experimente

5.4.1. Wachstum der Zellen in mit Fibronektin- sowie Rinderserumalbumin-beschichteten Zellkulturflaschen

Für alle nachfolgend beschriebenen Experimente wurden die HL60-Zellen gleichermaßen vorbereitet.

Für die Auswertungen wurden bei allen Versuchsansätzen $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml eingesetzt. Diese definierte Zellzahl wurde – je nach Versuchsmethode – entweder in 25 cm^2 ZKF mit 6 ml oder in 75 cm^2 ZKF mit 18 ml ausgesät. Unter optimalen Wachstumsbedingungen wurden die Zellen für 24 Stunden kultiviert. Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die Zellsuspensionen bei 800 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden verworfen und die Zellpellets – je nach ZKF-Größe – in 6 bzw. 18 ml Medium, das kein FCS enthielt, resuspendiert. Anschließend wurden diese Zellsuspensionen in mit Fibronektin- (FN-) und Rinderserumalbumin- (BSA-) beschichteten ZKF ausgesät.

Die Konzentrationen für FN und BSA betragen $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Daraufhin folgte ein einstündiges Wachstum der Zellsuspensionen auf den jeweiligen Substraten und auf Polystyrol unter optimalen Wachstumsbedingungen. Der Zeitwert eine Stunde beruhte auf empirischen Erfahrungen, die im Vorfeld in einer Reihe von Adhäsionsversuchen mit den HL60-Zellen an FN gewonnen worden sind. Anschließend erfolgte die Bestrahlung (Bestrahlungsablauf siehe unter 5.5.) und die jeweils methodenspezifische Präparation der Zellen (siehe unter 5.6. – 5.10.).

5.4.1.1. Hintergründe für den Einsatz von serumfreien Medien

Da die Zusammensetzung fetaler Kälberseren nicht genau bekannt ist, und die bekannten Inhaltsstoffe stark in ihrer Konzentration schwanken können, stellen Seren stets undefinierte Naturprodukte dar.

Um qualitative und quantitative Schwankungen sowie unkontrollierbare Interferenzen der Nährmedienbestandteile zu vermeiden, und um unter definierten und kontrollierten Bedingungen zu arbeiten, wurde beim Wachstum der HL60-Zellen auf FN und BSA auf die Verwendung von Seren verzichtet.

5.4.2. Wachstum der Zellen in unbeschichteten Zellkulturflaschen als Kontrollgruppe

Zur Kontrolle der unter 5.4.1. beschriebenen Wachstumsbedingungen auf FN und BSA wurden HL60-Zellen verwendet, die ohne Beschichtung unter normalen Kulturbedingungen in Anwesenheit von FCS wuchsen. Auch diese Zellgruppe wurde auf gleiche Art und Weise vorbereitet.

Zunächst erfolgte ein 24 Stunden-Ansatz von $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml, entweder in 25 cm² oder in 75 cm² ZKF. Nach diesen 24 Stunden wurden diese Zellen ebenfalls zentrifugiert (800 rpm, 4° C, 5 min), allerdings wurden die Zellpellets nach Verwerfen des Überstandes in 6 ml bzw. 18 ml – je nach vorgegebener ZKF-Größe - serumhaltigem Medium aufgenommen und diese Zellsuspensionen in unbeschichtete ZKF ausgesät. Danach wuchsen die Zellen für eine Stunde unter optimalen Wachstumsbedingungen, ehe sie bestrahlt (siehe unter 5.5.) und weiter methodenspezifisch behandelt wurden (siehe 5.6. – 5.10.).

5.5. Bestrahlung der Zellen

Nach Vorbereitung der Zellen und Aussaat auf verschiedenen Substraten wie unter 5.4. beschrieben, fand die Bestrahlung der HL60-Zellen statt. Diese wurde an einer Röntgenröhre bei 240 kV und RT durchgeführt, gefiltert durch 3 mm Beryllium. Die absorbierten Strahlendosen wurden mittels eines Duplex Dosimeters gemessen. Die Dosisrate betrug ca. 1 Gy/min bei 13 mA.

Für alle Experimente wurde eine Einzeitbestrahlung mit Bestrahlungsdosen von 2, 4, 6 oder 10 Gy gewählt.

Als Kontrollen dienten Zellpopulationen, die zwar genauso vorbereitet, aber nicht bestrahlt wurden.

5.6. Verdünnungsanalyse (Limiting Dilution Analysis)

5.6.1. Prinzip der Verdünnungsanalyse

Die Verdünnungsanalyse (*Limiting Dilution Analysis*, LDA) ist eine Möglichkeit zur Messung des Zellüberlebens von Suspensionskulturen [98].

Bei der LDA handelt es sich um eine *in vitro* Mikrokulturtechnik zur Frequenzbestimmung von Zellen. Mit Hilfe dieses Bioassays wird über eine

Anzahl von Verdünnungsschritten nach dem Alles-oder-Nichts-Gesetz entweder das Ergebnis „Zellwachstum vorhanden“ oder „Zellwachstum nicht vorhanden“ detektiert. Unter der Annahme, dass es sich bei allen Verdünnungsschritten um homogene Suspensionen handelt, entspricht die Verteilung der Testzellen in jedem Verdünnungsschritt der Poisson-Verteilung, einer Grenzverteilungsfunktion der Binomialverteilung für besonders seltene Ereignisse [98]. Zwar können die Zahlen zwischen einzelnen Vertiefungen variieren, im Mittel ergeben sich jedoch die

beabsichtigten Verdünnungen. Gemäß dem so genannten *Single-Hit*-Modell löst eventuell eine Zelle eine „positive Antwort“ (d.h. Wachstum) aus – unter der Voraussetzung, dass sämtliche Kulturfaktoren nicht limitierend sind und daher unberücksichtigt bleiben können [98]. Da allerdings die „positive Antwort“ nicht zwischen einer oder mehreren Zellen, die zu einer Reaktion führen, unterscheiden kann, ist es einfacher, im Umkehrschluss die „negative Antwort“ zu erfassen: Die Abwesenheit von Zellen nach einer bestimmten Kultivierungszeit nach Bestrahlung bedeutet fehlendes Zellwachstum [98].

Man beschickt eine Mikrotiterplatte in linearen Verdünnungsschritten. Die Verdünnungsstufe, in der 37% der Vertiefungen negativ sind, beinhaltet die Zellzahl, auf die statistisch genau eine HL60-Zelle entfällt.

5.6.2. Versuchsdurchführung

Die Vorbereitung der HL60-Zellen für die LDA erfolgte wie unter 5.4. beschrieben. Der Versuchsansatz beinhaltete $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml. Kultiviert wurden die HL60-Zellen für die LDA in 75 cm^2 ZKF mit 18 ml Medium, so dass jede Flasche $4,5 \times 10^6$ Zellen enthielt. Es folgte ein 24 stündiges Wachstum unter optimalen Bedingungen.

Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die Zellsuspensionen geerntet und bei 800 rpm und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 min zentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in 18 ml Medium, das Serum enthielt, resuspendiert. Anschließend erfolgte eine mikroskopische Zellzahlbestimmung wie unter 5.2. dargestellt, da der Einfluss der Zelldichte auf das Überleben nach Bestrahlung untersucht werden sollte.

Die LDA wurde in 96-Wellplatten durchgeführt, wobei die Wells mit folgenden Zellzahlen beschickt wurden: eine, zwei, vier und acht Zellen pro Well, in 200 µl Medium.

Auch die 96-Wellplatten wurden wie unter 5.4. beschrieben mit FN und BSA beschichtet, ebenso gab es eine Kontrollplatte ohne spezielle Beschichtung. Nach Beschickung der Platten mit den definierten Zellzahlen wurden die HL60-Zellen für eine Stunde unter optimalen Bedingungen kultiviert. Anschließend erfolgte die Bestrahlung der Platten (siehe unter 5.5.). Die gewählten Bestrahlungsdosen betragen 2, 4 oder 6 Gy. Nach erfolgter Bestrahlung wurden die 96-Wellplatten unter optimalen Wachstumsbedingungen für 7 – 8 Tage kultiviert, ehe sie lichtmikroskopisch ausgewertet wurden.

5.6.3. Auswertungen

Die Auswertung der einzelnen 96-Wellplatten erfolgte mittels mikroskopischer Auszählung der einzelnen Vertiefungen an einem inversen Mikroskop (Axiovert 10). Dabei wurde unter Nichtbeachtung der exakten Zellzahl nur gewertet, ob es zu einem Wachstum von HL60 gekommen ist, oder nicht.

Anschließend wurden die Zählergebnisse gemäß folgender Formel berechnet:

$$\text{Anzahl der positiven Wells} \times \frac{1}{\text{Anzahl der pos. Wells der unbestrahlten Kontrolle}}$$

Die errechneten Werte wurden anschließend in Abhängigkeit von Substrat als auch in Abhängigkeit von der ausgesäten Zellzahl logarithmisch dargestellt.

5.7. DAPI-Färbung

5.7.1. Prinzip der DAPI-Färbung

Der Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol-2 HCl (DAPI) eignet sich zur morphologischen Zellkernanalyse. Fixierte Zellkulturen werden mit DAPI-Farbstoff inkubiert, um Zellkerne zu färben, da der DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff DAPI zwischen die AT-reichen Regionen der DNA interkaliert. Er färbt dabei allein DNA und keine anderen Nukleinsäuren. Nach DNA-Markierung ist die

morphologische Analyse der mit DAPI markierten Zellkerne mittels Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich Zellgröße, Kernpyknose und Kernfragmentierung möglich.

Bei den folgenden Untersuchungen lag dabei das Interesse auf der zeitlichen Entwicklung des apoptotischen Zelltodes von unbestrahlten und bestrahlten HL60-Zellen.

5.7.2. Versuchsdurchführung

HL60-Zellen wurden wie unter 5.4. beschrieben vorbereitet, so dass sowohl Zellpopulationen, die in FN- und BSA-beschichteten ZKF unter serumfreien Bedingungen gewachsen waren, als auch Kontrollzellpopulationen, die in Anwesenheit von Medium ohne spezielle Beschichtung kultiviert worden waren, zur Verfügung standen.

Die Zellzahl/ml betrug $0,25 \times 10^6$ Zellen. Kultiviert wurden die HL60-Zellen für die DAPI-Färbung in 25 cm^2 ZKF mit 6 ml Medium, d. h. in jeder Flasche befanden sich insgesamt $1,5 \times 10^6$ Zellen. Eine ZKF diente jeweils der Untersuchung eines Messzeitpunktes.

Nach dieser Vorbereitungszeit erfolgte wie unter 5.5. dargestellt die Bestrahlung. Es wurden 2 oder 10 Gy appliziert.

Zur Darstellung der zeitlichen Veränderungen in der Apoptoserate der HL60-Zellen nach Bestrahlung wurden folgende Messzeitpunkte ausgewählt:

- Zeitpunkt der Bestrahlung, entsprechend „0 Stunden“ sowie
- zwei, sechs, 12, 24, 36, 48 Stunden nach Bestrahlung.

Für jeden Messzeitpunkt gab es für die jeweilige Wachstumsbedingung sowohl eine bestrahlte Zellpopulation, als auch eine unbestrahlte Kontrollpopulation.

Zu den angegebenen Messzeitpunkten erfolgte die Präparation der Zellen für die DAPI-Färbung. Die Zellsuspensionen wurden abgenommen und bei 500 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Mediumüberstandes wurden die Zellen mit 1x PBS-Lösung gewaschen und anschließend mit eiskaltem 80%igem Ethanol fixiert. In diesem fixierten Zustand konnten die Zellsuspensionen für mehrere Wochen bei -20°C aufbewahrt werden.

Um die fixierten Zellen auf einen Objektträger zu transferieren, erfolgte als nächster Schritt die Zytozentrifugation von rund 200 µl aus jeder Zellsuspension. Um die relativ fragilen HL60-Zellen durch die Zytozentrifugation nicht zu gefährden, wurde diese mit maximal 500 rpm für 5 min durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurden die mit Zellen besetzten Objektträger kurz (5 min) luftgetrocknet, ehe sie mit DAPI gefärbt wurden. Der Farbstoff wirkte 5 min ein und wurde dann vorsichtig mit einem Tuch abgesaugt. Zum Abschluss der Färbung wurde noch auf jeden Objektträger ein Tropfen Vectashield® *mounting medium* zur Fixierung und Verbesserung der Fluoreszenz aufgetragen sowie ein Deckgläschen aufgelegt.

5.7.3. Auswertungen

Die Auswertung der Objektträger erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung des Fluoreszenzfiltersatzes für blaue Fluoreszenz (490 nm, DAPI-Filter; Funktion des Fluoreszenzmikroskops unter 5.10.3.). Pro angefertigtem Objektträger wurden 1.000 Zellkerne nach den morphologisch-apoptotischen Kriterien Kernpyknose, Kernfragmentierung und Zellgröße analysiert. Anschließend wurde die Anzahl der apoptotischen Zellkerne an den Gesamtzellkernen prozentual verrechnet und graphisch mittels SigmaPlot dargestellt.

5.8. Western Blot

5.8.1. Prinzip des Western Blots

Das Westernblotverfahren ist ein spezifischer Nachweis für Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Fixierung auf eine Trägermembran mit anschließender Markierung mit einem spezifischen Antikörper.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei den nachfolgenden Versuchen mittels eines SDS- (Natriumdodezylsulfat, engl. *sodium dodecyl sulfate*) Polyacrylamidgeles. Diese Polyacrylamidgele, die 1959 erstmals von Raymond und Weintraub für die Elektrophorese verwendet wurden, sind chemisch und mechanisch besonders stabil und besitzen eine sehr geringe Elektroosmose. Polyacrylamidgele stellen Kopolymere zwischen dem Monomer

Acrylamid und dem Komonomer (Quervernetzer) N, N'-Methylen-bis-acrylamid dar.

Bei der sogenannten SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Durch Inkubation der Proteine mit SDS und S-S-(Disulfidbrücken-) reduzierenden Mitteln werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. Somit haben alle Proteine die gleiche geometrische Form. Da die großen und somit schwereren Proteine in der Gelmatrix mehr Widerstand erfahren, wandern sie, obwohl stärker negativ geladen, langsamer durch das Gel als die kleinen Proteine. SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine. Die stark negative Ladung von SDS nivelliert alle Ladungen der Proteine, so dass in der Regel alle Proteine gleich stark negativ geladen sind. Somit erhält man Informationen über das Molekulargewicht von Proteinmonomeren, unabhängig von der Eigenladung der enthaltenen AS-Reste oder der ursprünglichen räumlichen Gestalt.

Nach der Elektrophorese erfolgt der Transfer des im Gel eingebetteten Proteins auf eine immobilisierende Nitrozellulosemembran mit sehr hoher Proteinbindungskapazität. Dies geschieht nach dem Semidry-Verfahren in einer Blotting-Apparatur. Das Gel wird hierbei auf die Membran gelegt und senkrecht zur Auflagefläche eine elektrische Spannung angelegt. Nach einer definierten Zeit ist das Protein auf der Membran fixiert.

Die Identifizierung der geblotteten Proteine erfolgt mit spezifischen Antikörpern. Die Membran wird dazu mit einem primären Antikörper inkubiert, der spezifisch mit nur einem der geblotteten Proteine eine Antigen-Antikörper-Reaktion eingeht. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Membran zu verhindern (die sonst jegliche Proteine, und damit auch Antikörper, binden würde), müssen freie Bindungsstellen der Membran vor der Antikörperbehandlung blockiert werden. Dies wird durch Vorbehandlung mit Milchpulver erreicht. Bei der nachfolgenden Primärantikörperbehandlung bindet dieser nur an sein Antigen, das gesuchte Protein. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgt dann mit Hilfe eines sekundären Antikörpers, der mit einer Peroxidase konjugiert ist. Die Detektion der erfolgten Primär-Sekundär-Antikörperbindung an das auf der Membran fixierte Protein wird anschließend mit einer Chemilumineszenzmethode

sichtbar gemacht. Dieses Chemilumineszenz-System basiert auf der Spaltung von Substraten durch die an den Sekundär-Antikörper gekoppelte Peroxidase. Die gespaltenen Substrate fallen unter Abgabe von Photonen in den Grundzustand zurück. Die dabei freiwerdenden Lichtsignale schwärzen einen lichtempfindlichen Film, wodurch das Vorhandensein eines bestimmten Proteins nachgewiesen werden kann.

5.8.2. Durchführung des Western Blots

5.8.2.1. Extraktion der zellulären Gesamtproteine

Die Vorbereitung der HL60-Zellen zum Western Blot entsprach der unter 5.4. geschilderten Darstellung.

Die Bestrahlung erfolgte nach dem unter 5.5. beschriebenen Modus mit den Bestrahlungsdosen 2 oder 10 Gy. Auch die Messzeitpunkte waren mit den unter 5.7.2. beschriebenen identisch.

Als erster Schritt der Proteinextraktion erfolgte die Abnahme der Zellsuspensionen zu den gegebenen Zeitpunkten mit anschließender Zentrifugation bei 1.000 rpm, 4° C, 5 min. Nachfolgend wurde der Mediumüberstand dekantiert und das Zellpellet mit gekühlter 1x PBS-Lösung gewaschen. Zur Zellyse wurden die Zellen in 100 µl modifizierten RIPA-Puffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Um das Lysat zu homogenisieren, wurde das Lysat nach der Hälfte der Inkubationszeit 6x durch eine Nadel mit 26 G Durchmesser gezogen. Nach Ablauf der 30 min wurde das Lysat bei 13.000 rpm, 4° C, 20 min zentrifugiert. Der Überstand nach Zentrifugation entsprach dem Gesamtzelllysat und wurde vorsichtig für die weitere Bearbeitung von dem Pellet, das verworfen wurde, getrennt und bei -130° C gelagert.

5.8.2.2. Bestimmung der Gesamtproteinmenge

Die Bestimmung des Proteingehalts ist von großer Bedeutung, da zur quantitativen Vergleichbarkeit der Daten immer mit der gleichen Proteinmenge gearbeitet werden muss.

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge des Lysats erfolgte mit dem Bicinchoninsäure- (BCA-) Protein Assay, welcher die Biuret-Reaktion, d. h. die Reaktion von freien Aminogruppen in Proteinen unter Oxidation von Cu^{2+} zu Cu^{1+} in alkalischer Lösung, zur Basis hat. Das Natriumsalz der Bicinchoninsäure bildet

in alkalischem Medium einen 2:1-Komplex mit Cu^{1+} -Ionen unter Bildung eines stabilen roten Chromophors mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm.

Als erstes musste eine Standardverdünnungsreihe angelegt werden, auf welche die Untersuchungsergebnisse in vergleichbarer und standardisierter Art und Weise bezogen werden konnten. Als Standard wurde eine BSA-Konzentrationsreihe verwendet. Diese Standardverdünnungsreihe bestand aus einer BSA-Stammlösung von 2 mg/ml, die mit modifiziertem RIPA-Puffer zu Konzentrationen von 2, 1, 0,5, 0,25 und 0,125 mg/ml verdünnt wurde.

Die Messung erfolgte an einem Spektralphotometer. Dazu wurden sowohl die Standardverdünnungen, als auch die zu bestimmenden Proteinproben im Doppelansatz in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert.

Zu den jeweils pipettierten 10 μl Probe bzw. 10 μl Standard wurden 200 μl des BCA-Protein-Reagenz hinzugegeben. Im Anschluss daran erfolgte die Messung der Extinktion bei 562 nm, wobei RIPA-Puffer als sogenannter „Blank“ fungierte.

Bei der Messung sollten die Absorptionen der Proben und der Standardwerte nicht den Wert 1 übersteigen, da sonst eine Linearität nicht mehr gewährleistet ist. Ebenso sollten die Proben in der Bestimmung nicht über dem höchsten Wert des Standards liegen.

Der Gesamtproteingehalt der Lysate wurde nach der Messung aus der BSA-Standardverdünnung berechnet, und zwar zu 20 μg Protein pro Gelspur. Dieser Wert wurde aufgrund empirischer Erfahrungswerte ausgewählt.

5.8.2.3. SDS-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Proteine Bax (23 kDa), Cytochrom c (15 kDa), Bcl-2 (26 kDa), ILK (59 kDa), GSK-3 β (47 kDa) und P-GSK-3 β (Ser9; 47 kDa) wurden 15%ige Gele, für FAK (125 kDa) 10%ige Gele gegossen. Dabei richtet sich die Auswahl der Gelkonzentration nach dem Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine. Je kleiner das Molekulargewicht der Proteine ist, desto höher konzentriert sollte das Gel sein, damit der in Frage kommende Molekulargewichtsbereich optimal dargestellt werden kann.

Ein 15%iges Gel bildet den Molekulargewichtsbereich zwischen 10 kDa und 50 kDa optimal ab, ein 10%iges Gel jenen zwischen 40 kDa bis 150 kDa.

Ein Gel besteht aus zwei Bestandteilen, dem Trenngel und dem Sammelgel. Das Trenngel bildet die Matrix für den Gellauf im elektrischen Feld. Das Sammelgel besitzt Probenfächer – die Anzahl richtet sich nach der Gelgröße, bei der hier verwendeten Größe waren es 10 - , die die Aufgabe haben, die aufgetragenen Proben in schmaler Bande zu „bündeln“. Dadurch wird bewerkstelligt, dass die einzelnen Proben alle „vom gleichen Punkt“ aus starten, und dass sie nebeneinander durch das Gel wandern, ohne sich gegenseitig zu beeinträchtigen. Zuerst wurde in einer Hoefer Gelgießkammer das Trenngel gegossen. Damit die Gekante des Trenngels gerade und unversehrt blieb, wurde sie mit 500 µl 70 %igem Isopropanol überschichtet und das Gel für eine Stunde zum Polymerisieren stehen gelassen. Anschließend wurde das Isopropanol abgesaugt und das Sammelgel gegossen. Auch nach diesem Schritt stand das Gel zum vollständigen Polymerisieren für eine halbe Stunde bei RT. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Gel aus seiner Gießvorrichtung entfernt, in feuchte Tücher gewickelt und über Nacht in den Kühlschrank bei 4° C gelegt, um eine optimale Gelkonsistenz zu erzielen.

Bevor die Probenlysate auf das Gel aufgetragen wurden, wurden die Proteinlysate mit einem 4fachen Elektrophorese-Auftragspuffer (Probenpuffer) versetzt. Die Volumina der Probenlysate enthielten gemäß der Proteingehaltsbestimmung 20 µg Protein.

Anschließend wurden die mit Probenpuffer versetzten Lysate zur Denaturierung für 10 Minuten gekocht.

Die Gele wurden in SE 250 Hoefer Vertikalgelkammern eingespannt und die einzelnen Sammelgefächer mit den Lysaten beschickt. Auf jedem Gel war zudem zur Gewichtsbestimmung ein standardisierter Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Pro Gel wurde eine Spannung von 20 mA angelegt. Dieser Wert basierte auf empirischen Beobachtungen, bei denen sich gezeigt hatte, dass bei 20 mA eine optimale Proteinauftrennung stattfand. Der Gel-Lauf dauerte in der Regel zwei bis drei Stunden. Er wurde gestoppt, wenn die Lauffront den unteren Gel-Rand erreicht hatte.

5.8.2.4. Blotten

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine müssen die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und fixiert werden. Diesen Vorgang beschreibt das Blotten.

Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel aus seiner Halterung herausgenommen und das Sammelgel vorsichtig mit einem Skalpell abgetrennt. Um das übriggebliebene Trenngel herum, welches die Proteine enthielt, wurde ein sogenanntes „Blotting-Sandwich“ gebaut, das aus der Nitrozellulosemembran und sechs 3 MM Whatmanfilterpapieren bestand, die alle eine Größe von 8,4 cm x 5,4 cm entsprechend der Trenngelgröße hatten. Die genaue Anordnung der einzelnen Bestandteile des Sandwichs ist der Abb. 1 zu entnehmen. Nach dem Aufbau wurden überschüssiger Puffer und Luftblasen entfernt. Auf Luftblasenfreiheit muss genauestens geachtet werden, da Luftblasen den Transfer der Proteine stören.

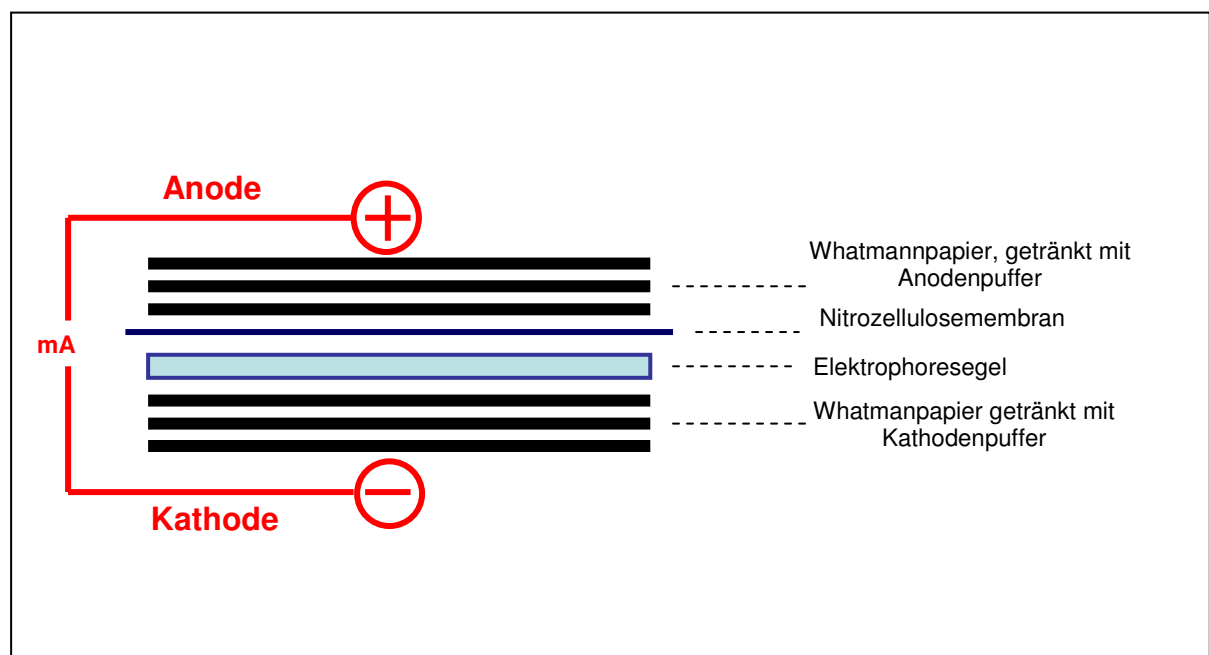


Abb. 1: Blotting-Sandwich

Der Aufbau erfolgte nach dem Prinzip eines Sandwichs beginnend bei der Anode der Blotkammer: drei Lagen Whatman Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Elektrophoresegel, drei Lagen Whatman Filterpapier. Sowohl das Filterpapier als auch die Membran wurden zuvor in Blotpuffer equilibriert.

Dieses Blotting-Sandwich wurde in einen Multiphor II Nova Blot mit zwei horizontal angeordneten Graphitplatten als Elektroden überführt.

Graphit ist ein optimales Elektrodenmaterial, weil es sehr gut leitet, sich nicht erwärmt und keine Oxidationsprodukte katalysiert.

An diesen Graphitplatten wurde senkrecht zu der Auflagefläche des Sandwiches ein konstanter Stromfluss angelegt. Die Größe dieses Stromflusses berechnete sich aus der Membrangröße wie folgt:

$$8,4 \text{ cm (Membranlänge)} \times 5,4 \text{ cm (Membranbreite)} \times 0,8 = 36 \text{ mA}$$

Die durch diesen Stromfluss induzierte Spannung baute sich über eine Laufzeit von 2 Stunden auf. Diese Zeitspanne entspricht der Zeit, welche die negativ geladenen Proteine brauchen, um mit gleichmäßiger Geschwindigkeit in die Membran zu wandern.

5.8.2.5. Proteinmarkierung

Nach Abschluss des Blotvorgangs wurden zunächst das Elektrophorese- und Transfer-Ergebnis insgesamt begutachtet, bevor der spezifische Antikörpernachweis durchgeführt wurde. Dazu wurden die auf der Nitrozellulosemembran fixierten Proteine reversibel mit Ponceau S angefärbt. Anschließend wurden die Markerpositionen zur Orientierung mit einem wasserfesten Stift markiert.

Auch die Gele ließen sich mit GelCode®Blue Stain Reagent färben.

Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mussten diese vor der Antikörperbehandlung geblockt werden. Dazu wurde die Membran mit 5%igem Magermilchpulver für mindestens 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert.

Nach dem Blockieren wurde der spezifische Antikörpernachweis auf die unter 5.8.2.3. beschriebenen Proteine durchgeführt.

Zunächst erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper. Dieser musste hierzu mit 5%igem Magermilchpulver nach den jeweiligen Herstellerangaben (siehe unter IV., 4.5) verdünnt werden. Um eine gleichmäßige Verteilung des verdünnten Antikörpers auf der Membran zu gewährleisten, wurde

die Membran mitsamt der Antikörperverdünnung in einen Plastikbeutel luftblasenfrei eingeschweißt und auf einen Taumel-Schüttler gelegt. Dieser Schüttler garantierte durch konstante Bewegungen ein ständiges Umspülen der Membran mit dem Antikörper. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte jeweils über Nacht bei 4° C.

Nach Primär-Antikörper-Inkubation wurden die Membranen 3 x 5 min mit PBS-Tween gewaschen. Auch der Sekundärantikörper musste nach speziellen Firmenvorschriften mit Magermilchpulver verdünnt werden. Die Inkubation dauerte zwei Stunden bei RT.

Nach Beendigung der Sekundär-Antikörper-Inkubation wurden die Membranen 6 x 5 min mit PBS-Tween gewaschen.

Zur Visualisierung der stattgefundenen spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen wurde die Membran mit ECL™ *Western blotting detection reagent* für eine Minute inkubiert. Diese Reagenz enthält das Substrat für die Peroxidase, mit der der Sekundärantikörper konjugiert ist. Nach Zugabe der ECL-Lösung wurde die Membran sofort in eine Plastikhülle verpackt und dabei darauf geachtet, dass die Membran nicht austrocknet.

Das Prinzip der Detektion durch Chemilumineszenz beruht darauf, dass durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase das Substrat in der ECL-Lösung gespalten wird. Dabei werden Lichtsignale freigesetzt, mit denen ein spezieller Film (Hyper™ECL™Filme) belichtet werden kann. Nach der Inkubation der ECL-Lösung erfolgte in der Dunkelkammer die Exposition der Membran auf den Film. Die Dauer der Inkubation war abhängig von der Intensität des Signals (Schwankungen zwischen 5 und 40 min).

Als letzter Schritt wurde der Film entwickelt (GBX Kodak *developer*), mit Wasser gespült, fixiert (GBX Kodak *fixer*), erneut mit Wasser gespült und schließlich getrocknet. Auf dem Film waren nun die charakteristische Proteinbandenmuster erkennbar.

Zur Kontrolle der Gleichmäßigkeit der aufgetragenen Proteinmengen wurden alle angefertigten Membranen mit dem spezifischen Antikörper gegen β -Aktin (46 kDa) inkubiert und detektiert (Ablauf siehe oben).

5.8.3. Analyse und Auswertung

Die Schwärzung der auf den Filmen erkennbaren Banden wurde densitometrisch mit Hilfe der Software Image Quant ausgewertet. Man erhält dadurch relative Werte, die sich aus der ausgemessenen Fläche der Bande und der Schwärzungsintensität ergeben. Die erhaltenen Werte der einzelnen Proteinbanden wurden in Relation zu den Aktinbanden desselben Films gesetzt, indem ein Quotient aus spezifischen Protein und Aktin gebildet wurde.

Anschließend wurde mit diesen Werten ein weitere Quotient gebildet, und zwar bestrahlter Wert zu unbestrahlter Kontrolle.

Die daraus resultierenden Ergebnisse wurden graphisch dargestellt, entweder in Microsoft®Excel oder in SigmaPlot.

5.9. Durchflusszytometrie

5.9.1. Die Methode der Durchflusszytometrie

Ein Durchflusszytometer stellt ein optisches Messsystem dar, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel (z. B. Zellen) analysiert.

Aus einer Suspension von Einzelzellen wird durch hydrodynamische Fokussierung mittels Hüllstromflüssigkeit ein Probenstrom erzeugt, der gewährleistet, dass die Zellen als Einzelzellen – wie Perlen an einer Kette – den Messpunkt an definierter Stelle passieren. Hier trifft der fokussierte Lichtstrahl eines Lasers auf die Zelle und erzeugt Fluoreszenz und Lichtstreuung. In der Durchflusszytometrie findet überwiegend der luftgekühlte Argonionenlaser mit einer Emissionslinie bei 488 nm als Lichtquelle Verwendung. Das bedeutet, dass nur Fluorochrome, die einen Exzitationsbereich um 488 nm haben, zur Markierung der zu untersuchenden Zellen in Frage kommen. Unter anderem lassen sich Fluorescein- (FITC-), R-Phycoerythrin- (PE-) und Peridin-Chlorophyll-a-Protein (PerCP-) gekoppelte Antikörper bei 488 nm anregen. Wenngleich sich die Farbstoffe in der Fluoreszenzfarbe unterscheiden, so ist ihre Fluoreszenz aber mit derselben Wellenlänge anregbar [167].

Licht wird nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut. Die Lichtstreuung ist am größten im Kleinwinkelbereich (0-10°, Vorwärtsstreulicht, *forward scatter* (FSC)), während ein geringer Teil des Lichts seitwärts streut (90°, Seitwärtsstreulicht, *side*

scatter (SSC)) [167]. FSC liefert Informationen über die Zellgröße, während SSC Auskunft über die Granularität gibt. Photodetektoren konvertieren die optischen Signale in elektrische Impulse, deren Höhe mit der Höhe des Lichtsignals korreliert. So lässt sich über das optische Detektionssystem und die Elektronik die Fluoreszenz- und Streulichtemission jeder einzelnen Zelle quantifizieren. Abhängig von der Dynamik des Messbereichs erfolgt eine Verstärkung der Signale bei der Fluoreszenzmessung logarithmisch, da der Dynamikbereich von einer niedrigen Autofluoreszenz bis zu mehreren hunderttausend Fluoreszenzäquivalenten reicht, ansonsten in der Regel linear [167]. Neben der Verstärkung des Messsignals erfolgt eine Umwandlung des analogen Messsignals in ein digitales durch einen Analog-Digital-Konverter, woraus letztlich eine Auflösung der Signalintensität in 1024 Stufen bzw. Klassen (*channel values*) resultiert [167].

Werden gleichzeitig zwei bzw. drei Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt und gemessen, muss berücksichtigt werden, dass sich die Emissionsspektren der Fluorochrome teilweise überlappen, das bedeutet dass z. B. der Farbstoff FITC, der im Bereich für Fluoreszenz 1 gemessen wird, auch etwas in den Nachbarmessbereich für Fluoreszenz hineinstrahlt und dort zum Messsignal mit beiträgt. Dies muss bei der Mehrfarbenmessung elektronisch kompensiert werden, d. h. bei jedem Messsignal wird der Intensitätsanteil aus den Nachbarkanälen abgezogen [167].

5.9.2. Darstellung der Messergebnisse

Die einfachste Art der Messdatendarstellung ist die Histogramm- oder Häufigkeitsverteilung. Die digitalisierten Werte einer Messung können bei einer Auflösung von 1024 Klassen Klassenwerte von 0 bis 1023 einnehmen. Die einzelnen Messwerte fallen wie Kugeln in das jeweils ihnen entsprechende Register. Im Histogramm sind also die Anzahl der Zellen (Ordinate) gegen die Klassen (Abszisse) aufgetragen.

Mit dem Histogramm wird die Verteilung eines Parameters (Zelleigenschaft) in einer großen Zell- oder Partikelpopulation beschrieben [167].

Daneben gibt es noch die korrelierte Zweiparameterdarstellung. Diese Darstellung zeigt die Relation zwei verschiedener Eigenschaften einer Zelle

zueinander an, z. B. die Korrelation von FSC mit SSC, oder die Korrelation der Grün- mit der Rotfluoreszenz.

Die gegenseitige Auftragung der Klassenwerte von zwei Parametern lässt eine Matrix entstehen. Ihre Struktur bzw. Auflösung entspricht der Klassifizierungsbreite der Parameter. In dieser Matrix ist der Schnittpunkt beider Messwerte einer Zelle das Ergebnis der Korrelation. Die graphische Darstellung kann als Zweiparameter-Punktehistogramm (*dot plot*) erfolgen. Jeder Punkt steht dabei für eine bestimmte Zelle mit ihren Eigenschaften. Andererseits charakterisiert ein Punkt zwar eine Zelle, kann aber auch für mehrere Zellen mit identischer Eigenschaft stehen.

Alle Parameter können miteinander korreliert werden [167].

5.9.3. Versuchsansatz und durchgeführte Messungen

Die Vorbereitung der HL60-Zellen fand wie unter 5.4. beschrieben statt.

Dann wurden die Zellen - wie unter 5.5. beschrieben – mit Dosen von 2 oder 10 Gy bestrahlt.

Die Messzeitpunkte für die Untersuchungen der Caspasen entsprachen denjenigen, die schon bei den Versuchen 5.7. und 5.8. verwendet wurden.

Bei den Analysen des Mitochondrienmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$) wurden die Messzeitpunkte aufgrund des hohen technischen Aufwands reduziert auf „Stunde 0“ als Zeitpunkt der Bestrahlung sowie 12, 24, 36 und 48 Stunden nach Strahlenexposition.

5.9.3.1. Messungen der Caspasen-Aktivität

Die Aktivität von Caspasen in der Zelle lässt sich durchflusszytometrisch bestimmen. Verwendet wurde dazu das zellpermeable FITC-konjugierte Peptid zVAD-Fluormethylketon (FMK). Die Peptidsequenz VAD entspricht einer Struktur, die von den aktiven Zentren der Caspasen erkannt und gebunden wird. Die Bindung von FAD-FMK an aktivierte Caspasen führt zu einer Zunahme der Fluoreszenz der Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle und kann dann im Fluoreszenz-1-Kanal des FACSCalibur (*fluorescence activated cell sorter*) gemessen werden.

Nach Bestrahlung wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten abgenommen und für die durchflusszytometrischen Messungen am FACS-Gerät vorbereitet.

Nach Abnahme wurden die Zellen zentrifugiert (800 rpm, 4° C, 5 min), der Medienüberstand dekantiert und die Zellpellets 2x mit kalter 1x PBS-Lösung gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellpellets mit 300 µl 1x PBS-Lösung resuspendiert. 100 µl dieser Zellsuspensionen wurden im Anschluss mit 2 µl CaspACE™FITC-VAD-FMK in situ Marker (1 µM) bei RT für 30 min lichtgeschützt inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen erneut gewaschen und mit 400 µl FACS-Flow für die Messung resuspendiert.

Als Negativkontrolle diente eine mit 5 µl IgG1-FITC inkubierte Zellkultur.

5.9.3.2. Messungen des transmembranen Mitochondrienpotentials ($\Delta\Psi_m$)

Eine wesentliche Eigenschaft der Mitochondrien ist das Vorhandensein eines elektrochemischen Gradienten zwischen ihrer inneren und ihrer äußeren Membran. Der Protonen- und der pH-Gradient entstehen hauptsächlich aufgrund einer aktiven, asymmetrischen Verteilung von Protonen zwischen Intermembranraum und Matrix. Im Wesentlichen ist das $\Delta\Psi_m$ dem Protonengradienten gleichzusetzen. Dieses Potential bildet die Grundlage dieser Methode, bei der kationische lipophile Farbstoffe, wie z. B. Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE), in der Matrix akkumulieren können.

TMRE ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch einen Laserstrahl zur Lichtemission angeregt werden kann. Während der Apoptose erfolgt eine Depolarisation des $\Delta\Psi_m$. Bei Membranschädigung des Mitochondriums wandert TMRE in das Mitochondrium und diffundiert aus dem Zytosol, so dass es nicht mehr messbar ist, was in einer Linksverschiebung der Häufigkeitsverteilung resultiert. Somit entsteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Fluoreszenz des TMRE und der Höhe des $\Delta\Psi_m$. Mit dem Fluoreszenz-2-Kanal des FACS-Gerätes erfasst man das entsprechende Signal und hat damit ein Maß für das $\Delta\Psi_m$, das bei apoptotischen Zellen entsprechend erniedrigt ist.

Zur Messungen des $\Delta\Psi_m$ wurde der Farbstoff TMRE an lebende HL60-Zellen appliziert und anschließend die Höhe des $\Delta\Psi_m$ durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben vorbereitet und bestrahlt. 30 min vor den angegebenen Untersuchungszeitpunkten wurde den HL60-Zellen 25 μM TMRE verabreicht. Nach Ablauf von 30 min wurden die Zellsuspensionen abgenommen, zentrifugiert (800 rpm, 4° C, 5 min) und 2x mit kalter 1x PBS-Lösung gewaschen. Nach Zugabe von 400 μl FACS-Flow wurde anschließend durchflusszytometrisch das $\Delta\Psi\text{m}$ bestimmt.

Als Negativkontrolle diente eine unbehandelte und unbestrahlte Zellsuspension, anhand deren Autofluoreszenz der Messbereich eingegrenzt wurde.

Die Bestimmung des $\Delta\Psi\text{m}$ wurde aufgrund der Präzision der Methode und den dadurch exakt zu detektierbaren Unterschieden bei den Proben lediglich in zwei unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt.

5.9.4. Auswertungen

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte am Gerät FACSCalibur. Alle Daten wurden mit der Software CellQuest Pro auf einem Apple Mackintosh-Rechnersystem ausgewertet. Die Kalibrierung der Streulicht- und Fluoreszenzkanäle erfolgte mit fluoreszierenden Latexpartikel (CaliBRITE).

Zunächst wurde in der Parameterkombination „Größe gegen Granularität“ die vitale Population der HL60-Zellen eingegrenzt („gating“). Der Schwellenwert wurde so eingestellt, dass nur vitale Zellen und kein Zelldebris sichtbar waren.

Die Bestimmung Antikörper-markierter Zellen orientierte sich generell an der Verteilung einer geeigneten Negativkontrolle. Die Fluoreszenzsignale der „negativen“ Zellen umfassten den Bereich bis zu jener Klasse (Marke), in dem die „Fluoreszenz“ (Autofluoreszenz und unspezifische Bindung) einer negativen Zelle noch fallen konnte. Diese Einstellung wurde für alle Messungen beibehalten. Jede Zelle mit einem höheren Klassenwert galt dann als „positiv“ [167].

5.10. Immunfluoreszenz

5.10.1. Prinzip der Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine der wichtigsten lichtmikroskopischen Techniken zur Charakterisierung von zellulären Strukturen (z. B. Zellkern, Zytoskelett, subzelluläre Lokalisation eines Proteins) aber auch zur Darstellung dynamischer Prozesse in der Zelle (z. B. die Änderung der Lokalisierung eines Proteins als

Antwort der Zelle auf bestimmte Stimuli hin oder die relative Lokalisierung mehrerer Proteine zueinander).

Um Proteinstrukturen in Zellen sichtbar zu machen, verwendet man mit Fluorochromen konjugierte Antikörper. Zwei der am häufigsten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind Fluorescein (grün) und Rhodamin (rot) (siehe auch unter 5.7.1. und 5.9.1.).

Im Rahmen der Immunfluoreszenz unterscheidet man zwischen direkter Immunfluoreszenz (DIF) und indirekter Immunfluoreszenz (IIF).

Bei der DIF bindet ein spezifischer, fluoreszenzmarkierter Primär-Antikörper direkt an das zelluläre Zielmolekül (Antigen) und wird mittels Mikroskopie dargestellt.

Bei der IIF bindet ein unmarkierter Primär-Antikörper an die Zielstruktur. Anschließend wird ein zweiter, fluoreszenzmarkierter Antikörper (Sekundär-Antikörper), der gegen den Primär-Antikörper gerichtet ist, eingesetzt und der gebildete Antigen-Antikörperkomplex für die Mikroskopie detektiert.

Die Methode der IIF erlaubt mehr Flexibilität, da eine Vielzahl von Primär-Antikörpern mit den gleichen, markierten Sekundär-Antikörpern kombiniert werden können. Zudem ist die IIF empfindlicher, da verschiedene Zweit-Antikörper mit den Epitopen der Primär-Antikörper reagieren können. Daher wurde der IIF der Vorzug gegeben.

5.10.2. Versuchsansatz und durchgeführte Färbungen

Die Zellvorbereitung entsprach der Schilderung unter 5.4.

Nach dieser Vorbereitung wurden die Zellen mit 2 oder 10 Gy bestrahlt, wie unter 5.5. dargestellt.

Die Immunfärbungen wurden zum Zeitpunkt der Bestrahlung als „Stunde 0“ sowie 24 Stunden nach Strahlenexposition angefertigt.

5.10.2.1. Immunfärbungen von Bax und Cytochrom c:

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, bei 500 rpm, 4 °C, 5 min zentrifugiert und mit 2 ml 1x PBS-Lösung gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der HL60-Zellen mit eiskaltem 80%igem Ethanol. Die Überführung der fixierten Zellen auf Objektträger wurde mittels der Zytocentrifuge bewerkstelligt. Pro Zellsuspension wurden 200 µl bei 500 rpm für 5 min

zytozentrifugiert (siehe auch unter 5.7.). Nach der Zentrifugation wurden die mit Zellen besetzten Objektträger für 30 min luftgetrocknet. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen des Primär-Antikörpers an freie Bindungsstellen der Zellen wurde jeder Objektträger für 1 Stunde mit 50 µl BSA (2 mg/ml) geblockt. Anschließend wurde das BSA vorsichtig mit einem Tuch abgesaugt. Dann erfolgte die einstündige, lichtgeschützte Inkubation der Zellen mit dem Primär-Antikörper bei RT. Dieser musste hierzu mit BSA (1 mg/ml) nach den jeweiligen Herstellerangaben (siehe unter IV, 4.5.) verdünnt werden. Nach Inkubation des Primär-Antikörpers wurden die Objektträger 6 x 5 min mit 0,9% NaCl gewaschen, ehe der Sekundär-Antikörper appliziert wurde. Auch dieser musste nach speziellen Firmenvorschriften mit BSA verdünnt werden. Die Inkubation dauerte 1 Stunde bei RT. 5 min vor Ablauf der Sekundär-Antikörper-Inkubationszeit wurde jeder Objektträger noch für 5 min mit DAPI gefärbt. Nach Beendigung der Sekundär-Antikörper- sowie DAPI-Inkubation wurden die Objektträger 6 x 5 min mit 0,9% NaCl gewaschen. Zum Abschluss der Färbung wurde auf jeden Objektträger ein Tropfen Mowiol zur Fixierung aufgetragen sowie ein Deckgläschen aufgelegt.

5.10.2.2. Färbung der Mitochondrien:

Zur Darstellung der Mitochondrien wurde der Farbstoff Mito Tracker®Red an lebende HL60-Zellen appliziert, damit er von den Zellen verstoffwechselt werden konnte, denn Mito Tracker®Red ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der selektiv Mitochondrien anfärbt, die über ein Membranpotential verfügen.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben vorbereitet und bestrahlt. 30 min vor den gewünschten Untersuchungszeitpunkten wurde den HL60-Zellen 1mM Mito Tracker verabreicht. Nach Ablauf der 30 min wurden die Zellsuspensionen abgenommen, zentrifugiert (500 rpm, 4 °C, 5 min), 2x mit kalter 1x PBS Lösung gewaschen und mit eiskaltem 80%igem Ethanol fixiert. Das weitere Procedere erfolgte wie unter 5.10.2.1. beschrieben.

5.10.3. Auswertung

Die Auswertung der angefertigten Objektträger erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 400fachen Vergrößerung unter Ölimmersion, um

die mit Fluorochromen konjugierten Antigen-Antikörperkomplexe sichtbar zu machen. Das bei diesen Untersuchungen verwendete Fluoreszenzmikroskop arbeitete nach dem Auflichtprinzip. Das bedeutet, dass das Präparat von oben durch das Objektiv, das gleichzeitig als Kondensator fungiert, beleuchtet wird. Als Lichtquelle, die die Anregungswellenlänge der verwendeten Fluorochrome enthalten muss, wurde eine Quecksilberhochdrucklampe verwendet. Diese lieferte ein breites Spektrum von Wellenlängen zwischen 360 nm und 700 nm.

Aus dem gesamten Beleuchtungsspektrum wird zuerst mittels eines Eingangsbandfilters (Anregungsfilter) die anregende Wellenlänge des gewählten Fluorochroms herausgefiltert. Die Anregungsstrahlung gelangt auf einen dichromatischen Teilerspiegel. Dieser reflektiert das Erregerlicht von kleiner Wellenlänge und ist gleichzeitig durchlässig für das längerwellige Licht der Emissionsstrahlung. Die Anregungsstrahlung gelangt durch das Objektiv auf das Präparat und regt das Fluorochrom an, welches daraufhin sein längerwelliges Licht emittiert. Dieses passiert den dichromatischen Teilerspiegel und trifft auf den Ausgangssperrfilter (Emissionsfilter). Dieser filtert die gewünschte Emissionswellenlänge des Fluorochroms, das eigentliche Fluoreszenzbild.

Da bei mikroskopischen Untersuchungen von ganzen Zellen das Fluoreszenzlicht auch von Molekülen emittiert wird, die unter- oder oberhalb der Brennebene liegen, kommt es zur Überlagerung von Fluoreszenzbildern, so dass es schwierig ist, die tatsächliche dreidimensionale Anordnung zu erkennen. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die konfokale Laser Scanning Mikroskopie eingesetzt. Beim konfokalen Laser Scanning werden nur diejenigen fluoreszierenden Moleküle visualisiert, die in einer bestimmten Ebene liegen. Dadurch entsteht ein wesentlich schärferes Schnittbild. Das optische System fokussiert den Strahl dabei auf einen bestimmten Punkt in einer spezifischen Tiefe des Objekts. Dazu wird ein Laserstrahl zunächst durch eine Lochblende geführt. Auch das emittierte Licht muss durch eine Lochblende bevor es vom Detektor (Photomultiplier) registriert wird. Diese beiden Lochblenden sowie ein Punkt in der Brennebene der Linse sind konfokal. Daher gelangt nur Licht aus der Brennebene zum Detektor, während Licht aus anderen Ebenen ausgeblendet wird. Um ein komplettes Bild zu erhalten, muss der Lichtstrahl mit Hilfe einer Scanning-Einheit Punkt für Punkt über das Objekt bewegt werden. Aus den dabei

aufgenommenen Einzelpunkten wird dann in einem angeschlossenen Rechner ein Bild rekonstruiert und einer vergleichenden Analyse zugänglich gemacht.

5.11. Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Jede geschilderte Versuchsmethode besteht aus drei unabhängigen, identisch verlaufenden Versuchsreihen, die in einem gewissen zeitlichen Abstand durchgeführt wurden.

Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet, welche alle in Bezug auf eine unbehandelte sowie unbestrahlte Kontrolle prozentual berechnet wurden.

Zur Untersuchung auf signifikante Unterschiede der Ergebnisse wurde der Student`s-Test verwendet. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ angenommen.

Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Programmes Microsoft®Excel durchgeführt. Die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte ebenfalls teilweise mit Microsoft®Excel sowie mittels der Programme PowerPoint und SSPS.

VI. ERGEBNISSE

6.1. Strahleninduzierte Apoptose - morphologische Zellkernuntersuchungen mittels DAPI-Färbung

Das Auftreten von Apoptose sowie der zeitliche Verlauf des apoptotischen Verhaltens von HL60-Zellen nach Strahlenexposition (2 Gy und 10 Gy) wurden in Abhängigkeit der Substrate Polystyrol (PS), Rinderserumalbumin (BSA) und Fibronectin (FN) untersucht. Dabei erfolgten die Untersuchungen der Apoptoserate auf zellulärer Ebene bis 48 Stunden post irradiationem (p. i.) durch Anfärben der Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff DAPI. Ausgewertet wurden die angefärbten Zellkerne nach morphologischen Kriterien der Apoptose mittels Fluoreszenzmikroskopie, wobei als Kriterien für Apoptose Kernpyknose, Kernfragmentierung sowie Veränderungen der Zellform und -größe gewertet wurden.

Die Abb. 1 und 2 zeigen die Ergebnisse der DAPI-Färbungen. Auf den Abszissen ist jeweils die Zeit nach Strahlenexposition in Stunden aufgetragen, während auf den Ordinaten die strahleninduzierte Apoptoserate von HL60-Zellen in Prozent, bezogen auf eine unbestrahlte Kontrolle, angegeben ist.

In Abb. 1 sind die Ergebnisse für jedes Substrat zusammenfassend dargestellt, wobei pro Substrat Bestrahlungsdosen von 0, 2 sowie 10 Gy untersucht wurden. Es zeigte sich, dass der Kontakt von HL60-Zellen mit FN zu einer statistisch signifikanten Reduktion der strahleninduzierten Apoptoseraten, für Bestrahlung mit 2 Gy ($p < 0,05$) als auch mit 10 Gy ($p < 0,04$), im Vergleich mit PS oder BSA führte. Der Vergleich zwischen PS zu BSA erbrachte weder p. i. mit 2 Gy noch mit 10 Gy statistisch signifikante Unterschiede.

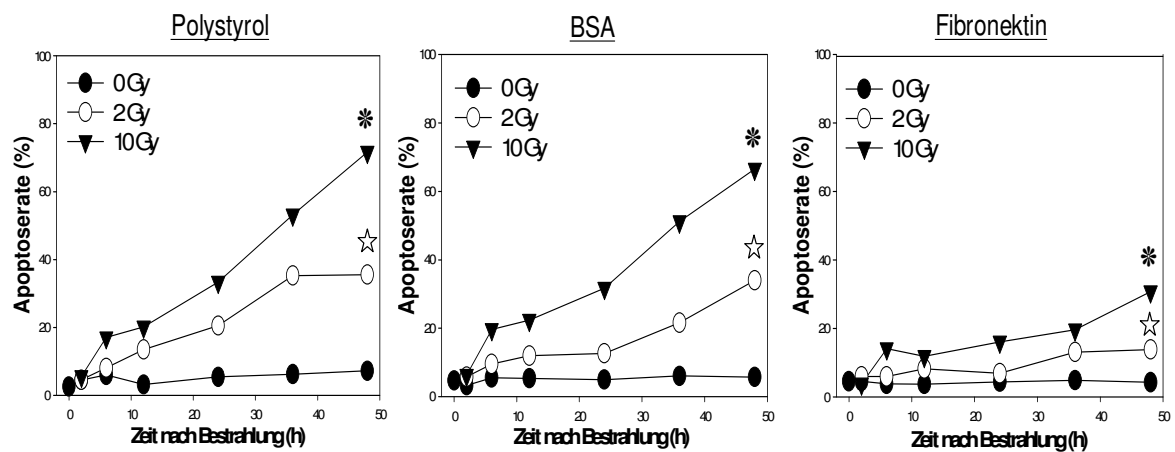


Abb. 1: Apoptoserate in Abhängigkeit des Substrates – Ergebnisse der DAPI-Färbung.

Pro Substrat ist das zeitliche Apoptoseverhalten einer unbestrahlten Kontrolle (●), einer Zellkultur nach Strahlenexposition mit 2 Gy (○) sowie einer Zellkultur nach Bestrahlung mit 10 Gy (▼) dargestellt. Der Kontakt von HL60-Zellen mit FN führte zu einer signifikanten Reduktion der Apoptoserate nach Strahlenexposition, sowohl bei Bestrahlungsdosen von 2 Gy (* $p < 0,05$) als auch von 10 Gy (* $p < 0,04$). Dieser Effekt wurde ab 24 Stunden p. i. immer deutlicher sichtbar und erreichte 48 Stunden p. i. seine maximale Ausprägung. Der Vergleich von PS mit BSA zeigte weder nach Strahlenexposition mit 2 Gy noch mit 10 Gy statistisch signifikante Unterschiede im Apoptoseverhalten von HL60-Zellen.

Zur genaueren Betrachtung der zeitlichen Veränderungen des apoptotischen Verhaltens von HL60-Zellen nach Strahlenexposition dient Abb. 2. In Abb. 2A sind die Ergebnisse nach Bestrahlung mit 2 Gy dargestellt, in Abb. 2B diejenigen für 10 Gy.

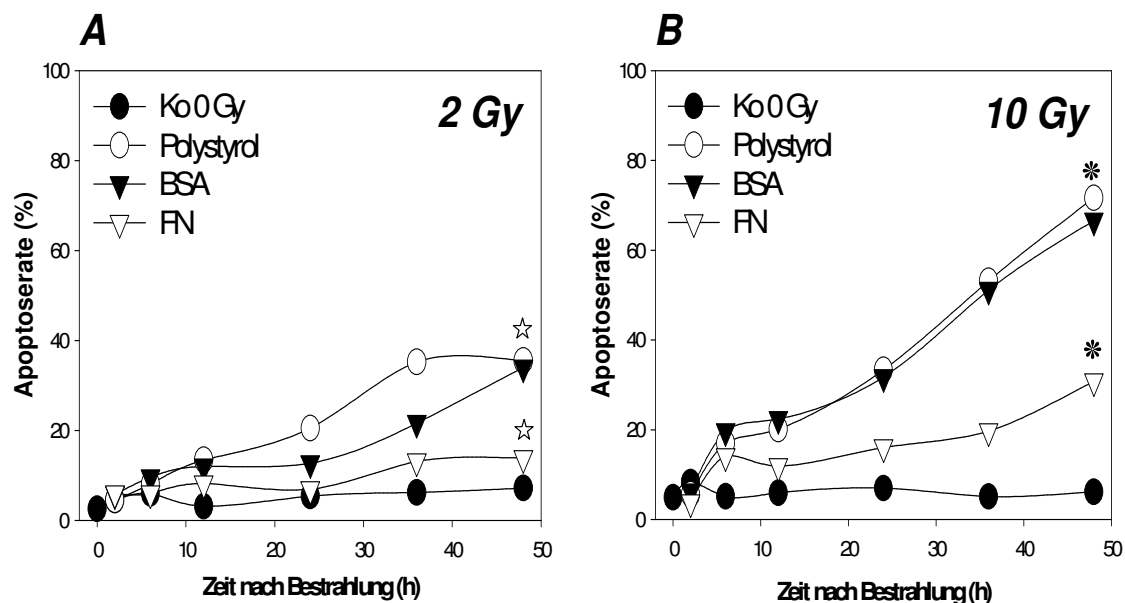


Abb. 2: Apoptoserate in Abhängigkeit des Substrates mittels DAPI-Färbung.

FN reduzierte die strahleninduzierte Apoptose von HL60-Zellen. Dieser positive Einfluss auf das Zellüberleben tritt v. a. 48 Stunden nach Bestrahlung signifikant zu tage (* $p_{2\text{Gy}} < 0,05$; * $p_{10\text{Gy}} < 0,04$).

Zunächst erfolgte die Betrachtung für eine Strahlendosis von 2 Gy. Während sich bei den Zellen, die an FN adhärten, die Apoptoserate im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle nur unwesentlich änderte (Apoptoserate für FN 48 Stunden p. i. 12%, Apoptoserate für die unbestrahlte Kontrolle 48 Stunden p. i. 5%), zeigten die auf PS und BSA ausgesäten Zellen eine deutliche Zunahme der Apoptoserate, mit einem verstärkten Anstieg der Apoptose 24 Stunden nach Strahlenexposition auf Maximalwerte von 34% (BSA) bzw. 35,5% (PS) 48 Stunden p. i.. Diese Prozentzahlen entsprechen einem signifikanten Überlebensvorteil nach Strahlenexposition mit 2 Gy von HL60-Zellen, die auf FN wuchsen gegenüber denjenigen, die auf PS oder BSA ausgesät worden waren ($p < 0,05$).

Zur weiteren Verifizierung des positiven Effektes von FN auf das Zellüberleben von HL60-Zellen nach Bestrahlung wurde die gleiche Versuchsreihe mit einer Strahlendosis von 10 Gy durchgeführt (Abb. 2B). Auch hier hatten die mit FN in Kontakt stehenden Zellen signifikant niedrigere Apoptoseraten als diejenigen Zellen mit Kontakt zu PS und BSA ($p < 0,04$). Ebenso wie bei den Ergebnissen

mit 2 Gy-Strahlenexposition gab es auch bei einer Strahlendosis von 10 Gy keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen PS und BSA.

Die Unterschiede zwischen FN und PS bzw. BSA waren bei einer Strahlendosis von 10 Gy wesentlich deutlicher zu sehen. Wie bereits bei den Untersuchungen mit 2 Gy kam es auch bei einer Bestrahlung mit 10 Gy ab 24 h p. i. zu einer deutlich verstärkten Zunahme der Apoptose auf PS und BSA im Vergleich zu FN. Bei den HL60-Zellen, die auf PS und BSA ausgesät worden waren, zeigte sich ein rasanter Anstieg der Apoptose auf Maximalwerte bis 80% 48 Stunden p. i., wohingegen die FN-Zellkultur nur einen insgesamt trüben Anstieg der Apoptoserate auf maximal 35% zu verzeichnen hatte.

Zur optischen Verdeutlichung der starken Unterschiede im Apoptoseverhalten von HL60-Zellen p. i. in Abhängigkeit des Substrates dient Abb. 3.

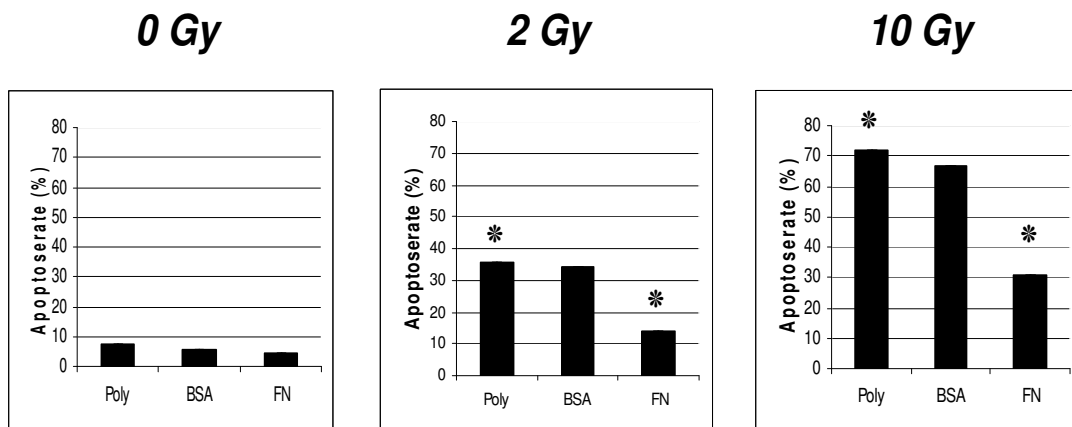


Abb. 3: Apoptoserate in Abhängigkeit des Substrates 48 Stunden p. i. mittels DAPI-Färbung.

Der positive Effekt der Anwesenheit von FN auf die Apoptoserate lies sich sehr deutlich 48 Stunden nach Strahlenexposition feststellen. Es zeigte sich eine hoch signifikante Reduktion der Apoptoserate für HL60-Zellen, die auf FN gewachsen waren (* $p < 0,01$).

Sie zeigt die Apoptoseraten von HL60-Zellen für die drei verwendeten Wachstumsbedingungen 48 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy oder 10 Gy. Besonders deutlich sind die Unterschiede nach 10 Gy-Strahlendosis zu erkennen,

mit einer hoch signifikant reduzierten Apoptoserate für HL60-Zellen mit FN-Kontakt im Vergleich zu PS oder BSA ($p < 0,01$).

Diese Daten belegen einen signifikanten Überlebensvorteil durch FN im Vergleich zu PS oder BSA im Sinne einer adhäsionsvermittelten Apoptoseresistenz nach Strahlenexposition.

6.2. Verdünnungsanalyse (*Limiting Dilution Analysis - LDA*) – Abhängigkeit des Überlebens bestrahlter HL60-Kulturen von Substrat und Zelldichte

Zur weiteren Verifizierung des positiven Effekts des FN auf das Zellüberleben von HL60-Zellen im Sinne einer adhäsionsbedingten Strahlenresistenz wurde mit Hilfe der Verdünnungsanalyse (*Limiting Dilution Analysis – LDA*) das längerfristige Überleben (> 7 Tage) von HL60-Zellen nach Strahlenexposition untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sowohl Zellzahl als auch FN-Kontakt signifikant das Zellüberleben nach Bestrahlung beeinflussten. Je höher die Zelldichte war, desto höher war die Überlebensrate von HL60-Zellen p. i..

6.2.1. Der positive Einfluss von FN auf das Zellüberleben von HL60-Zellen nach Bestrahlung

In Abb. 4 sind die Ergebnisse der LDA in Abhängigkeit des Substrates dargestellt. Die Abszissen repräsentieren die applizierte Bestrahlungsdosis in Gy, die Ordinaten die Fraktion der überlebenden HL60-Zellen respektive die als positiv gewerteten Wells 7 Tage nach Strahlenexposition.

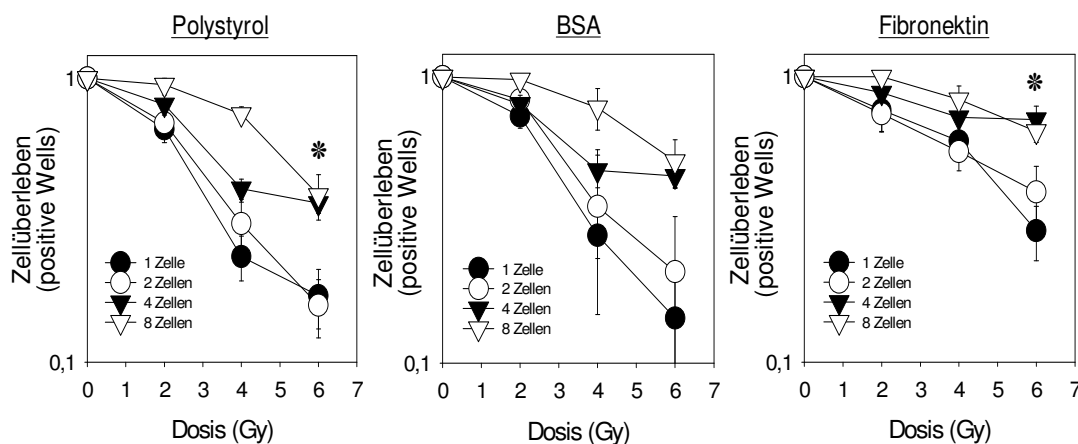


Abb. 4: Vergleich des Zellüberlebens in Abhängigkeit des Substrates mittels LDA.

Die Anwesenheit von FN verschaffte HL60-Zellen nach Strahlenexposition einen deutlich signifikanten Überlebensvorteil (* $p < 0,001$). Dieses Ergebnis lies sich in ähnlicher Weise für alle ausgesäten Zellzahlen feststellen.

Man erkennt, dass die Anwesenheit von FN HL60-Zellen einen deutlichen, statistisch signifikanten Überlebensvorteil im Gegensatz zur Anwesenheit von PS als auch BSA verschaffte ($p < 0,02$). Allerdings zeigte sich auch, dass die Zahl der Zell-Zell-Kontakte, dargestellt durch die verschiedene Anzahl an ausgesäten Zellen, einen entscheidenden Einfluss auf das Zellüberleben hatte (siehe unter 6.2.2.).

Während bei niedrigen Bestrahlungsdosen (2 Gy) die Unterschiede noch nicht so deutlich zu Tage traten, zeigten sich bei höheren Dosen (4 Gy und 6 Gy) hoch signifikante Verbesserungen im Zellüberleben durch die Anwesenheit von FN im Vergleich zu PS und BSA ($p_{4 \text{ Gy}} < 0,02$; $p_{6 \text{ Gy}} < 0,001$). Diese signifikanten Unterschiede ließen sich für jede ausgesäte Zellzahl (1, 2, 4 und 8 Zellen) feststellen, was die ebenfalls enorme Bedeutung möglicher Zell-Zell-Interaktion auf das Überleben von HL60-Zellen p. i. unterstreicht.

Der Vergleich der Ergebnisse von PS mit BSA zeigte keine statistisch relevanten Unterschiede bzw. Verbesserungen im Zellüberleben von HL60-Zellen nach Bestrahlung.

6.2.2. Einfluß von Zell-Zell-Interaktionen auf die Überlebensrate von HL60-Zellen nach Strahlenexposition

Auf die immense Bedeutung von Zell-Zell-Interaktionen zwischen HL60-Zellen ist bereits in 6.2.1. hingewiesen worden. Abb. 5 zeigt das Zellüberleben nach Strahlenexposition in Abhängigkeit von der ausgesäten Zellzahl, wobei auch hier die positiven Effekte von FN ebenfalls klar zu erkennen sind.

Die Beschriftungen von Ordinaten und Abszissen entsprechen denjenigen von Abb. 4 (6.2.1.).

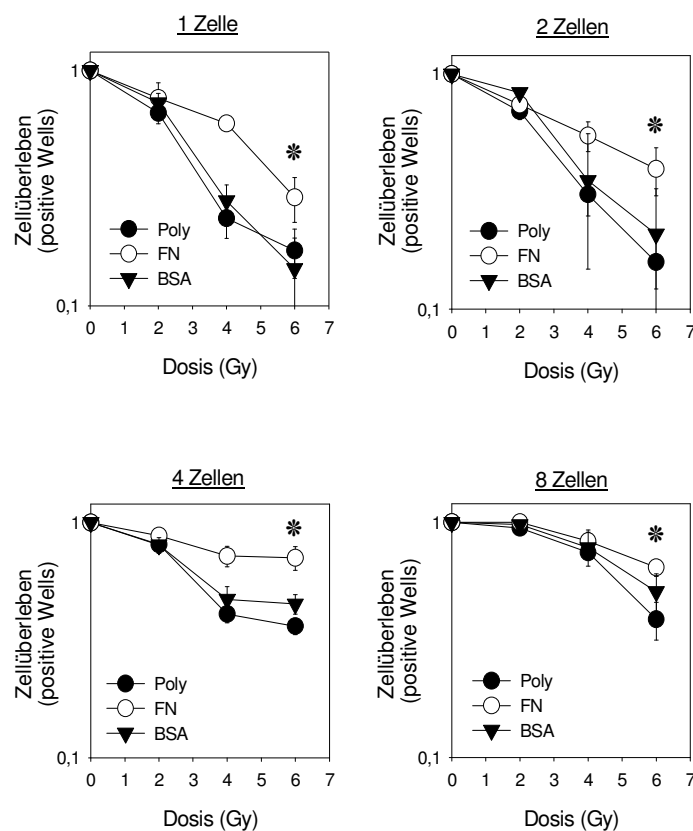


Abb. 5: Zellüberleben in Abhängigkeit von der Zellzahl mittels LDA.

Neben dem positiven Effekt des FN auf das Zellüberleben von HL60-Zellen p. i. zeigte sich ein hoch signifikanter Einfluss der Zellzahl auf die Überlebensrate (* $p < 0,01$). Je größer die möglichen Zell-Zell-Interaktionen waren, desto höher war das Zellüberleben nach Bestrahlung.

Je mehr HL60-Zellen pro Well ausgesät wurden, desto besser war das *Outcome* nach Bestrahlung. Bei Bestrahlungsdosen von 2 Gy lagen die Ergebnisse noch relativ dicht beisammen und es konnten noch keine großen Veränderungen im Zellüberleben festgestellt werden. Erst ab Strahlendosen von 4 Gy und vor allem ab 6 Gy traten die Unterschiede deutlich hervor. Die Anzahl der positiven Wells für acht ausgesäte Zellen war sieben Tage nach Bestrahlung hoch signifikant größer als diejenige für eine ausgesäte Zelle ($p < 0,01$). Bereits zwei ausgesäte HL60-Zellen zeigten bei einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy eine signifikante

Verbesserung des Zellüberlebens p. i. im Vergleich zu einer HL60-Zelle ($p < 0,04$). Die Verbesserung des Zellüberlebens nahm mit jeder zusätzlich ausgesäten Zelle sprunghaft zu und weist auf den äußerst wichtigen Einfluss der Zell-Zell-Interaktionen zur Erlangung einer Strahlenresistenz hin.

Die Beurteilung der Resultate der durchgeführten Experimente lassen den Schluss zu, dass das Zellüberleben von HL60-Zellen nach Strahlenexposition von Zell-Zell-Kontakten und Zell-Matrix-Interaktionen abhängig ist. Beide Faktoren scheinen wichtige Komponenten zur Erlangung einer zelladhäsionsbedingten Strahlungsresistenz zu sein.

6.3. Strahleninduzierte Veränderungen im Expressionsmuster von Schlüsselproteinen der Integrinsignalkaskade - Resultate der Western Blot-Untersuchungen

Die Abb. 6 bis 10 sowie 12 spiegeln die Ergebnisse der Western Blot-Untersuchungen wider. Im oberen Teil der Abbildungen sind dabei die detektierten Banden der untersuchten Proteine dargestellt, wobei jeweils die Inkubation mit einem β -Actin-Antikörper als Ladungskontrolle diente. Die Beschriftungen der Graphen setzen sich zusammen aus der Zeit nach Strahlenexposition in Stunden (Abszissen) sowie *fold induction*, entsprechend einem Vielfachen einer unbestrahlten Kontrolle (Ordinaten).

6.3.1. Integrin-linked Kinase (ILK)

Die Serin/Threonin-Kinase ILK (59 kDa) spielt eine wichtige Rolle in der Integrin-abhängigen Regulation der Apoptose. Ihre Aktivierung kann über die Stimulation der PKB α /Akt zu einer Inhibition der Apoptose führen (siehe auch unter III, 3.1.3.). ILK wurde mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers aus dem Gesamtzelllysat ermittelt. Dabei war von Interesse, inwiefern die Anwesenheit von FN Einfluss auf das ILK-Expressionsmuster und damit indirekt auf das Zellüberleben von HL60-Zellen nach Bestrahlung nimmt.

Abb. 6 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen, die mit Strahlendosen von 2 Gy (Abb. 6A) sowie 10 Gy (Abb. 6B) durchgeführt wurden. Die Beschriftungen der Graphiken entsprechen den Ausführungen unter 6. 3..

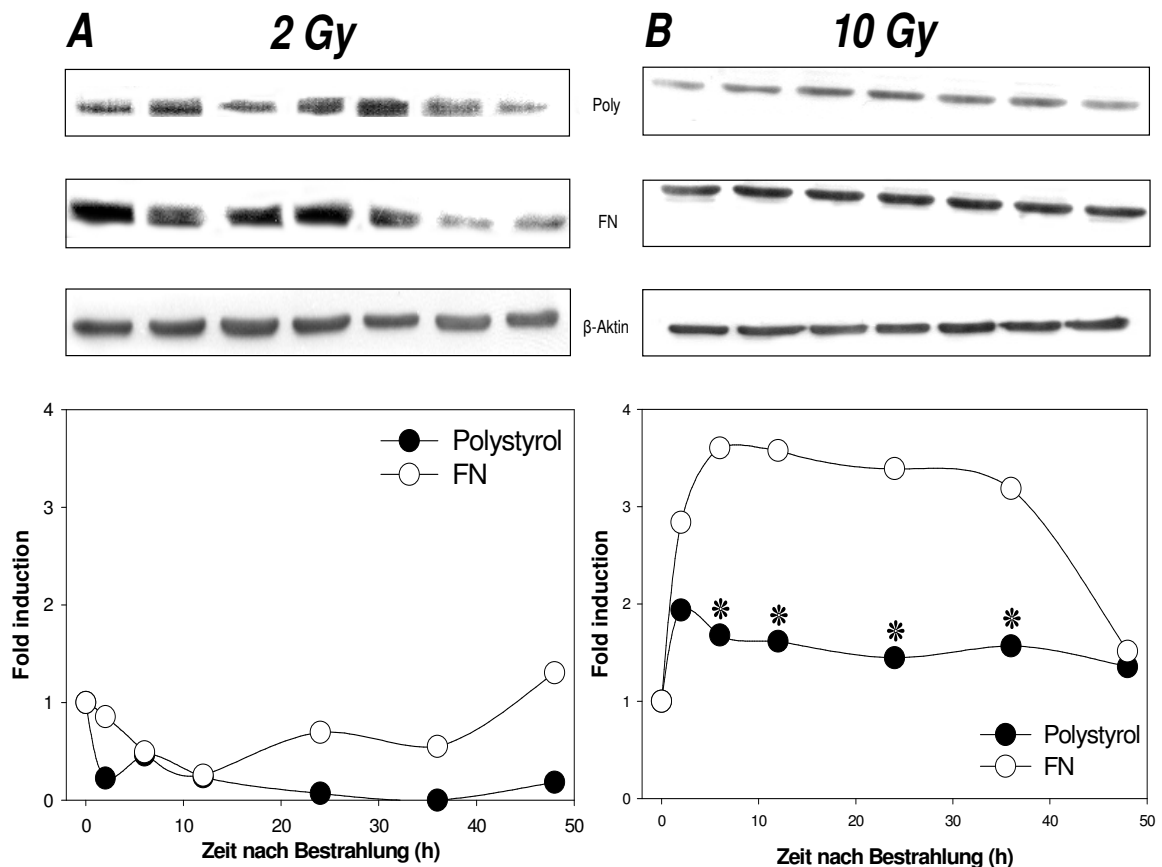


Abb. 6: Expressionsmuster von ILK (59 kDa) in Abhängigkeit des Substrates mittels Western Blot.

Mittels eines monoklonalen Antikörpers wurde ILK aus dem Gesamtzelllysate bestimmt. Während nach Strahlenexposition mit 2 Gy keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen PS und FN zu detektieren waren (Abb. 6A), führte der Kontakt von HL60-Zellen zu FN zu einer statistisch hoch signifikant verstärkten Expression von ILK nach Bestrahlung mit 10 Gy im Vergleich zum Kontakt mit PS (* $p < 0,02$; Abb. 6B). Die Inkubation mit einem β -Actin-Antikörper diente als Ladungskontrolle. *Anmerkung:* Fold induction entsprechend einem Vielfachen der unbestrahlten Kontrolle.

Die Untersuchungen zum zeitabhängigen Expressionsverhalten von ILK nach Bestrahlung mit 2 Gy erbrachten keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen HL60-Zellen, die auf PS wuchsen, und denjenigen, die mit FN in Kontakt standen (Abb. 6A). Im Anschluss an die Bestrahlung kam es sowohl bei der PS-HL60-Zellfraktion als auch bei HL60-Zellen mit FN-Kontakt zu einer Abnahme der ILK-Expression. HL60-Zellen, die auf PS wuchsen, exprimierten ILK äußerst schwach, 24 Stunden p. i. war ILK fast nicht und 36 Stunden p. i. nicht mehr detektierbar. Erst 48 Stunden nach Strahlenexposition ließ sich wieder ein leichter Expressionsanstieg nachweisen. Der Kontakt mit FN bewirkte nach dem anfänglichen Expressionsabfall ab 12 Stunden p. i. einen trägen Anstieg des ILK-Signals mit einer deutlichen Steigerung nach 36 Stunden auf eine maximale ILK-Expression 48 Stunden nach Bestrahlung.

Zusammenfassend lag die Expression von ILK bei HL60-Zellen mit Kontakt zu FN nach Bestrahlung mit 2 Gy stets etwas höher als bei der PS-HL60-Zellfraktion, allerdings ohne statistische Signifikanz.

Abb. 6B zeigt die Ergebnisse des zeit- und substratabhängigen Detektionsmuster von ILK nach Bestrahlung von HL60-Zellen mit 10 Gy. Im Gegensatz zur Strahlenexposition mit 2 Gy zeigten sich hier statistisch hoch signifikante Unterschiede zwischen PS und FN ($p < 0,02$). Bei HL60-Zellen, die auf FN wuchsen, ließ sich ein sprunghafter Anstieg der ILK-Expression sofort nach Strahlenexposition detektieren. Sechs Stunden nach Bestrahlung erreichte die Expression von ILK ihren Maximalwert. Bis 36 Stunden p. i. blieb die Expression auf hohem Niveau. Sie nahm allerdings leicht ab, ehe sie nach 26 Stunden stark abfiel, und 48 Stunden p. i. ähnliche Werte wie bei der PS-HL60-Zellfraktion erreichte. Der Kontakt von HL60-Zellen zu PS führte im Vergleich dazu zu einem statistisch signifikant schwächeren Expressionsanstieg von ILK im Anschluss an die Bestrahlung ($p < 0,02$). Der im Vergleich signifikant niedrigere Maximalwert der ILK-Expression ließ sich bereits nach zwei Stunden p. i. detektieren – im Gegensatz zu sechs Stunden p. i. bei FN. Danach war ein mäßiger Rückgang der Expression nachweisbar, mit einem fast unveränderten Detektionsmuster bis 48 Stunden p. i., welches signifikant niedriger war als bei HL60-Zellen mit FN-Kontakt ($p < 0,02$).

Die Tendenz aus den Untersuchungen mit 2 Gy, dass die Anwesenheit von FN zu einer verstärkten ILK-Expression führte, konnte mit den Ergebnissen nach Strahlenexposition mit 10 Gy statistisch signifikant bestätigt werden. FN führte zu einer deutlichen Steigerung der Expression von ILK im Vergleich zu PS. Da die Inhibition der Apoptose eine der vielfältigen Funktionen von ILK darstellt, sprechen diese Ergebnisse für die antiapoptotischen und somit HL60-Zellüberleben fördernden Einflüsse des FN nach Strahlenexposition im Sinne einer adhäsionsbedingten Strahlenresistenz. Dies steht im Einklang mit den bereits aus den vorangegangenen Versuchen gewonnenen Erkenntnissen.

6.3.2. Glykogensynthasekinase-3 β (GSK-3 β)

Nachdem die Western Blot-Untersuchungen zu ILK bereits eine verstärkte Expression von ILK nach Strahlenexposition und damit ein verbessertes

Zellüberleben von HL60-Zellen durch die Anwesenheit von FN gezeigt hatten, wurde in weiteren Untersuchungen das zeit- und substratabhängige Expressionsverhalten der GSK-3 β (47kDa) sowie das ihrer inhibierten Form P-GSK-3 β (47 kDa) p. i. untersucht.

Die GSK-3 β stellt ein wichtiges *Downstream*-Signal in der Integrin-abhängigen Signalkaskade dar, das über ILK aktiviert werden kann. Aktive GSK-3 β ist in der Lage, die Progression des Zellzyklus durch Inhibition der Proteolyse von Cyclin D1 voranzutreiben.

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die positiven Einflüsse des FN auch auf GSK-3 β sowie P-GSK-3 β nach Bestrahlung übertragen ließen.

Zunächst wurde mit einem monoklonalen Antikörper das Vorhandensein von GSK-3 β in HL60-Zellen überprüft. Sie ließ sich sowohl in einer unbestrahlten Kontrollzellpopulation als auch nach Strahlenexposition mit 2 Gy sowie 10 Gy detektieren, unabhängig vom verwendeten Substrat.

Im Anschluss folgten die Untersuchungen zur inhibierten Form P-GSK-3 β , welche graphisch in Abb. 7 dargestellt sind. Die Beschriftungen der Graphen folgt den Schilderungen unter 6.3.. Auch P-GSK-3 β wurde mittels eines monoklonalen Antikörpers aus dem Gesamtzelllysat bestimmt.

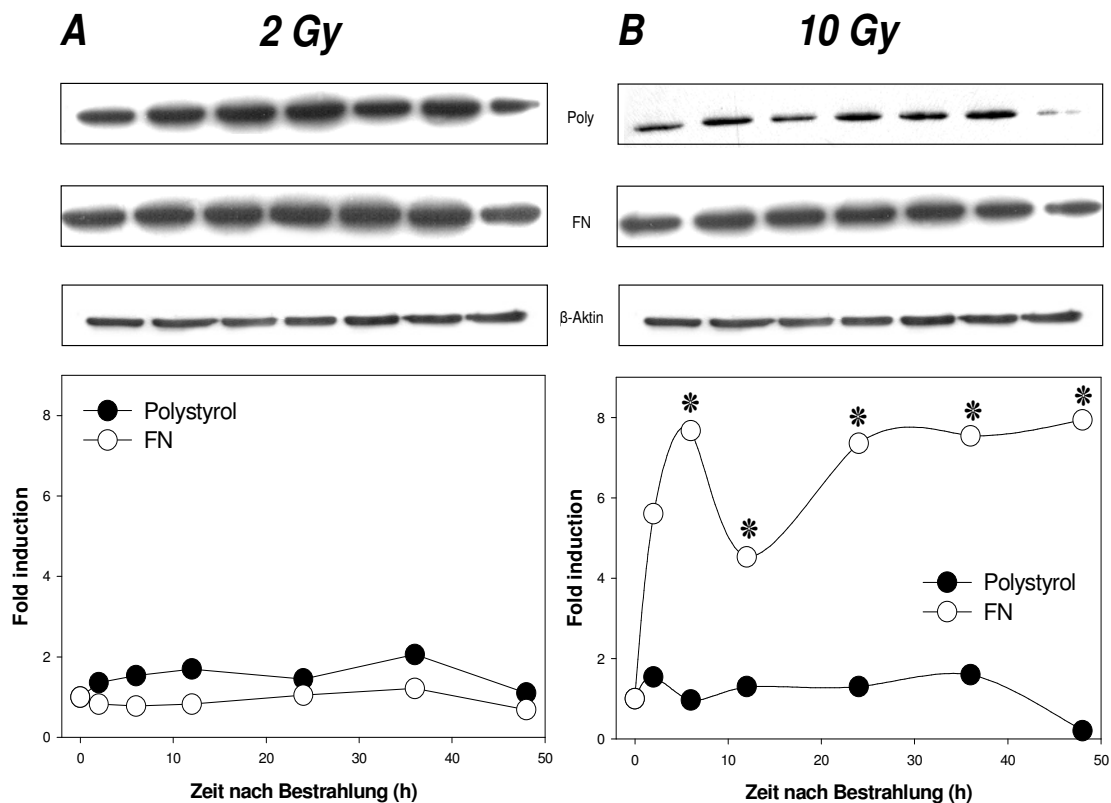


Abb. 7: Expressionsmuster der P-GSK-3 β (47 kDa) in Abhängigkeit des Substrates mittels Western Blot.

Die P-GSK-3 β wurde mittels eines monoklonalen Antikörpers aus dem Gesamtzelllysate ermittelt. Nach Strahlenexposition mit 2 Gy (Abb. 7A) ließen sich keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen PS und FN detektieren. Die Bestrahlung mit 10 Gy (Abb. 7B) erbrachte hingegen eine statistisch signifikante Zunahme der P-GSK-3 β -Expression bei HL60-Zellen mit Kontakt zu FN im Vergleich zur PS-HL60-Zellfraktion (* $p < 0,01$). Der Nachweis von β -Aktin diente als Ladungskontrolle. *Anmerkung:* Fold induction entsprechend einem Vielfachen der unbestrahlten Kontrolle.

Die Strahlenexposition mit 2 Gy (Abb. 7A) erbrachte keine statistisch relevanten Unterschiede im Expressionsmuster von P-GSK-3 β zwischen PS und FN. Sowohl bei HL60-Zellen mit Kontakt zu PS als auch bei HL60-Zellen, die auf FN wuchsen, zeigte sich über 48 Stunden p. i. eine nahezu konstant niedrige P-GSK-3 β -Expression.

Im Gegensatz dazu ließen sich nach Bestrahlung mit 10 Gy (Abb. 7B) statistisch hoch signifikante Unterschiede der P-GSK-3 β -Expression zwischen PS und FN detektieren ($p < 0,01$).

Ähnlich wie bei den Untersuchungen mit 2 Gy blieb die P-GSK-3 β -Expression der PS-HL60-Zellfraktion nach Strahlenexposition mit 10 Gy auf annähernd konstant niedrigem Niveau, ehe sie 36 Stunden p. i. abfiel und nach 48 Stunden nicht mehr zu detektieren war.

Dagegen zeigten HL60-Zellen, die auf FN wuchsen, eine statistisch hoch signifikante Zunahme der Expression von P-GSK-3 β nach Strahlenexposition mit 10 Gy im Vergleich zur PS-HL60-Zellfraktion ($p < 0,01$). Es ließ sich ein zweigipfliger Expressionsverlauf nachweisen. Unmittelbar nach Bestrahlung mit

10 Gy kam es zu einem starken Expressionsanstieg von P-GSK-3 β auf einen ersten Maximalwert sechs Stunden p. i.. Anschließend fiel die Expression bis 12 Stunden p. i. deutlich ab, ehe ein zweiter Anstieg auf einen zweiten Maximalwert 48 Stunden p. i. erfolgte.

Damit bestätigten die Ergebnisse aus dem P-GSK-3 β -Expressionsverlauf die aus den vorherigen Untersuchungen gewonnene Erkenntnis, dass die Anwesenheit von FN zu einem Überlebensvorteil von HL60-Zellen nach Strahlenexposition im Sinne einer adhäsionsbedingten Radioresistenz führte, vermittelt durch einen Arm der Integrinsignalkaskade.

Abb. 8 zeigt zusammenfassend eine Gegenüberstellung der zeit- und substratabhängigen Expressionsmuster von ILK und von P-GSK-3 β nach Strahlenexposition mit 2 Gy sowie mit 10 Gy.

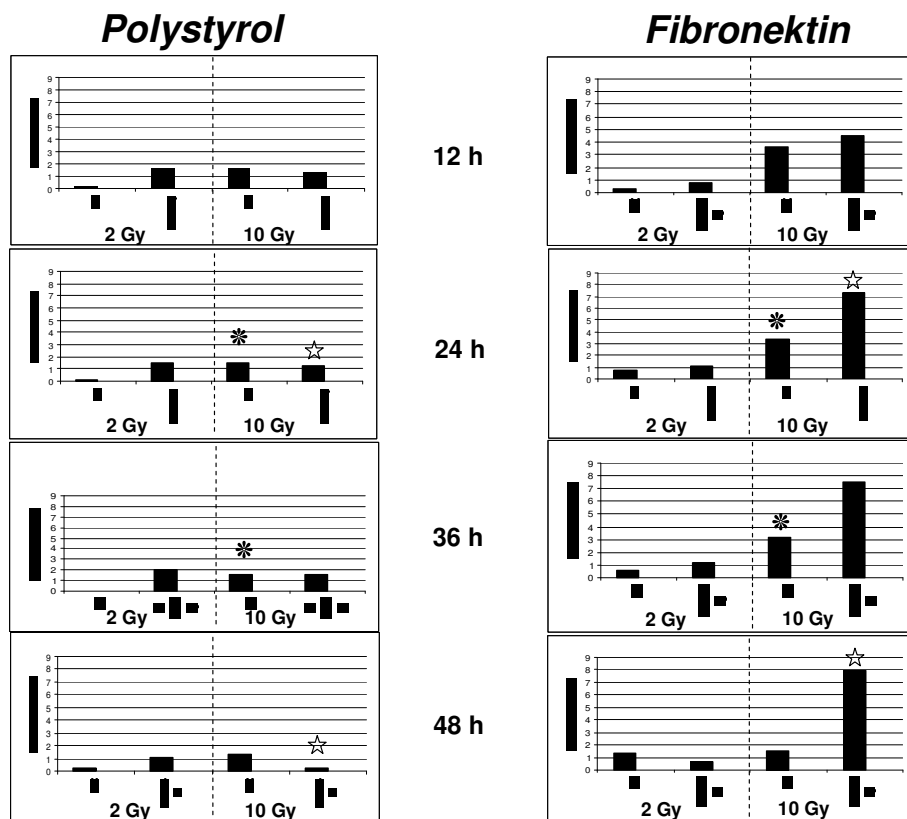


Abb. 8: Gegenüberstellung des zeit- und substratabhängigen Expressionsmuster von ILK und P-GSK-3 β p. i. mittels Western Blot

Während nach Bestrahlung mit 2 Gy keine relevanten Unterschiede zwischen PS und FN nachweisbar waren, erbrachte die Strahlenexposition mit 10 Gy einen dreifach erhöhten Anstieg der ILK-Expression (* $p < 0,02$) bei HL60-Zellen mit FN-Kontakt im Vergleich zu PS, sowie einen siebenfach erhöhten Anstieg der P-GSK-3 β -Expression (* $p < 0,01$).

Die Bestrahlung mit 2 Gy lieferte weder bei der ILK-Expression noch bei der der P-GSK-3 β relevante Unterschiede zwischen PS und FN. Anders stellten sich die Ergebnisse nach Strahlenexposition mit 10 Gy dar. Diese Darstellung verdeutlicht die signifikanten Unterschiede im zeitlichen Expressionsverhalten von ILK und von P-GSK-3 β zwischen PS und FN.

Sowohl ILK als auch P-GSK-3 β ließen sich bei HL60-Zellen, die auf PS wuchsen, auf einem fast gleich bleibend niedrigem Niveau detektieren. Dagegen zeigte sich bei HL60-Zellen mit Kontakt zu FN eine etwa dreifach erhöhte ILK-Expression im Vergleich zu PS ($p < 0,02$), sowie eine rund siebenfach erhöhte Zunahme der Expression von P-GSK-3 β ($p < 0,01$), was den positiven Einfluss des FN auf das Zellüberleben von HL60-Zellen nach Bestrahlung deutlich unterstreicht.

6.3.3. Focal Adhesion Kinase (FAK)

FAK ist ein wichtiges Schlüsselprotein in der Integrinsignaltransduktion, deren Aktivierung infolge integrin-vermittelter Adhäsion von adhären Zellen an EZM-Proteine erfolgen kann. In etlichen Studien wurde nachgewiesen, dass FAK eine essentielle Rolle bei der Ausbildung einer adhäsionsbedingten Bestrahlungsresistenz spielt [14; 124] (siehe auch unter III, 3.1.3.).

Mittels Western Blot wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob sich FAK auch bei HL60-Suspensionszellen nach Kontakt mit FN nachweisen lässt, und ob HL60-Zellen dadurch einen Überlebensvorteil nach Strahlenexposition erlangen können.

Das Gesamtzelllysat wurde mit einem monoklonalen FAK-Antikörper inkubiert. Weder bei einer unbestrahlten Kontroll-HL60-Zellpopulation noch nach Bestrahlung mit 2 Gy sowie 10 Gy konnte FAK im Western Blot detektiert werden, unabhängig vom Substrat. Für die in dieser Arbeit verwendete HL60-Population scheint FAK bei der Adhäsion keine Rolle in der integrin-abhängigen Signalkaskade zu spielen.

6.3.4. Einflüsse von FN auf die Aktivierung der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade

Die zentrale Rolle in der mitochondrialen Apoptoseregulation spielen die Mitglieder der Bcl-2-Familie. Wie unter III, 3.4.5. aufgezeigt, lässt sich die Bcl-2-

Familie in zwei Gruppen unterteilen, und zwar in pro- und in antiapoptotische Proteine. Einer der wichtigsten Vertreter der proapoptotischen Proteine ist Bax (23 kDa), den wichtigsten Vertreter der antiapoptotischen Gruppe stellt Bcl-2 (26 kDa) dar.

Im Folgenden wurde der Einfluss des FN auf das zeitliche Expressionsverhalten p. i. des antiapoptotischen Bcl-2 sowie des proapoptotischen Bax untersucht.

6.3.4.1. Bcl-2

Bcl-2 ist in der Lage, den mitochondrialen Apoptosesignalweg an mehreren Stellen zu inhibieren, und damit die Induktion der Apoptose zu verhindern (siehe auch unter III, 3.4.5.). Im Rahmen dieser Untersuchung wurde das zeit- und substratabhängige Expressionsmuster von Bcl-2 nach Strahlenexposition mit 2 Gy sowie 10 Gy analysiert. Bcl-2 wurde mittels eines monoklonalen Antikörpers aus dem Gesamtzelllysat der HL60-Zellen ermittelt.

In Abb. 9 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Die Beschriftung der Graphen entspricht den Darstellungen unter 6.3..

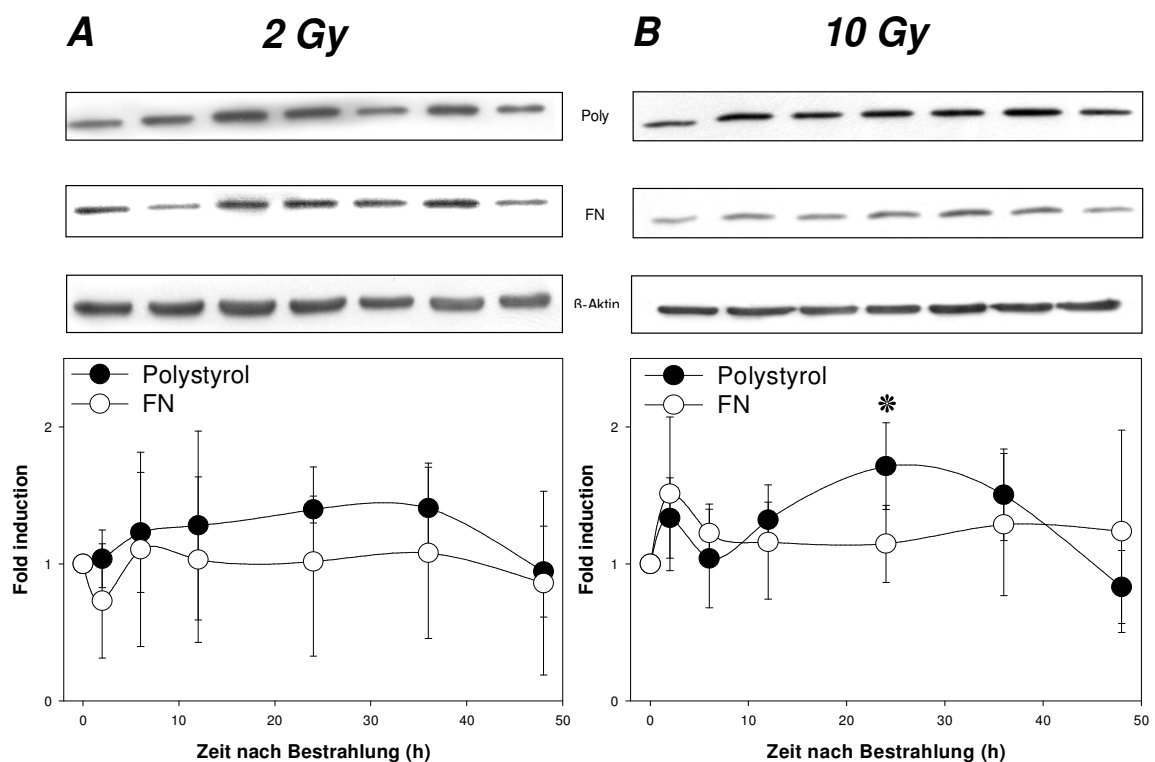


Abb. 9: Expressionsmuster des antiapoptotischen Bcl-2 (26 kDa) in Abhängigkeit des Substrates mittels Western Blot.

Bcl-2 wurde mittels eines monoklonalen Antikörpers aus dem Gesamtzelllysat bestimmt. Während die Bestrahlung mit 2 Gy (Abb. 9A) keine statistisch signifikanten Unterschiede im Expressionsmuster von Bcl-2 zwischen PS und FN erbrachte, ließ sich nach Strahleneexposition mit 10 Gy (Abb. 9B) eine signifikant höhere Bcl-2-Expression bei der PS-HL60-Zellfraktion im Vergleich zu HL60-Zellen mit FN-Kontakt detektieren (* $p < 0,04$). β -Actin diente als Ladungskontrolle. Anmerkung: Fold induction entsprechend einem Vielfachen der unbestrahlten Kontrolle.

Nach Strahlenexposition mit 2 Gy (Abb. 9A) konnten keine statistisch signifikanten Daten ermittelt werden. Es zeigten sich jedoch Unterschiede in der Bcl-2-Expression zwischen HL60-Zellen mit PS-Kontakt und denjenigen, die auf FN wuchsen.

Bei den auf PS ausgesäten Zellen ließ sich im Anschluss an die Bestrahlung mit 2 Gy ein leichter, stetiger Anstieg der Bcl-2-Expression auf einen Maximalwert nach rund 30 Stunden p. i. detektieren. Anschließend nahm die Bcl-2-Expression ab und erreichte 48 Stunden p. i. ihren Minimalwert.

Im Gegensatz dazu zeigten HL60-Zellen mit FN-Kontakt zunächst einen Abfall der Bcl-2-Expression auf einen Minimalwert zwei Stunden nach Strahlenexposition, ehe die Expression von Bcl-2 auf ihren Ausgangswert zurückkehrte und nahezu konstant auf diesem Niveau blieb, bevor sie nach 36 Stunden wieder sank.

Zusammenfassend lag die Bcl-2-Expression der PS-HL60-Zellfraktion stets über derjenigen von HL60-Zellen mit FN-Kontakt.

Die Bestrahlung mit 10 Gy lieferte statistisch signifikante Unterschiede zwischen PS und FN ($p < 0,04$), wobei sich die Tendenz der Ergebnisse nach Strahlenexposition mit 2 Gy bestätigen ließ (Abb. 9B).

Bei HL60-Zellen, die auf PS ausgesät worden waren, ließ sich direkt im Anschluss an die Bestrahlung mit 10 Gy ein Anstieg der Bcl-2-Expression detektieren. Nach kurzem Expressionsabfall sechs Stunden p. i. zeigte die PS-HL60-Zellfraktion eine statistisch signifikante Zunahme der Bcl-2-Expression auf einen Maximalwert 24 Stunden p. i. im Vergleich zu HL60-Zellen mit Kontakt zu FN ($p < 0,04$). Danach nahm die Expression kontinuierlich ab, ehe sie nach 48 Stunden ihren Minimalwert erreichte.

Signifikant anders verhielt sich die Bcl-2-Expression bei HL60-Zellen, die auf FN wuchsen. Zwar kam es auch hier zunächst zu einer Zunahme der Bcl-2-Expression im Anschluss an die Strahlenexposition auf einen Maximalwert zwei Stunden p. i.. Danach allerdings fiel die Bcl-2-Expression wie schon bei den Untersuchungen mit 2 Gy-Strahlendosis auf ihren Ausgangswert, der bis 48 Stunden p. i. konstant beibehalten wurde.

Im Rahmen dieser Untersuchungen ließ sich kein Einfluss des FN auf das Expressionsverhalten von Bcl-2 nach Strahlenexposition im Sinne eines

Zellüberleben fördernden Effektes nachweisen. Eher das Gegenteil schien der Fall zu sein.

6.3.4.2. Bax

Bax gehört zur Gruppe der proapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie, welche direkt die Mitochondrien zu aktivieren vermögen, und damit die Exekution der Apoptose einleiten (siehe unter III, 3.4.5.).

Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers wurde Bax aus dem HL60-Gesamtzelllysat mit der Fragestellung bestimmt, inwiefern die Anwesenheit von FN das Expressionsverhalten nach Bestrahlung mit 2 Gy sowie 10 Gy beeinflusst. Dargestellt sind die Ergebnisse in Abb. 10, die Beschriftungen sind analog den Beschreibungen unter 6.3..

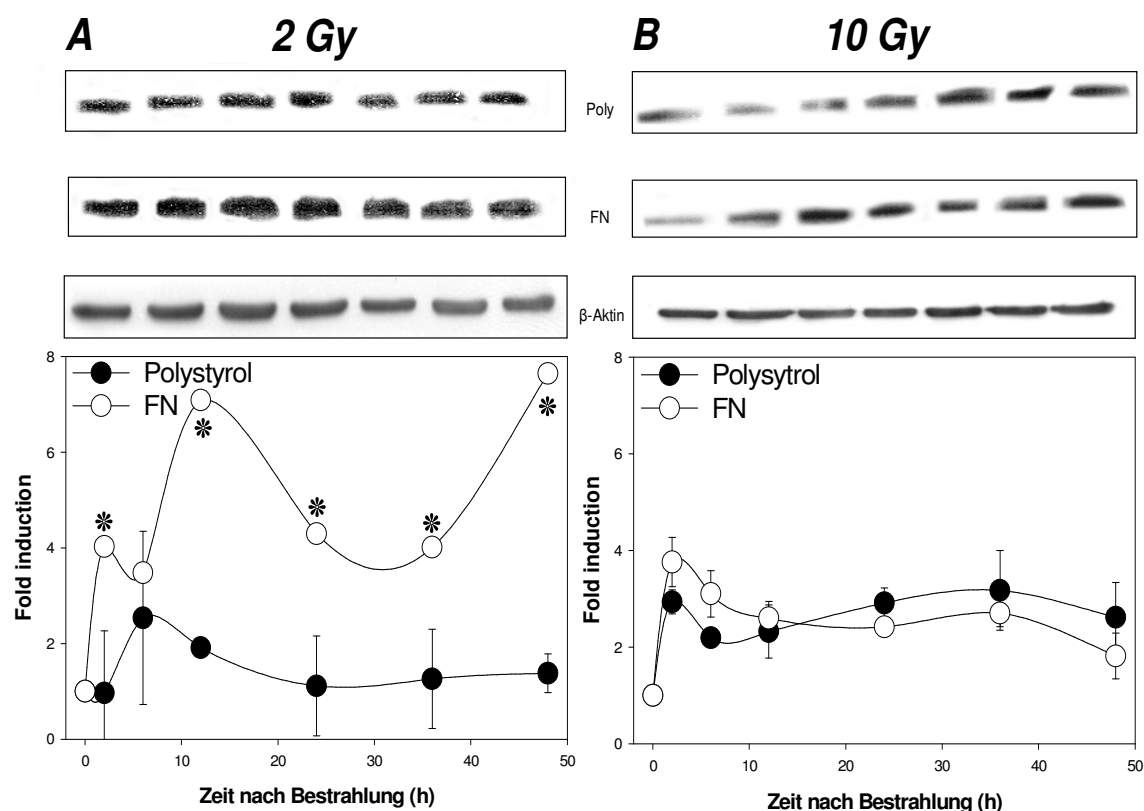


Abb. 10: Expressionsmuster des proapoptotischen Bax (23 kDa) in Abhängigkeit des Substrates mittels Western Blot.

Die Bestrahlung mit 2 Gy (Abb. 10A) führte zu einem statistisch signifikant höherem Bax-Expressionsanstieg bei HL60-Zellen mit FN-Kontakt im Vergleich zur PS-HL60-Zellfraktion (* $p < 0,04$), bei der sich nur unwesentliche Änderungen im Bax-Expressionsverhalten detektieren ließen. Nach Bestrahlung mit 10 Gy (Abb. 10B) ließen sich keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen PS und FN detektieren. Bax wurde mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers aus dem Gesamtzelllysat ermittelt. Als Ladungskontrolle diente die Inkubation mit einem β -Actin-Antikörper. Anmerkung: Fold induction entsprechend einem Vielfachem der unbestrahlten Kontrolle.

Nach Bestrahlung von HL60-Zellen mit 2 Gy konnten statistisch signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Bax-Expression zwischen PS und FN nachgewiesen werden ($p < 0,04$; Abb. 10A). HL60-Zellen mit Kontakt zu PS

zeigten eine leichte Zunahme der Bax-Expression auf einen Maximalwert sechs Stunden p. i.. Danach kehrte die Expression von Bax auf ihren Ausgangswert zurück und blieb konstant bis 48 Stunden p. i. auf diesem Niveau, welches statistisch signifikant niedriger lag als das der FN-HL60-Zellfraktion ($p < 0,04$).

Bei HL60-Zellen, die auf FN wuchsen, ließ sich ein zweigipfliger Expressionsanstieg von Bax im Anschluss an die Bestrahlung mit 2 Gy detektieren. Sofort nach Strahlenexposition nahm die Bax-Expression deutlich zu und erreichte 12 Stunden p. i. ihren ersten Maximalwert, der signifikant höher im Vergleich zur PS-HL60-Zellfraktion lag ($p < 0,04$). Anschließend fiel die Bax-Expression, ehe sie 36 Stunden nach Bestrahlung erneut statistisch signifikant anstieg und 48 Stunden p. i. ihren zweiten Maximalwert erreichte ($p < 0,04$).

Die Expression von proapoptotischen Bax war bei HL60-Zellen mit FN-Kontakt signifikant höher als bei der PS-HL60-Zellfraktion. Wie schon bei den Untersuchungen zur Expression von Bcl-2 zeigte sich auch hier kein positiver Effekt des FN auf das Zellüberleben von HL60-Zellen nach Strahlenexposition. Diese Ergebnisse stehen im deutlichen Widerspruch zu allen anderen bisher durchgeführten Untersuchungen und müssen kritisch diskutiert werden (siehe unter VII).

Im Anschluss wurden HL60-Zellen mit 10 Gy bestrahlt (Abb. 10B). Dabei zeigten sich keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen PS und FN. In beiden Fällen kam es im Anschluss an die Strahlenexposition mit 10 Gy zu einer leichten Zunahme der Bax-Expression auf einen Maximalwert zwei Stunden p. i.. Danach kehrten die Werte in etwa auf ihr Ausgangsniveau zurück, das sie bis 48 Stunden nach Bestrahlung ohne nennenswerte Unterschiede zwischen PS und FN beibehielten.

6.3.4.3. Der Bcl-2/Bax-Quotient – Maßstab für das Zellüberleben

Der Quotient aus Bcl-2 zu Bax ist ein Index für das Zellüberleben. Ein hohes Bcl-2/Bax-Verhältnis (Quotient > 1) spricht nach der Literatur für ein günstiges Verhältnis dieser Moleküle im Sinne einer Apoptosehemmung, ein niedriges Bcl-2/Bax-Verhältnis (Quotient < 1) wird im entgegengesetzten Sinne interpretiert.

Abb. 11 zeigt den zeitlichen Verlauf nach Strahlenexposition mit 2 Gy (Abb. 11A) sowie 10 Gy (Abb. 11B) der Bcl-2/Bax-Quotienten in Abhängigkeit des Substrates. Die Werte der Bcl-2/Bax-Quotienten wurden aus den Ergebnissen der Expressionsuntersuchungen zu Bcl-2 (6.3.4.1.) sowie zu Bax (6.3.4.2.) berechnet. Auf den Ordinaten ist die Zeit nach Bestrahlung in Stunden aufgetragen, die Abszissen repräsentieren die Bcl-2/Bax-Quotienten.

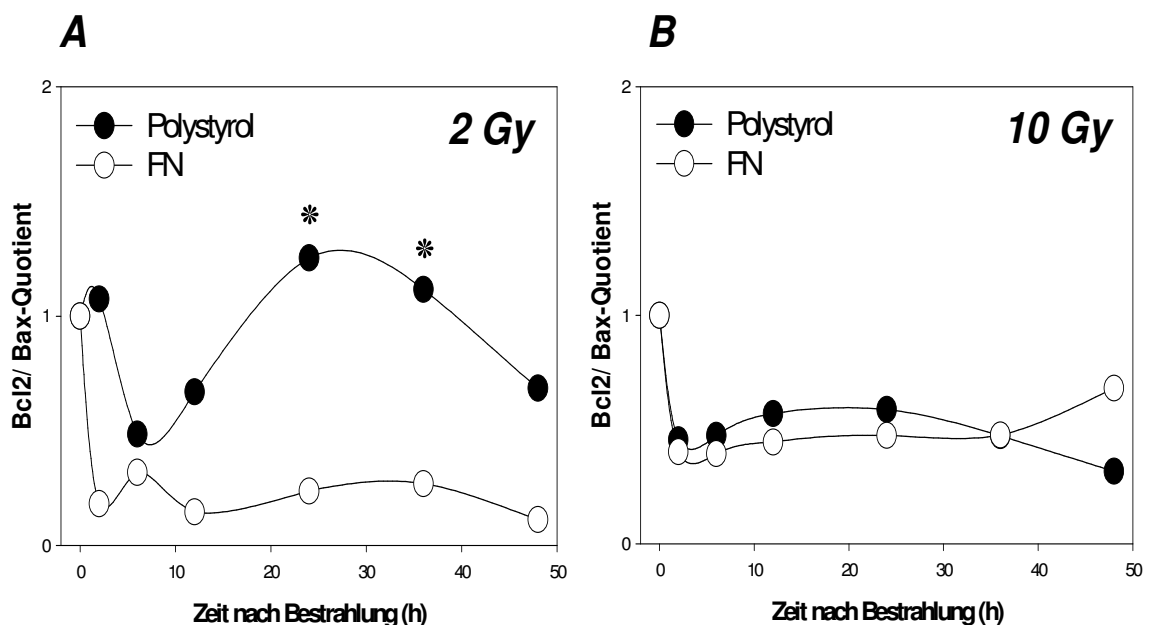


Abb. 11: Der Bcl-2/Bax-Quotient – Maßstab für ein molekulares pro- oder antiapoptisches Verhältnis.

Der Quotient aus Bcl-2 zu Bax ist ein Index für das Zellüberleben: ein Quotient > 1 bedeutet ein verbessertes Zellüberleben p. i., ein Quotient < 1 steht für ein vermehrtes Eintreten in die Apoptose nach Bestrahlung. Die Berechnungen des Bcl-2/Bax-Quotienten nach Strahlenexposition mit 2 Gy (Abb. 11A) ergaben ab 20 Stunden p. i. statistisch signifikante Unterschiede zwischen PS und FN (* $p_{24h} < 0,03$; * $p_{36h} < 0,04$). Während der Quotient bei HL60-Zellen mit FN-Kontakt stets < 1 blieb, erreichte er bei der PS-HL60-Zellfraktion nach etwa 20 Stunden p. i. Werte > 1 . Die Bestrahlung mit 10 Gy (Abb. 11B) lieferte keine relevanten Unterschiede zwischen PS und FN. In beiden Fällen blieb der Quotient < 1 , mit annähernd identischem Verlauf über 48 Stunden p. i..

Bei der Bestrahlung von HL60-Zellen mit 2 Gy (Abb. 11A) ließen sich nach etwa 20 Stunden p. i. statistisch signifikante Unterschiede zwischen PS und FN berechnen ($p_{24h} < 0,03$; $p_{36h} < 0,04$). Bis 20 Stunden nach Strahlenexposition mit 2 Gy lagen die Werte des Bcl-2/Bax-Quotienten sowohl für HL60-Zellen, die auf PS wuchsen, als auch für HL60-Zellen mit FN-Kontakt unter 1, wobei die Werte der PS-HL60-Zellfraktion über denen der FN-HL60-Zellfraktion lagen.

Während die Werte des Bcl-2/Bax-Quotienten für HL60-Zellen mit FN-Kontakt für den weiteren zeitlichen Verlauf bis 48 Stunden p. i. deutlich < 1 blieben, erreichte der Bcl-2/Bax-Quotient der PS-HL60-Zellfraktion etwa 20 Stunden nach

Bestrahlung mit 2 Gy Werte > 1 , mit einem Spitzenwert 24 Stunden p. i., welcher signifikant höher war als der der FN-HL60-Zellfraktion ($p < 0,03$). Bis rund 40 Stunden p. i. blieb der Bcl-2/Bax-Quotient für HL60-Zellen mit PS-Kontakt > 1 , dann sank er wieder auf Werte unter 1. Ob diese Berechnungen für ein vermehrtes Zellüberleben der HL60-Zellen mit PS-Kontakt einerseits sowie für ein vermehrtes Eintreten der FN-HL60-Zellfraktion in die Apoptose andererseits sprechen, muss weiter gründlich untersucht werden.

Die Berechnungen der Bcl-2/Bax-Quotienten nach Strahlenexposition mit 10 Gy ergaben keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen PS und FN (Abb. 11B). Für beide Wachstumsbedingungen lagen die Werte bis 48 Stunden p. i. stets < 1 , ohne nennenswerte Unterschiede.

6.3.4.4. Die Rolle der Mitochondrien

Der intrinsische Signaltransduktionsweg verläuft über die Mitochondrien (siehe auch III, 3.4.5.). In diesem Signalweg ist eines der Schlüsselereignisse die Veränderung der Permeabilität der inneren sowie der äußeren mitochondrialen Membran. Die Permeabilisierung der äußeren Membran führt zur Freisetzung von mitochondrialen Proteinen wie Cytochrom c. Die Erhöhung der Durchlässigkeit der inneren Membran ist durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) gekennzeichnet.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Anwesenheit von FN zu Veränderungen der Permeabilität sowohl der inneren als auch der äußeren Mitochondrienmembran nach Strahlenexposition und damit zu Unterschieden im Expressionsmuster von Cytochrom c sowie in der Höhe des $\Delta\psi_m$ beitragen kann.

6.3.4.4.1. Veränderungen an der äußeren mitochondrialen Membran – Cytochrom c-Expression

Mittels Western Blot wurde die Expression von Cytochrom c untersucht.

Die zeitabhängige Expression von Cytochrom c (15 kDa) nach Strahlenexposition mit 2 Gy sowie 10 Gy wurde mittels eines monoklonalen Antikörpers im Gesamtzelllysat ermittelt. In Abb. 12 sind die Ergebnisse in Abhängigkeit des Substrates dargestellt.

Die Beschriftungen sind analog zu den übrigen Western Blot-Untersuchungen.

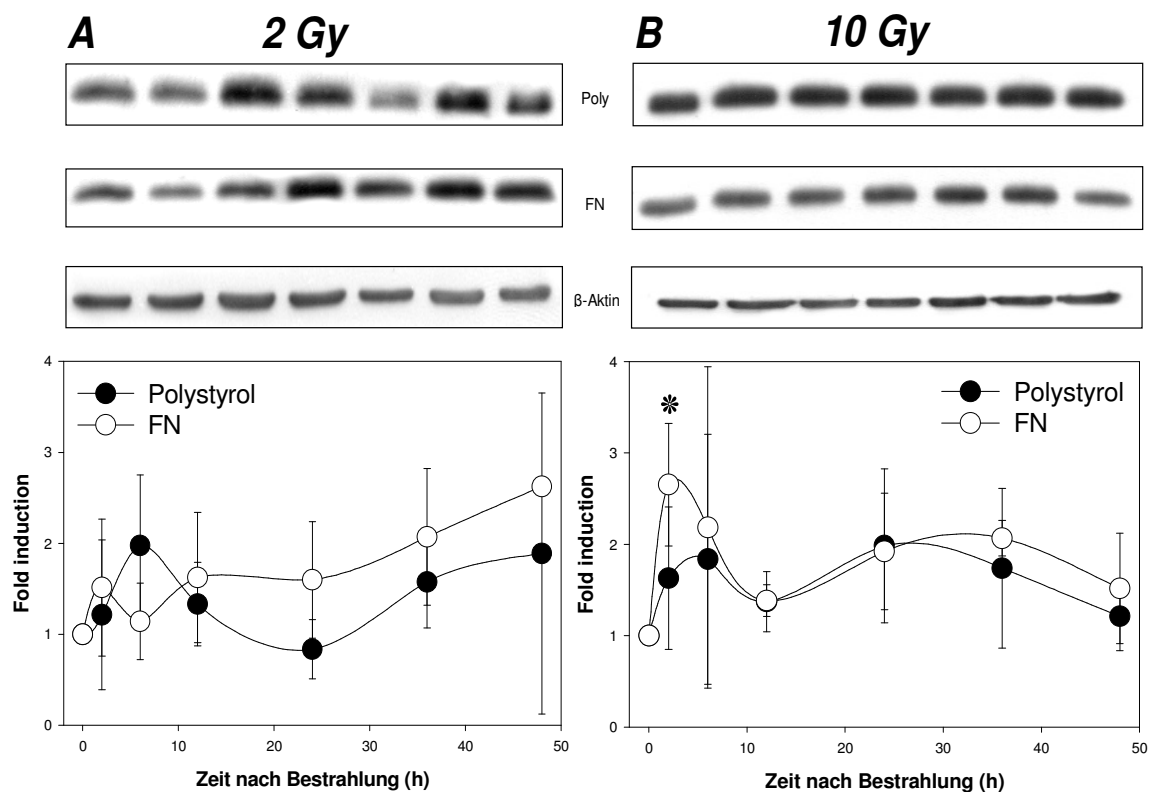


Abb. 12: Expressionsmuster des Cytochrom C (15 kDa) in Abhängigkeit des Substrates mittels Western Blot.

Die Expression von Cytochrom c wurde mit einem monoklonalen Antikörper aus dem Gesamtzelllysats bestimmt. Nach Bestrahlung mit 2 Gy (Abb. 12A) konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen PS und FN detektiert werden, allerdings die Tendenz der FN-Fraktion zur sofortigen und höheren Expression von Cytochrom c nach Strahlenexposition. Nach Bestrahlung mit 10 Gy (Abb. 12B) zeigten HL60-Zellen mit Kontakt zu FN eine statistisch signifikant erhöhte Expression von Cytochrom c, allerdings nur innerhalb der ersten 12 Stunden p. i. (* $p_{2h} < 0,03$). Als Ladungskontrolle diente die Inkubation mit β -Aktin. Anmerkung: Fold induction entsprechend einem Vielfachen der unbestrahlten Kontrolle

Zunächst wurden zwei HL60-Zellfraktionen – die eine mit Kontakt zu PS, die andere mit Kontakt zu FN – mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt (Abb. 12A). Bei den Zellen, die in Kontakt mit PS standen, zeigte sich sofort im Anschluss an die Strahlenexposition mit 2 Gy ein leichter Anstieg der Expression von Cytochrom c bis zwei Stunden p. i.. Danach erfolgte ein deutlicher Expressionsanstieg mit Maximalwert sechs Stunden nach Bestrahlung. Anschließend fiel das Signal, mit Erreichen eines Minimalwertes 24 Stunden p. i., bevor es bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes 48 Stunden nach Strahlenexposition wieder zunahm. Im Vergleich dazu zeigte die HL60-Zellfraktion, die auf FN ausgesät war, keine statistisch relevanten Unterschiede. Allerdings verlief der Expressionsanstieg von Cytochrom c direkt im Anschluss an die Bestrahlung bis zwei Stunden p. i. deutlich stärker als in der PS-Zellfraktion. Nach einem kurzen Abfall des Expressionssignals sechs Stunden nach Strahlenexposition zeigte sich im weiteren Zeitverlauf ein stetiger und zum Schluss (48 Stunden p. i.) recht

deutlicher Anstieg der Expression von Cytochrom c, der ab 12 Stunden nach Bestrahlung stets über der Cytochrom c-Expression von HL60-Zellen mit PS-Kontakt lag.

Die Ergebnisse nach Bestrahlung mit 2 Gy lieferten eine erhöhte Expression von Cytochrom c aus den Mitochondrien für HL60-Zellen, die in Kontakt mit FN standen, allerdings ohne statistische Signifikanz. Zur genaueren Verifizierung dieser Tendenz wurden HL60-Zellen substratabhängig mit 10 Gy bestrahlt (Abb. 12B).

Diese Untersuchungen zeigten eine zeitabhängige Expressionssteigerung von Cytochrom c mit statistisch signifikanten Unterschieden zwischen PS und FN, zumindest in den ersten Stunden nach Strahlenexposition ($p_{2h} < 0,03$). Bei der PS-Fraktion konnte man eine deutliche Expressionszunahme von Cytochrom c bereits zwei Stunden p. i. detektieren. Dieser Anstieg der Expression setzte sich bis sechs Stunden nach Bestrahlung fort. Nach einem Abfall des Signals 12 Stunden p. i. ließ sich nach 24 Stunden ein zweiter Maximalwert der Cytochrom c-Expression detektieren, ehe das Signal bis 48 Stunden nach Strahlenexposition wieder schwächer wurde.

Dagegen zeigte sich bei HL60-Zellen mit Kontakt zu FN ein extrem starker Anstieg der Cytochrom c-Expression sofort im Anschluss an die Bestrahlung mit 10 Gy auf einen Maximalwert zwei Stunden p. i.. Dieser Anstieg war statistisch signifikant höher als bei der PS-Fraktion ($p_{2h} < 0,03$). Im Anschluss fiel die Intensität des Signals auf einen Minimalwert nach 12 Stunden p. i. Danach zeigten sich keinerlei Unterschiede mehr im Expressionsverhalten im Vergleich zur PS-Fraktion.

HL60-Zellen mit Kontakt zu FN zeigten eine statistisch signifikant erhöhte Expression von Cytochrom c sofort nach Bestrahlung mit 10 Gy im Vergleich zu HL60-Zellen, die auf PS wuchsen. Diese Unterschiede im Expressionsmuster sind nur bis 12 Stunden p. i. detektierbar, anschließend verlaufen die Signale ähnlich. Ob die FN-HL60-Zellfraktion mit ihrer verstärkten Cytochrom c-Expression auch verstärkt in die Apoptose eintritt, war Gegenstand der nachfolgenden Untersuchungen (siehe 6.3.4.4.2. sowie 6.4.).

6.3.4.4.2. Veränderungen an der inneren Mitochondrienmembran anhand durchflusszytometrische Analysen des transmembranen Mitochondrienpotentials ($\Delta\psi_m$)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können sowohl die Expression und die Dichte von Proteinen auf der Zelloberfläche sowie in der Zelle, als auch Potentiale an Membranen und Zellorganellen untersucht werden.

Im Rahmen der strahleninduzierten Apoptose kommt es zu einem Zusammenbruch des $\Delta\psi_m$. Im Folgenden wurde untersucht, ob dies auch für HL60-Zellen zutrifft und inwiefern die Anwesenheit von FN in diesen Prozess beeinflussend einzugreifen vermag.

Das $\Delta\psi_m$ ist stark negativ geladen. Es stellt damit eine Triebkraft für die Ansammlung von Kationen in den Mitochondrien dar. Lipophile, kationische Verbindungen können die Mitochondrienmembran durchdringen und akkumulieren in Abhängigkeit der Höhe des $\Delta\psi_m$ im Inneren der Mitochondrien. Dies gilt auch für den Farbstoff Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE). In niedriger, genau definierter Konzentration eingesetzt (siehe unter V, 5.9.3.2.), korreliert die Fluoreszenz von mit TMRE-beladenen Zellen gut mit dem $\Delta\psi_m$, wobei das Plasmamembranpotential außer Acht gelassen werden kann. Der Zusammenbruch des $\Delta\psi_m$ infolge Strahlen induzierter Apoptose führt zu einer Reduktion der Triebkraft für die Aufnahme von TMRE in die Mitochondrien und somit zu einem geringeren messbaren Signal am Durchflusszytometer.

In Abb. 13 sind die zeitlichen Veränderungen der Fluoreszenzintensität des TMRE in Abhängigkeit des Substrates für die Bestrahlungsdosen von 2 Gy (Abb. 13A) sowie 10 Gy (Abb. 13B) dargestellt. Die Abszissen repräsentieren die Zeit p. i. in Stunden, die Ordinaten die Fluoreszenzintensität des TMRE, gemessen im Fluoreszenz-2-Kanal am FACSCalibur, bezogen auf eine unbestrahlte Kontroll-Zellpopulation in Prozent.

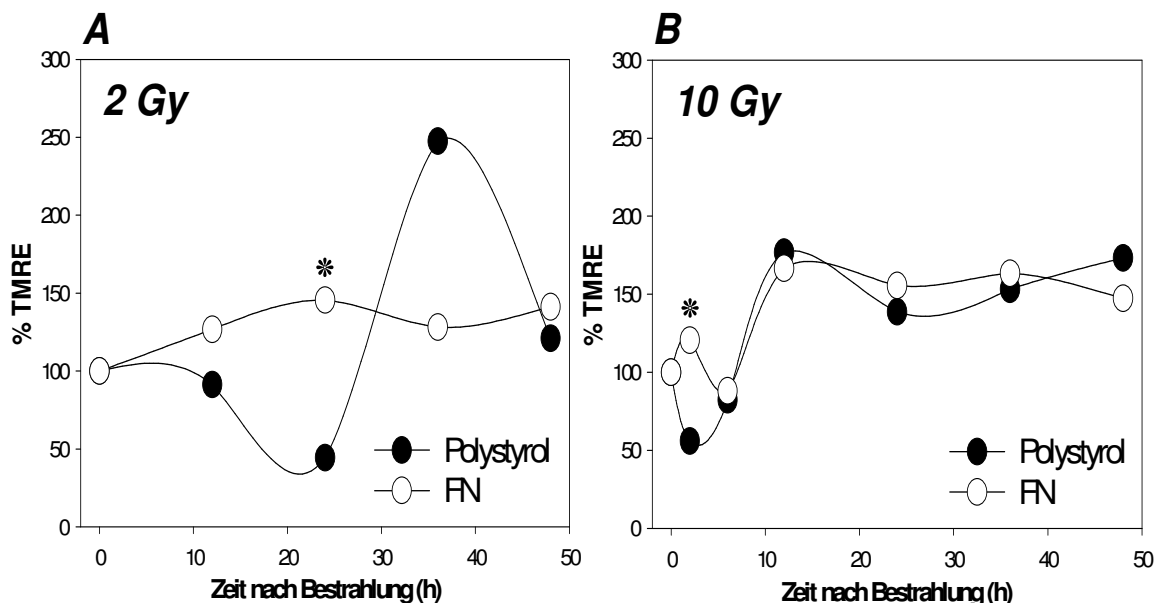


Abb. 13: Adhäsionsbedingte Veränderungen in der Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges, gemessen an der Stärke des $\Delta\psi_m$ – Ergebnisse der Durchflusszytometrie.

Nach Bestrahlung mit 2 Gy sowie 10 Gy wurde der Einfluss des FN auf die mitochondriale Integrität durchflusszytometrisch nach Anfärben von HL60-Zellen mit dem Farbstoff TMRE analysiert. Zellen mit intaktem $\Delta\psi_m$ weisen eine höhere Farbintensität auf als Zellen, in denen das $\Delta\psi_m$ zusammengebrochen ist.

Die Anwesenheit von FN führte bei Bestrahlungen mit 2 Gy zu einem signifikant verzögerten Eintreten in die Apoptose, gemessen an der Integrität der Mitochondrien (Abb. 13A, * $p < 0,02$). Dagegen konnte nach Bestrahlung mit 10 Gy nur ein kurzfristige Verzögerung beim Apoptoseeintritt aus dem Kontakt mit FN gezogen werden, welcher allerdings relativ deutlich war (Abb. 13B, * $p < 0,39$).

Bei einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy kam es bei auf PS wachsenden HL60-Zellen bereits nach 6 Stunden p. i. zu einer Abschwächung des TMRE-Signals, welche nach 12 Stunden immer deutlicher zu tage trat und schließlich 24 Stunden nach Strahlenexposition ihren tiefsten Wert erreichte (Abb. 13A). Das bedeutete, dass zu diesem Zeitpunkt ein Großteil der HL60-Zellen unter Zusammenbruch des $\Delta\psi_m$ in die Apoptose eingetreten ist. Der deutliche Signalanstieg 36 Stunden p. i. ließ sich dadurch erklären, dass durch den Zellzerfall der Farbstoff TMRE wieder freigesetzt und dadurch ein starkes Fluoreszenzsignal gemessen wurde. Im Gegensatz dazu kam es bei HL60-Zellen, die Kontakt mit FN hatten, zu keinem Signalverlust des TMRE nach Strahlenexposition. Die Fluoreszenzintensität des TMRE blieb bis 48 Stunden p. i. relativ konstant auf gleichem Niveau und unterscheidet sich signifikant von dem Signalverlust der auf PS wachsenden Zellen ($p < 0,02$). Es kam bei HL60-Zellen mit FN-Interaktionen nicht zu einem Zusammenbruch des $\Delta\psi_m$ und folglich auch nicht zu einem Eintreten in die Apoptose.

Ebenso wie bei den vorangegangenen Versuchsmethoden wurden zur weiteren Beleuchtung und Verdeutlichung des Zellüberleben fördernden Einflusses des FN auf HL60-Zellen nach Strahlenexposition die Untersuchungen zum $\Delta\psi_m$ zusätzlich mit einer Bestrahlungsdosis von 10 Gy durchgeführt (Abb. 13B). Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy traten die Veränderungen am $\Delta\psi_m$ nach Bestrahlung mit 10 Gy zeitlich wesentlich früher, dafür aber nicht ganz so deutlich zu tage. Die Fluoreszenzintensität des TMRE nahm bei HL60-Zellen, die Kontakt mit PS hatten, sofort nach Strahlenexposition ab und erreichte bereits nach zwei Stunden ihren tiefsten Wert. Man konnte folglich davon ausgehen, dass zwei Stunden p. i. die Integrität der Mitochondrien und damit das $\Delta\psi_m$ von auf PS wachsenden HL60-Zellen zerstört und ein Großteil der Zellen in Apoptose eingetreten war. Nach Ablauf der zwei Stunden zeigte sich ein starker Anstieg der Fluoreszenz, wobei es sich auch hier um das oben geschilderte Phänomen handeln dürfte, dass nach dem Zellzerfall aller Farbstoff wieder freigesetzt wurde und somit zu einem starken Signal führte.

Zell-FN-Kontakte führten bei einer Strahlenexposition von 10 Gy zu einem verzögerten Eintreten in die Apoptose. Wie in Abb. 13B ersichtlich ist, nahm das Fluoreszenzsignal bis zwei Stunden p. i. zunächst zu, ehe es im Anschluss abnahm, um schließlich sechs Stunden nach Strahlenexposition seinen Minimalwert zu erreichen. Das bedeutet, dass die Integrität der Mitochondrien von HL60-Zellen, die auf FN wuchsen, zumindest kurzfristig nach Bestrahlung mit 10 Gy statistisch signifikant erhöht war, als es bei HL60-Zellen mit Kontakt zu PS der Fall war ($p < 0,39$).

Im längerfristigen Überleben nach 10 Gy-Strahlendosis zeigten sich keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Zellkulturen auf FN und PS.

Die durchflusszytometrischen Messungen des $\Delta\psi_m$ bestätigten für Bestrahlungsdosen von 2 Gy die aus den vorherigen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse, dass die Anwesenheit von FN das Zellüberleben von HL60-Zellen nach Bestrahlung positiv beeinflusst. Für 10 Gy sind diese Zusammenhänge auf molekularer Ebene nicht eindeutig.

6.4. Exekution der Apoptose - Durchflusszytometrische Messungen der Caspasenaktivität

Das Ziel dieser FACS-Untersuchungen bestand darin, den bereits dargestellten adhäsionsbedingten Veränderungen von HL60-Zellen nach Strahlenexposition an der Endstrecke des Apoptosesignalweges, der Caspasenkaskade, nachzugehen, sie näher zu beleuchten und gegebenenfalls Unterschiede herauszustellen.

Die Aktivität von Caspasen lässt sich durchflusszytometrisch mit dem zellgängigen Peptid zVAD-FMK bestimmen (siehe auch V, 5.9.3.1.). Die Peptidsequenz VAD wird von aktiven Caspasen gebunden, was zu einer Zunahme des Fluoreszenzsignals führt. Je höher das Signal ist, desto größer ist die Aktivität der Caspasen. Dies kann im Fluoreszenz-1-Kanal am FACSCalibur gemessen werden.

Die Resultate der durchflusszytometrischen Untersuchungen sind in Abb. 14 dargestellt. Sie zeigt den zeitlichen Verlauf der Caspasenaktivitäten von HL60-Zellen in Abhängigkeit des Substrates nach Strahlenexposition mit 2 Gy (Abb. 14A) sowie mit 10 Gy (Abb. 14B). Auf den Abszissen ist die Zeit nach Bestrahlung in Stunden, auf den Ordinaten die Fluoreszenzintensität aktiver, an VAD gebundener Caspasen in Prozent aufgetragen, bezogen auf eine unbestrahlte Kontroll-Zellsuspension.

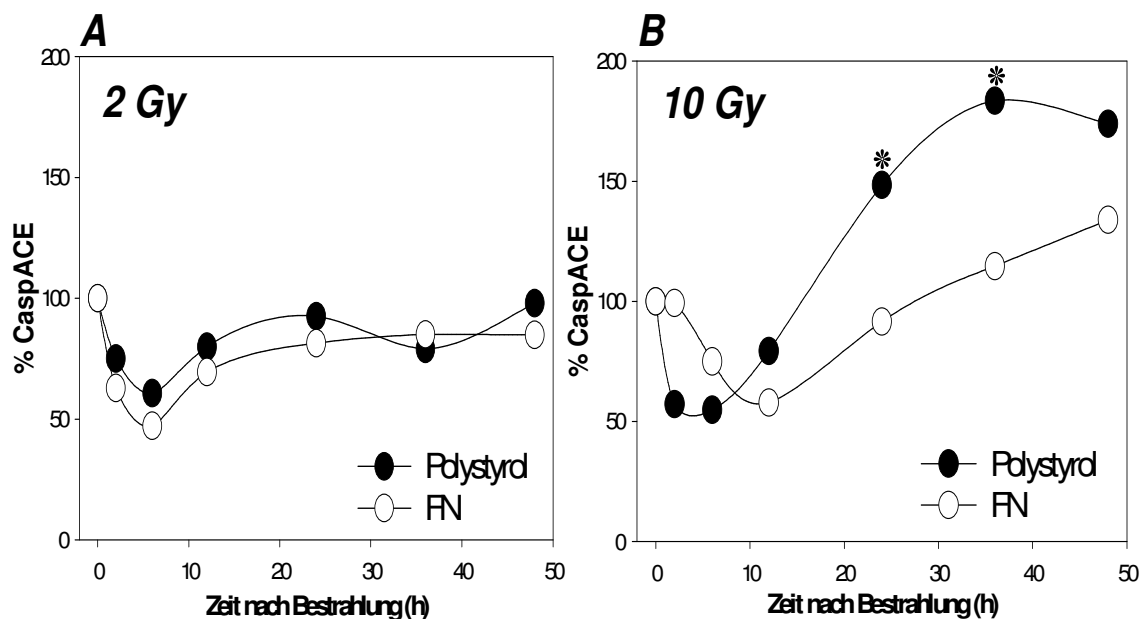


Abb. 14: Adhäsionsbedingte Veränderungen in der Aktivierung der Caspasenkaskade – Durchflusszytometrische Messungen der Caspasenaktivitäten.

Während die Bestrahlung mit 2 Gy keine statistisch relevanten Unterschiede in den Caspasenaktivitäten zwischen PS und FN lieferte (Abb. 14A), zeigte sich bei einer Strahlendosis von 10 Gy ein statistisch hoch signifikanter Unterschied zwischen PS und FN (* $p < 0,01$; Abb. 14B). Die PS-HL60-Zellfraktion trat bereits sechs Stunden p. i. vermehrt in die Apoptose ein, erkennbar an einem starken Anstieg des Fluoreszenzsignals. Dagegen stieg das Fluoreszenzsignal bei HL60-Zellen mit Kontakt zu FN nur wenig an, im Sinne einer adhäsionsbedingten Apoptoseresistenz.

Aus der Bestrahlung von HL60-Zellen mit einer Dosis von 2 Gy resultierten keine statistisch signifikanten Erkenntnisse (Abb. 14A). Sowohl HL60-Zellen mit Kontakt zu FN als auch HL60-Zellen, die auf PS wuchsen, zeigten einen annähernd gleichen Verlauf der zeitabhängigen Entwicklung der Caspasenaktivitäten p. i.. In beiden Zellfraktionen schwankte die Zu- und Abnahme der Caspasenaktivitäten im Bereich der Spontanapoptose, die physiologischerweise stets vorhanden ist. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorherigen Untersuchungen zeigte der Kontakt von HL60-Zellen zu FN kein verbessertes Zellüberleben nach Strahlenexposition mit 2 Gy im Sinne einer geringeren Apoptoserate mit reduzierten Caspasenaktivitäten. Ebenso wenig resultierte für HL60-Zellen, die auf PS wuchsen, ein erhöhtes Eintreten in die Apoptose p. i. mit einem Anstieg der Caspasenaktivitäten, was nach den bisher gewonnenen Erkenntnissen zu vermuten gewesen wäre.

Zur weiteren Untersuchung erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Caspasenaktivitäten nach Strahlenexposition mit 10 Gy (Abb. 14B). Hierbei zeigten sich statistisch hoch signifikante Unterschiede der Caspasenaktivitäten p.

i. zwischen HL60-Zellen mit PS-Kontakt und denjenigen, die auf FN wuchsen ($p < 0,01$).

Bereits sechs Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gy kam es in der PS-HL60-Zellfraktion zu einer deutlichen Zunahme des Fluoreszenzsignals. Es zeigte sich ein rasanter Anstieg der Fluoreszenz von knapp 50% bis auf einen Maximalwert von rund 180% 36 Stunden p. i.. Auch danach, bis 48 Stunden nach Strahlenexposition, blieb das Fluoreszenzsignal nahezu unverändert hoch.

Im Gegensatz dazu setzte bei HL60-Zellen mit Kontakt zu FN erst 12 Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gy ein träger Anstieg der Caspasenaktivitäten ein, der bis 48 Stunden p. i. nur wenig zunahm.

Diese Ergebnisse unterstreichen den antiapoptotischen Effekt der FN-Adhäsion auf HL60-Zellen nach Strahlenexposition, korrelieren jedoch nicht mit Untersuchungen zum mitochondrialen Membranpotential. Der FN-Kontakt reduziert signifikant die Caspasenaktivität im Vergleich zu HL60-Zellen mit Kontakt zu PS ($p < 0,01$).

6.5. Untersuchungen zur Zellmorphologie und zur Lokalisation ausgewählter Zellproteine an bestrahlten HL60-Zellen mittels Immunfluoreszenz

Zur visuellen Darstellung der bereits untersuchten Proteine Bax und Cytochrom c sowie des mitochondrialen Membranpotentials erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung dieser Strukturen. Dabei wurde die Lokalisation der einzelnen Proteine innerhalb der Zelle, ihre Lokalisation zueinander und mögliche Veränderungen nach Strahlenexposition untersucht.

Bax ist zunächst zytosolisch lokalisiert, bevor es aktiviert wird und zu den Mitochondrien translokalisiert. Auf die Lokalisation sowie Bedeutung von Cytochrom c wurde bereits ausführlich unter 6.3.4.4.1. eingegangen.

Abb. 15 zeigt die Ergebnisse der immunfluoreszenz-basierten Untersuchungen nach Bestrahlung von HL60-Zellen mit 10 Gy. Dabei sind in Abb. 15A die Ergebnisse für FN, in Abb. 15B diejenigen für PS dargestellt.

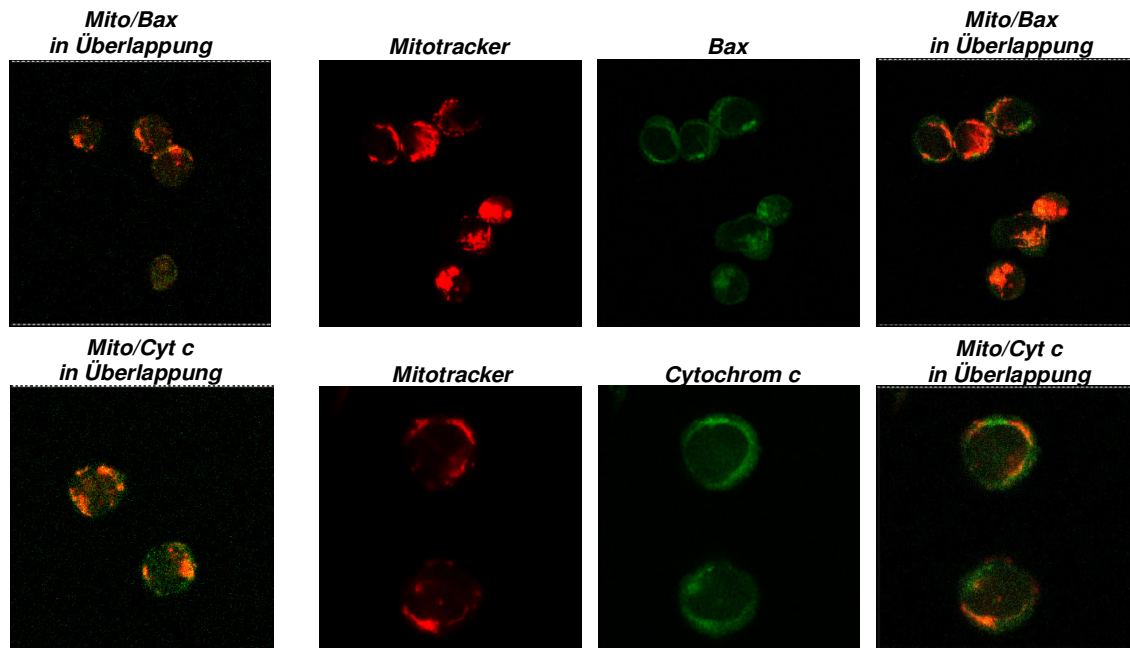
Kontrolle**Fibronektin**

Abb. 15A: Lokalisation von Bax und Cytochrom c sowie Integrität der Mitochondrien mittels Mitotracker nach Strahlenexposition mit 10 Gy in Anwesenheit von FN – Ergebnisse der Immunfluoreszenz.

Nach Immunfärbung wurde die zelluläre Lokalisation von Bax (grün), Cytochrom c (grün) und Mitotracker (rot) mittels konfokalem Laser Scanning bestimmt. Die Translokation von Bax (grün) in die Mitochondrien sowie die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien nach Bestrahlung mit 10 Gy wurde durch die Anwesenheit von FN deutlich reduziert. Zudem blieben die Mitochondrien intakt, erkennbar an der Anfärbung mit Mitotracker.

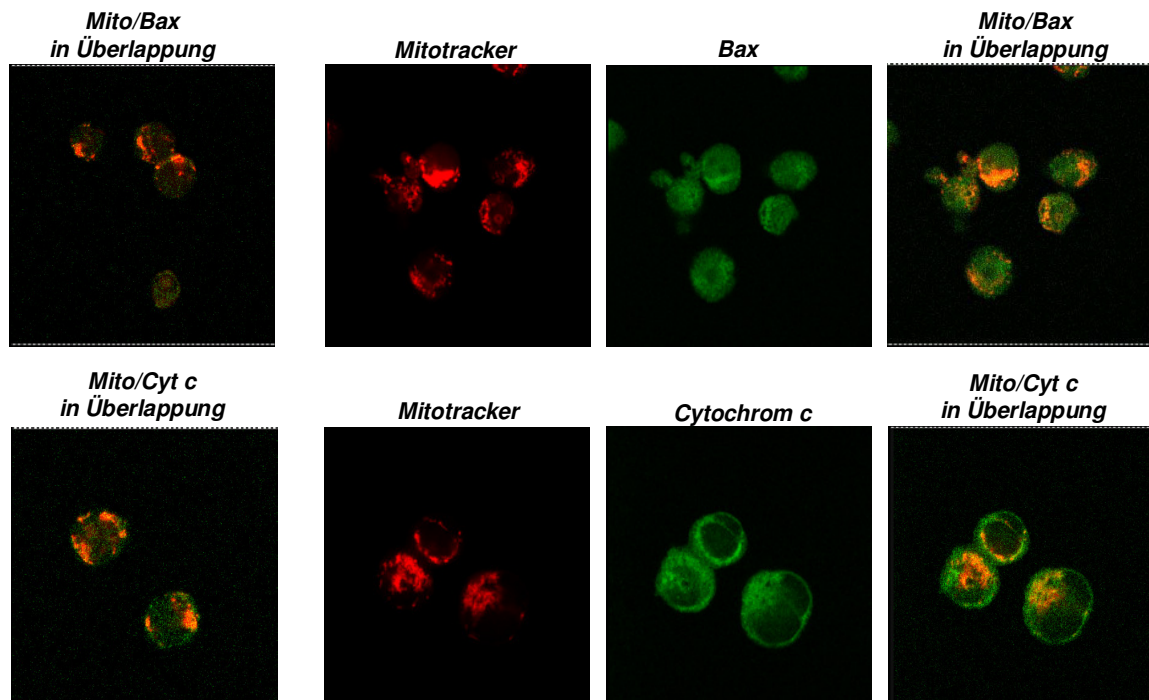
Kontrolle**Polystyrol**

Abb. 15B: Lokalisation von Bax und Cytochrom c sowie Integrität der Mitochondrien mittels Mitotracker nach Strahlenexposition mit 10 Gy in Abwesenheit von FN – Ergebnisse der Immunfluoreszenz.

Bei HL60-Zellen, die auf PS wuchsen, kam es unter Bestrahlung mit 10 Gy zur Translokation von Bax in die Mitochondrien sowie zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Im Anschluss traten die Zellen in die Apoptose ein.

Während bei HL60-Zellen, die auf PS wuchsen, die Bestrahlung mit 10 Gy eine Translokation des proapoptotischen Bax in die Mitochondrien sowie die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol mit nachfolgender Einleitung der Apoptose bewirkte, konnten diese Effekte für HL60-Zellen mit Kontakt zu FN nicht nachgewiesen werden. In Anwesenheit von FN kam es zu keinen wesentlichen Veränderungen in der zellulären Lokalisation von Bax und Cytochrom c. Zudem blieben die Mitochondrien intakt, sichtbar an der Anfärbung von HL60-Zellen mit Mitotracker. Während in der PS-Zellfraktion nach Bestrahlung die Fluoreszenz des Mitotrackers deutlich abnahm, blieb sie bei HL60-Zellen mit FN-Kontakt nahezu unverändert im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollzellpopulation.

Diese Ergebnisse belegen optisch den antiapoptotischen Effekt des FN auf das Zellüberleben von HL60-Zellen nach Bestrahlung.

VII. DISKUSSION

Die Adhäsion von Zellen an extrazelluläre Matrixproteine vermittelt neben Zellverhalten und Zellentwicklung auch ein erhöhtes Zellüberleben nach Bestrahlung im Sinne einer zelladhäsionsbedingten Radioresistenz. Dies gilt sowohl für normale Körperzellen als auch für transformierte Zellen, wobei die Integrin-vermittelte Signaltransduktion eine essentielle Rolle spielt [45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 59; 60; 86; 108; 117; 191; 211].

Für diesen überlebensfördernden Einfluss der Integrin-vermittelten Zell-EZM-Interaktionen nach Strahlenexposition wurde von Cordes und Meineke der Begriff der *cell adhesion-mediated radio resistance* (CAM-RR) geprägt [47]. Die dabei zugrunde liegenden Untersuchungen sind alle an adhärent wachsenden Zelllinien durchgeführt worden. Für Suspensionszellen liegen so gut wie keine Daten vor. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Fragestellung nachgegangen, ob die Phänomene der Integrin-vermittelten CAM-RR auch für die Suspensionszelllinie HL60 zutreffen, und über welche Schlüsselstellen der Integrinsignalkaskade sie vermittelt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Anwesenheit von FN an verschiedenen Stellen Einfluss auf die komplexen, Integrin-vermittelten Signalwege zur Regulation des Zellüberlebens von HL60-Zellen p. i. nehmen kann. Die bedeutensten Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen sind:

- a) *Die Anwesenheit von FN fördert das Zellüberleben von HL60-Zellen nach Bestrahlung, auch nach hohen Bestrahlungsdosen von 10 Gy im Sinne einer adhäsionsbedingten Radioresistenz.*
- b) *Der Kontakt von HL60-Zellen mit FN moduliert Schlüsselstellen im Verlauf der Integrinsignalkaskade.*
- c) *Die mitochondriale Apoptoseinduktion nach Strahlenexposition wird durch FN-Kontakte im Sinne eines verzögerten Eintritts in die Apoptose, zum Teil auch im Sinne einer gänzlichen Apoptoseinhibition beeinflusst.*
- d) *Die Anwesenheit von FN schützt, Integrin-vermittelt, HL60-Zellen vor dem Eintreten in den mitochondrialen (intrinsischen) Apoptoseweg, indem die Translokation von Bax in die Mitochondrien sowie die Freisetzung von*

Cytochrom c aus den Mitochondrien verhindert wird.

- e) *FN-Kontakt scheint desweiteren die Aktivierung von Caspasen durch Bestrahlung dosisabhängig abzuschwächen, ein Effekt, der in den Untersuchungen bezüglich strahlenabhängigen Zusammenbruchs des mitochondrialen Membranpotentials nicht beobachtet werden konnten.*

Akute myeloische Leukämien stellen eine hämatologische Neoplasie dar, bei welcher die Plasmakonzentration von FN um das 0,25- bis 4-fache im Vergleich zur physiologischen Plasmakonzentration (300 – 400 µg/ml) erhöht sind [42; 158; 164]. Dabei scheint die Anwesenheit von FN im Plasma im Bezug auf die FN-vermittelte Radioresistenz eine eher untergeordnete Rolle im Vergleich zum FN-Kontakt von HL60-Zellen während der Hämatopoese im Knochenmark sowie nach Metastasierung in die Körperperipherie zu spielen. Allerdings ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt, ob die biochemischen Signale, welche während der Zelladhäsion und –migration freigesetzt werden, unverzichtbare Voraussetzungen für das sogenannte *Outside-in signaling* in der Integrin-vermittelten Signalkaskade sind. Für Epithelzellen und Thrombozyten, nicht aber für Leukozyten und Leukämiezellen, gilt der Grundsatz, dass ihre Aktivierung über die Bindung von löslichen EZM-Proteinen an den Integrinrezeptor verläuft.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass die promyeloische, leukämische Zelllinie HL60 einerseits durch die ortständige Form des FN und andererseits zusätzlich durch lösliche, Integrin-stimulierende Peptide in ihrem Verhalten nach Strahlenexposition im Sinne einer Apoptoseinhibition beeinflusst werden kann. Unsere Daten zeigen deutlich, dass HL60-Zellen ausgesprochen empfänglich für Signale aus der EZM sind, und dass diese Signale, welche durch Zell-EZM-Adhäsionen gewonnen werden, einen bedeutenden Einfluss auf die Ausbildung einer zellulären Radioresistenz haben. In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Zell-EZM-Kontakte maßgeblich daran beteiligt sind, ob HL60-Zellen nach Strahlenexposition in Apoptose eintreten oder nicht [47; 48; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 59; 60; 108; 135; 208; 211].

Mould et al. konnten nachweisen, dass diese Effekte über $\beta 1$ -Integrin laufen, denn durch Antikörper gegen $\beta 1$ -Integrin konnte der positive Effekt des FN auf das HL60-Zellüberleben nach Bestrahlung inhibiert werden [152].

Zum ersten Mal konnte mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass über den FN/ $\beta 1$ -Integrin Signalweg in HL60-Zellen die strahleninduzierte Translokation von Bax in die Mitochondrien, die sich daran anschließende Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien sowie die Caspasenaktivierung als Endstrecke des Apoptosesignalweges effizient inhibiert werden kann. Sowohl FN als auch $\beta 1$ -Integrin scheinen die mitochondriale Apoptosesignalkaskade im Sinne einer Apoptoseinhibition zu modifizieren. Daten zur Integrin-vermittelten Modifikation des extrinsischen Apoptoseweges in bestrahlten Zellen liegen zur Zeit nicht vor. Die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien stellt dabei einen der Schlüsselschritte dar. Über dieses Ereignis liegen verschiedene Studien vor, mit kontroversen Ergebnissen. Während einige Gruppen mitochondriale Änderungen erst viel später nach Cytochrom c-Freisetzung und Caspasenaktivierung beobachteten, stellten andere Gruppen fest, dass der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) und die Freisetzung von Cytochrom c nahezu simultan erfolgen [195]. In unserem Zellsystem konnte nachgewiesen werden, dass in Anwesenheit von FN die Caspasenaktivierung sowie die Manifestation der apoptotischen Morphologie nach Bestrahlung ausbleiben und sekundär keine mitochondriale Schädigungen erfolgen.

Im Bezug auf die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie, insbesondere Bcl-2 selbst, konnten in dieser Arbeit die Erkenntnisse aus der Literatur nicht bestätigt werden. Mehrere Untersuchungen an leukämischen Zelllinien zeigten [60; 104; 211], dass die Anwesenheit von FN über Integrin-vermittelte Zelladhäsion in Leukämiezellen zu einer verminderten Expression von proapoptotischen Proteinen wie Bax, Bim oder Bid [92; 105] sowie zu einer verstärkten Expression von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2 [82; 83] führte. In diesem Zusammenhang wird auch der Bcl-2/Bax-Quotient größer 1, im Sinne eines verbesserten Zellüberlebens gegenüber zytotoxischen Substanzen wie Strahlung oder Chemotherapeutika.

Dabei vermag eine verstärkte Bcl-2-Expression, und vor allem eine Überexpression von Bcl-2, die strahleninduzierte Apoptose sowie die mitochondriale Depolarisation fast vollständig zu hemmen [1; 35]. In Leukämie- und Lymphomzellen führt eine Bcl-2-Überexpression nicht nur zur Strahlenresistenz, sondern verschlechtert zusätzlich die Prognose der Erkrankung enorm.

In unseren Untersuchungen bewirkte die Anwesenheit von FN genau das Gegenteil. Es kam unter FN zu einer reduzierten Bcl-2-Expression und damit zu einem Bcl-2/Bax-Quotienten kleiner 1. Ob das für HL60-Zellen bedeutet, dass FN unter gewissen Bedingungen eventuell eine proapoptotische Komponente besitzt, ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

In deutlicher Übereinstimmung mit Untersuchungen für adhärente Zelllinien bedeuten Zell-Matrix-Kontakte auch für in Suspension wachsenden Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber zytotoxischen Substanzen wie ionisierender Strahlung oder Chemotherapeutika.

In Leukämiezellen wird nach Strahlenexposition die Caspasensignalkaskade auf dem Weg zur finalen Apoptose in Gang gesetzt. Dabei kann die Aktivierung der Caspasen über den intrinsischen, mitochondrialen oder über den extrinsischen, über Zelltodrezeptoren vermittelten Signalweg erfolgen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass bei HL60-Zellen durch Zell-FN-Kontakte auf jeden Fall der intrinsische Apoptosesignalweg inhibierend beeinflusst wird. Dies lässt unterschiedliche Aktivierungen von Caspasen vermuten, was zeitlich unterschiedliches Eintreten in Apoptose oder sogar die Inhibition von Apoptose zur Folge haben könnte.

Somit scheint die Einteilung in extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweg eine Funktion und Folge von Zell-EZM-Kontakten sowie von Protein-Protein-Interaktionen zu sein.

Während der letzten 10 Jahre wurden enorme Fortschritte im Verständnis der molekularen Besonderheiten sowie der Unterschiede zwischen normalen Körperzellen und maligne entarteten Tumorzellen erzielt. Tumorzellen weisen

Defekte in wichtigen Regulationssystemen (Zellüberleben, Proliferation, Differenzierung, Homöostase) auf [121]. Diese Defekte ermöglichen es, dass Tumorzellen unabhängig von Wachstumsfaktoren und Gewebekontakten proliferieren, dass sie sich ungezielt vermehren und ins gesunde Gewebe metastasieren, und dass sie resistent gegenüber zytotoxischen Substanzen werden [101; 135]. In diese Prozesse sind viele Signalproteine verwickelt, die entweder durch Mutationen in bestimmten Genen per se verändert oder durch Signale aus dem Mikromilieu modifiziert werden. Die Entschlüsselung dieser Strukturen ist essentiell für das Verständnis von Tumorgenese, -wachstum und -metastasierung sowie für die Entwicklung neuer Ziel gerichteter Therapieoptionen.

Ob eine maligne entartete Zelle wachstumsfaktor- oder adhäsion-unabhängig wachsen und proliferieren kann, ist abhängig von der Anwesenheit von spezifischen Onkogenen oder von Mutationen in für die Adhäsion benötigten Genen. Onkogene wie *src* oder *Ras* werden als mitverantwortlich für wachstumsfaktor-unabhängiges Wachstum angesehen [122; 187]. Adhäsion-unabhängiges Wachstum wird mit Mutationen der kleinen GTPasen Rho oder anderen Mitgliedern der Rho-Familie (Cdc 42, Rac) in Verbindung gebracht [186]. Die Entwicklung von Resistenzen von Tumorzellen gegenüber Chemo- und Radiotherapie ist ebenfalls an das Vorhandensein bestimmter Onkogene und Mutationen gekoppelt. So wurden bisher als zytoprotektive Mechanismen für Tumorzellen identifiziert: a) die Überexpression von Resistenzgenen gegenüber Chemotherapeutika (z. B. *MDR 1*) [12], b) Mutationen der BCR-Abl-Kinase [154], oder c) Überexpressionen von Bcl-2-Onkogenen (siehe oben) [35].

Neben diesen Zellüberleben fördernden Genmutationen und Onkogenen nahm in jüngster Zeit das wissenschaftliche Interesse am zellulären Mikromilieu im Bezug auf unkontrollierte tumoröse Proliferation, Metastasierung sowie Veränderungen in der zellulären Antwort auf Bestrahlung sowie Chemotherapeutika sprunghaft zu [106; 160]. Zusätzlich zu Untersuchungen zur Angiogenese, Vaskularisation und Oxygenierung wurde die EZM als wichtiger Faktor bezüglich der zellulären Antwort von normalen und malignen Zellen gegenüber der Exposition mit zytotoxischen Substanzen (ionisierende Strahlung, Chemotherapeutika)

identifiziert [47; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 59; 60; 108; 137; 172]. Die Ergebnisse zahlreicher experimenteller Untersuchungen zeigten, dass die Anwesenheit von EZM-Proteinen Zellen – normalen wie auch malignen Zellen - einen gewissen Überlebensvorteil gegenüber zytotoxischen Substanzen verschafft, im Vergleich zu standardisierten *in vitro* Zellkulturbedingungen ohne EZM-Bestandteile. CAM-DR scheint also direkt durch Integrine vermittelt zu sein [47; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 59; 60; 108; 137]. Sethi et al (1999) konnten nachweisen, dass die Adhäsion von kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen an EZM-Proteine die Zellen gegenüber den Chemotherapeutika Doxorubicin, Etoposid, Cyclophosphamid und Cisplatin resistent macht [191]. Zudem wurde gezeigt, dass diese Effekte durch β 1-Integrin vermittelt werden können. Genau die gleichen Effekte wurden von Cordes et al (2003) in Bezug auf Strahlensensibilität und Radioresistenz durch β 1-Integrine gefunden [47].

Aufgrund der Schwierigkeiten in der Darstellung von positiven wie auch negativen Korrelationen zwischen Tumorprogression, -wachstum, –resistenz gegenüber zytotoxischen Substanzen und Integrinexpression, werden bereits vorhandene und neu gewonnene Ergebnisse nach wie vor kontrovers diskutiert. Diese Schwierigkeiten beruhen zum einen auf der großen Heterogenität der Tumoren und zum anderen auf der Tatsache, dass Änderungen im Expressionsniveau einzelner Integrin-Untereinheiten immer vor dem Hintergrund der Expression aller Integrine gesehen werden müssen. So scheint beispielsweise die Expression von α 2 β 1-Integrin die Metastasierung von Pankreaskarzinomen voranzutreiben, während die gleiche Untereinheit in Blut- und Kolonmalignomen herunterreguliert wird [6; 156]. Zum besseren Verständnis muss dazu die Familie der Integrine selbst genauestens betrachtet und diskutiert werden. Da es bereits mannigfaltige exzellente Übersichtsarbeiten über die physiologischen sowie pathologischen Funktionen der Integrine gibt [90; 91; 117; 118; 119; 120; 188; 190; 219; 226], lag der Fokus dieser Arbeit ausschließlich auf der Rolle der Integrine bei der Suspensionszelllinie HL60 nach Strahlenexposition in An- und Abwesenheit von FN. Bereits mehrere *in vitro* Experimente mit adhärennten Zellkulturen unterschiedlichster Herkunft zeigten, dass Bestrahlung zu einer signifikanten Hochregulation von β 1-, β 3- sowie α 5-Integrin-Untereinheiten an der

Zelloberfläche 48 – 96 Stunden p. i. führte [45; 47; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 108; 137]. Diese Hochregulation war stets Dosis- und häufig Matrix-abhängig. Auch in den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich eine starke Abhängigkeit des Zellüberlebens von der Bestrahlungsdosis. Mit zunehmender Strahlungsdosis traten mehr HL60-Zellen in die Apoptose ein, trotz Anwesenheit von FN. Allerdings zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied zu HL60-Zellen ohne Matrixkontakt.

Für Tumorprogression und die Fähigkeit, Organmetastasen zu bilden, sind neben einer veränderten Integrinexpression auch Veränderungen in den Aktivitäten Integrin-abhängiger Proteinkinasen richtungsweisend [163]. Daher lag ein weiteres Hauptaugenmerk dieser Arbeit auch auf der Aktivierung von Schlüsselproteinkinasen innerhalb der Integrinsignalkaskade (ILK, FAK) sowie auf eventuellen Veränderungen unter Bestrahlung in An- und Abwesenheit des physiologischen Matrixproteins FN.

Etliche Untersuchungen haben gezeigt, dass die Proteinkinasen ILK und FAK gegensätzlich an der zellulären Antwort auf Bestrahlung teilnehmen. Während ILK-Überexpression zu einer Erhöhung der Strahlensensibilität von beispielsweise A549 Bronchialkarzinom-Zellen führte, kam es in Zelllinien, in welchen FAK ausgeschaltet wurde, zu einem raschen Eintritt in Apoptose nach Bestrahlung [14; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 124].

ILK spielt eine entscheidende Rolle bei Tumorgenese, -wachstum sowie -metastasierung *in vitro* wie auch *in vivo* [221; 222]. Ausführliche Untersuchungen des β 1-Integrinsignalweges zeigten die enorme Bedeutung von ILK und nachgeschalteter GSK-3 β auf Zellüberleben und Apoptoseinhibition nach Bestrahlung [48]. Jüngste Untersuchungsergebnisse unserer Forschungsgruppe erhärten die Hypothese, dass ILK-Überexpression eine Sensibilisierung von sowohl normalen als auch malignen Zellen gegenüber ionisierender Strahlung vermittelt.

Eine weitere Schlüsselkinase in der Integrinsignalkaskade ist FAK. Etliche Untersuchungen mit FAK-defizienten Zelllinien wie den hier verwendeten HL60-Zellen bzw. mit Antikörpern gegen FAK, erbrachten den Nachweis, dass FAK

enorm wichtig für Zellbewegung, Zytoskelettorganisation sowie Zellüberleben ist [157; 225]. Bis dato gab es nur wenige Studien, welche die Interaktionen zwischen FAK und ionisierender Strahlung untersucht haben [14]. Dabei zeigte sich, dass infolge Bestrahlung der FAK-Paxillin-p130CAS Signalkomplex signifikant beeinflusst wird. Da genaue Einblicke in die Signalabläufe nach Bestrahlung fehlten, und da der Zusammenhang im Bezug auf CAM-RR noch gänzlich unerforscht war, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von FAK bei der zellulären Antwort von HL60-Zellen auf Bestrahlung näher untersucht werden. Leider ließ sich weder in unbestrahlten Kontrollzellpopulationen von HL60-Zellen noch in bestrahlten HL60-Zellen FAK nachweisen. So bleibt die Rolle der FAK und ihr Einfluss auf die CAM-RR in Suspensionszellen weiter ungeklärt und bedarf expliziter und detaillierter zusätzlicher Untersuchungen.

Zusammenfassend zeigen die hier erhobenen Daten große Übereinstimmungen mit Veröffentlichungen zu einer Vielzahl von anderen Tumorzelllinien, die ebenfalls die Abhängigkeit des apoptotischen Zelltodes von der Integrin vermittelten Zelladhäsion darstellen [135; 208].

Allerdings müssen vor dem Hintergrund unserer Erkenntnisse aus den hier gewonnenen Daten Resultate aus *in vitro* Zytotoxizitätsstudien ohne EZM diskutiert und kritisch hinterfragt werden. Unsere Ergebnisse an HL60-Zellen verdeutlichen zum wiederholten Mal den enormen Einfluss von Zell-EZM-Interaktionen auf das Zellüberleben sowie auf das apoptotische Verhalten nach Exposition von Zellen gegenüber zytotoxischen Substanzen. Somit könnten unserer Meinung nach Studien ohne EZM entweder falsch positiv oder falsch negativ ausfallen und sind ungeeignet zur Simulation physiologischer Milieus und Strukturen. Die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen, welche bei *in vitro* Untersuchungen in der Regel vorherrschen, spiegeln keinesfalls die *in vivo* Situation wider. Daher ist eine sinnvolle Interpretation von *in vitro* generierten Daten ausgesprochen schwierig und unserer Meinung nach z. T. fragwürdig, und könnte auch mit ein Grund für Therapieversager in antitumorösen Therapieregimen sein.

Die Erkenntnis, dass die Anwesenheit des extrazellulären Matrixproteins FN das Überleben der promyeloischen Leukämiezelllinie HL60 nach Strahlenexposition

fördert, liefert außerdem wichtige Hinweise für das Verständnis von intrinsischer Radioresistenz und damit Therapieversagen im Rahmen der Strahlentherapie.

Die Strahlentherapie stellt heutzutage neben der Chirurgie und der Chemotherapie die dritte Säule der Krebstherapie dar. Durch die optimale Kombination dieser drei Verfahren sind heute ungefähr 45% aller Tumorerkrankungen heilbar, wobei rund 10% auf eine alleinige Radiatio zurückzuführen sind. In den restlichen Fällen ist die Erkrankung primär metastasiert und lässt sich lokal nicht kurativ kontrollieren [184].

Grundsätzlich versucht man im Rahmen der Strahlentherapie geringe Unterschiede der Strahlensensitivität zwischen Tumor- und Normalgewebe zu nutzen, um einen Therapieerfolg zu erzielen [184]. Optimalerweise ist das Tumorgewebe strahlensensibler als das gesunde Gewebe. Zudem kann durch Temperaturerhöhung, Oxygenierung oder durch chemische Sensitizer (Cisplatin, 5-FU) die Strahlensensibilität des Tumorgewebes erhöht werden [184]. Eine Erhöhung der Strahlendosis im Tumor kann durch verschiedene Behandlungsgeometrien (interne, externe Bestrahlung; Strahlung unterschiedlicher Reichweite, Eindringtiefe und Strahlenqualität; Verwendung beweglicher oder fixer Strahlenquellen; Variabilität der zeitlichen Dosisverteilung) erzielt werden [184]. Limitiert wird die Effizienz der Strahlentherapie durch die Toleranz der Normalgewebe und durch intrinsische Radioresistenzen. Vor allem über die intrinsischen Radioresistenzen und über den ihnen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen ist wenig bekannt [184]. Unsere Ergebnisse zeigen, dass selbst bei Suspensionszellen die Anwesenheit eines Matrixproteins ausreicht, um eine Strahlungsresistenz im Sinne der CAM-RR zu entwickeln. Dieser Prozess wird wesentlich von Integrin-vermittelten Zell-EZM-Interaktionen bestimmt [47; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 59; 60; 104; 105; 108; 172]. Für die Zukunft wird es daher von essentieller Bedeutung sein, diese Integrin-vermittelten Abläufe weiter zu entschlüsseln und gegebenenfalls therapeutische Lösungsansätze zu finden. Nur so kann es gelingen, die Tumorregression infolge intrinsischer Radioresistenz erfolgreich zu bekämpfen, ohne dabei die Nebenwirkungsrate der Strahlentherapie weiter zu erhöhen.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse könnten darüber hinaus für das Verständnis von Tumorgenese, Tumorwachstum, adhäsionsunabhängiges Zellwachstum,

Therapieresistenzen, der Optimierung radiotherapeutischer Konzepte und der Prävention von Normalgewebsreaktionen auf der Basis experimenteller radiobiologischer Daten von Interesse sein.

Als Schlussfolgerung lässt sich sagen, dass die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten die enorme Bedeutung der Integrin-vermittelten Zelladhäsion im Bezug auf erhöhte Bestrahlungsresistenz, Zellüberleben und verminderte Apoptoseinduktion auch für Zellen widerspiegeln, die in Suspension wachsen. Unsere Ergebnisse konnten nicht die exakt zugrunde liegenden molekularen Mechanismen identifizieren, aber sie zeigen deutlich, dass in den Signalkaskaden Zell-EZM-Interaktionen ebenso wie die unterschiedlichen Expressionen von Schlüsselproteinen die Apoptoseinduktion nach Bestrahlung entscheidend beeinflussen und modifizieren können.

Die Identifikation der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen wird möglicherweise eines Tages exakte Einblicke zum Verständnis der adhäsionsbedingten Strahlungsresistenz, der malignen Transformation von Zellen sowie Tumorwachstum und –ausbreitung liefern, wozu allerdings noch viele weitere experimentelle und klinische Studien erforderlich sein werden.

Die klinische Relevanz der aus dieser Arbeit hervorgegangenen Ergebnisse kann weder abgeschätzt noch definitiv beantwortet werden. Zur detaillierten Aufklärung der komplexen und ineinander greifenden Mechanismen von Zell-Matrix-Kontakten sowie von Apoptose sind weitere experimentelle und klinische Studien erforderlich. Der Wissensfortschritt der letzten Jahre hat lediglich erste tief greifende Einblicke in die komplexen Regelwerke geliefert, die Zellüberleben und genetische Stabilität regulieren. Diese Erkenntnisse haben vor allem eines gelehrt: die Zusammenhänge sind ungeheuer komplex und werden durch eine Vielzahl, in ihrer Funktion bislang erst ansatzweise erkannter Faktoren reguliert. Durch die Sequenzierung des humanen Genoms wird die Komplexität durch die Identifikation weiterer Regulatoren in nächster Zukunft erst einmal weiter erhöht werden.

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

Integrin-vermittelte Adhäsion an Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) verleiht normalen sowie transformierten Zellen Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung und Chemotherapeutika. Dieses als zelladhäsionsbedingte Strahlen- bzw. Chemoresistenz bezeichnete und klinisch bedeutende Phänomen wurde im Rahmen dieser Arbeit an der nicht adhären wachsenden HL60-Zelllinie einer akuten promyeloischen Leukämie (AML) analysiert.

Vergleichende Untersuchungen von in Suspension oder an Fibronectin (FN) adhären HL60-Zellen wurden hinsichtlich morphologischer Kriterien der Apoptose wie zelluläre Fragmentierung und *blebbing* mit molekularen Parametern wie mitochondriales Transmembranpotential, Caspasenaktivierung, Expression und Phosphorylierung von Bcl-2, Bax, und Integrin-assoziiertes ILK und GSK-3 β kombiniert.

Die Daten zeigen signifikante morphologische und biochemische Unterschiede bei der Exekution von strahleninduzierter Apoptose. Der Kontakt von HL60-Zellen zu FN moduliert Schlüsselstellen im Verlauf der Integrin-Signalkaskade wie ILK und GSK-3 β und verhindert das Eintreten der Zellen in den mitochondrialen (intrinsischen) Apoptoseweg. Die Translokation von proapoptischen Bax an die Mitochondrienmembran, der Zusammenbruch des transmembranen Mitochondrienpotentials ($\Delta\psi_m$) und die nachfolgende Aktivierung von Caspasen wurden in bestrahlten, auf FN wachsenden HL60-Zellen deutlich im Gegensatz zu Suspensionsbedingungen gehemmt.

Die Erkenntnisse aus diesen Daten zu den molekularen Abläufen der adhäsionsvermittelten Strahlenresistenz bei HL60-Zellen können als Grundlage für die Entwicklung innovativer, multimodaler strahlen- und chemotherapeutischer Therapieformen in der Onkologie dienen.

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

1.1. Allgemeine Abkürzungen

Abb:	Abbildung
AIF:	<i>apoptosis inducing factor</i>
AML:	Akute myeloische Leukämie
ANT:	Adenin-Nukleotid Transporter
Apaf-1:	<i>apoptosis protease activator factor-1</i>
APS :	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest:	Aqua bidestillata
AS:	Aminosäure
ATCC :	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP:	Adenosin Tri-Phosphat
Bak:	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bax:	<i>Bcl-2 associated x protein</i>
BCA:	Bicinchoninsäure
Bcl-2:	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bFGF :	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BH-Domäne:	Bcl-2-Homologiedomäne
BSA:	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumine</i>)
°C :	Temperaturangabe in Grad Celsius
CAM:	Zelladhäsionsmolekül (engl. <i>cell adhesion molecule</i>)
CAM-RR:	<i>cell adhesion-mediated radioresistance</i>
CARD:	<i>caspase activator recruitment domain</i>
CED:	<i>cell death abnormal</i>
CD95:	Apo-1/Fas-Rezeptor
CD95L:	Ligand des CD95-Rezeptors
C-Terminus:	Carboxy-Terminus
Cyt c:	Cytochrom c
Da:	Dalton
DAPI:	4',6-Diamino-2-phenylindol
DD:	<i>death domain</i>
DED:	<i>death effector domain</i>

DIABLO:	<i>direct IAP binding protein with low pI</i>
DIF:	Direkte Immunfluoreszenz
DISC:	<i>death inducing signaling complex</i>
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DSMZ:	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
$\Delta\psi_m$:	Mitochondriales Membranpotential
ECL:	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EGF:	<i>epidermal growth factor</i>
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
ER:	Endoplasmatisches Retikulum
et al:	et alii
EZM:	Extrazelluläre Matrix
FA:	Fokaler Adhäsionskomplex
FACS:	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer (engl. <i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FADD:	<i>Fas-associated death domain</i>
FAK:	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS:	Fötale Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FGF:	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC:	Fluorescein Isothiocyanat
FMK:	Fluoromethylketon
FN:	Fibronektin
FSC:	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i>)
G:	Gauge
g:	Gramm
GFR:	<i>growth factor receptor</i>
G-Protein:	GTP bindendes Protein
Grb:	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
GSK-3 β :	Glykogensynthasekinase-3 β
GTP:	Guanosintriphosphat
Gy:	Gray; SI-Einheit der Energiedosis ($J \times kg^{-1}$)
h:	Stunde

HL60:	Humane akut-myeloisch leukämische Zelllinie gewonnen von einer Patientin mit akuter Promyelozyten-Leukämie
HRP:	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horse radish peroxidase</i>)
IAP:	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
iC3b:	<i>inactivate complement factor 3b</i>
ICAM:	Interzelluläres Adhensionsmolekül (engl. <i>intercellular adhesion molecule</i>)
Ig:	Immunglobulin
IIF:	Indirekte Immunfluoreszenz
ILK:	<i>Integrin-linked kinase</i>
IMD:	<i>Integrin mediated death</i>
l:	Liter
LDA:	<i>Limiting Dilution Analyse</i>
LN:	Laminin
M:	Molar (Mol pro Liter)
mAb:	Monoklonaler Antikörper
MAPK:	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK:	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MEK:	MAP Kinase Kinase
mg:	Milligramm
MIDAS:	<i>metal ion-dependent adhesion site</i>
min:	Minute
ml:	Milliliter
µl:	Mikroliter
mM:	Millimolar
µM:	Mikromolar
MMP:	Matrix-Metalloproteinase
NFκB:	<i>nuclear factor Kappa B</i>
nm:	Nanometer
nM:	Nanomolar
NP 40:	Nonidet P-40
N-Terminus:	Amino-Terminus
PAGE:	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS:	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffer saline</i>)
pH:	$-\log_{10} [\text{H}^+]$
PI3K:	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB α /Akt:	Proteinkinase B α
Ponceau S:	(3-Hydroxy-4-[2-sulfo-phenylazo]phenylazo]-2,7-naphthalindisulfonsäure
PS:	Polystyrol
Puma:	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RNA:	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
rpm:	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
RT:	Raumtemperatur
RTK:	<i>receptor tyrosine kinase</i>
SD:	Standardabweichung
SDS:	Natriumdodezylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE:	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Smac:	<i>second mitochondrial activator of caspases</i>
SSC:	Seitwärtsstreulicht (engl. <i>side scatter</i>)
Tab:	Tabelle
TEMED:	N,N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TMRE:	Tetramethylrhodamin-Ethylester
TNF:	Tumornekrosefaktor
TRAIL:	<i>TNF related apoptosis inducing ligand</i>
Tris:	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
uPAR:	Urokinasetyp Plasminogenaktivator-Rezeptor
VCAM:	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (engl. <i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VDAC:	<i>voltage dependent anion channel</i>
VEGF:	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VN:	Vitronektin
vs:	versus
vWF:	von Willebrand Faktor
ZKF:	Zellkulturflasche
zVAD-FMK:	<i>benzyloxy-valine-alanine-aspartate-O-methyl-fluoromethylketone</i>

1.2. Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den von *Chemical Abstracts* (Chemical Abstracts, 'Index Guide', 77, 210) und der *IUPAC-IUB*-Kommission empfohlenen Richtlinien (Eur J Biochem, 138 (1984) 9 – 37).

Fachausdrücke, die aus anderen Sprachen übernommen wurden, sind *kursiv* geschrieben.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] **Adams, J. M., Cory, S.**
The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.
Science 281 (1998) 1322 – 1325.
- [2] **Alahari, S. K., Reddig, P. J., Juliano, R. L.**
Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors.
Int Rev Cytol 220 (2002) 145 – 184.
- [3] **Aoudjit, F., Vuori, K.**
Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-Flip and implications for anoikis.
J Cell Biol 152 (2001) 633 – 643.
- [4] **Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K., Juliano, R. L.**
Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors.
Pharmacol Rev 50 (1998) 197 – 263.
- [5] **Aplin, A. E., Howe, A. K., Juliano, R. L.**
Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth.
Curr Opin Cell Biol 11 (1999) 737 – 744.
- [6] **Arao, S., Masumoto, A., Otsuki, M.**
Beta 1 integrins play an essential role in adhesion and invasion of pancreatic carcinoma cells.
Pancreas 20(2) (2000) 129 – 137.
- [7] **Arthur, W. T., Noren, N. K., Burridge, K.**
Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion.
Biol Res 35 (2002) 239 – 246.
- [8] **Ashkenazi, A., Dixit, V. M.**
Death receptors: signaling and modulation.
Science 281 (1998) 1305 – 1308.
- [9] **Aspenstrom, P.**
Effectors for the Rho GTPases.
Curr Opin Cell Biol 11 (1999) 95 – 102.
- [10] **Attwell, S., Roskelley, C., Dedhar, S.**
The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis.
Oncogene 19 (2000) 3811 – 3815.

-
- [11] **Aumailley, M., Gayraud, B..**
Structure and biological activity of the extracellular matrix.
J Mol Med 76 (1998) 253 – 265.
- [12] **Baker, E. K., El-Osta, A..**
The rise of DNA methylation and the importance of chromatin on multidrug resistance in cancer.
Exp Cell Res 290 (2003) 177 – 194.
- [13] **Barrett, A. J., Rawlings, N. D..**
Evolutionary lines of cysteine peptidases.
Biol Chem 382 (2001) 727 – 733.
- [14] **Beinke, C., van Beuningen, D., Cordes, N..**
Ionizing radiation modulates 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 (2003) 721 – 731.
- [15] **Belka, C., Betsch, A., Marini, P., Jendrossek, V., Bamberg, M., Budach, W..**
Zelltodliganden in Kombination mit ionisierender Strahlung: Rationale und Kenntnisstand.
Strahlenther Onkol 3 (2003) 141 – 151.
- [16] **Bennett, J. M., Young, M. L., Andersen, J. W., Cassileth, P. A., Tallman, M. S., Paietta, E., Wiernik, P. H., Rowe, J. M..**
Long-term survival in acute myeloid leukaemia: The Eastern Cooperative Oncology Group experience.
Cancer 80 (1997) 2205.
- [17] **Berman, A. E., Kozlova, N. I., Morozevich, G. E..**
Integrins: Structure and signaling.
Biochemistry (Mosc) 68 (2003) 1284 – 1299.
- [18] **Bono, F., Lamarche, I., Prabonnaud, V., Le Fur, G., Herbert, J. M..**
Peripheral benzodiazepine receptors agonists exhibit potent antiapoptotic activities.
Biochem Biophys Res Commun 265 (1999) 457 – 461.
- [19] **Brooks, P. C., Clark, R. A. F., Cheres, D. A..**

- Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis.
Science 264 (1994a) 569 – 571.
- [20] **Brooks, P. C., Montgomery, A. M. P., Rosenfeld, M., Reifeld, R. A., Hu, T., Klier, G., Cheresh, D. A.**
Integrin $\alpha\beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels.
Cell 79 (1994b) 1157 – 1164.
- [21] **Brooks, P. C., Stromblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F. H., Cheresh, D. A.**
Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin.
J Clin Invest 96(4) (1995) 1815 – 1822.
- [22] **Brooks, P. C.**
Role of integrins in angiogenesis.
Eur J Cancer 32A (1996) 2423 – 2429.
- [23] **Brooks, P. C., Stromblad, S., Sanders, L. C., von Schalscha, T. L., Aimes, R. T., Stetler Stevenson, W. G., Quigley, J. B., Cheresh, D. A.**
Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3.
Cell 85 (1996) 683 – 693.
- [24] **Browne, K. A., Johnstone, R. W., Jans, D. A., Trapani, J. A.**
Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic t lymphocyte protease granzyme B during apoptosis.
J Biol Chem 275 (2000) 39262 – 39266.
- [25] **Brown, E., Dejana, E.**
Cell-to-cell contact and extracellular matrix: Editorial overview: Cell-cell and cell-matrix interactions – running, jumping, standing still.
Curr Opin Cell Biol 15 (2003) 505 – 508.
- [26] **Buck, C. A., Horwitz, A. F.**
Adhesion mechanisms controlling cell-cell and cell-matrix interactions during the metastatic process.
Annu Rev Cell Biol 3 (1987) 172 – 205.

-
- [27] **Büchner, T..**
Akute myeloische Leukämie.
Internist 37 (1996) 1008.
- [28] **Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., Turner, C..**
Focal adhesions: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton.
Annu Rev Cell Biol 4 (1988) 487 – 525.
- [29] **Burridge, K., Turner, C. E., Romer, L. H..**
Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: A role in cytoskeletal assembly.
J Cell Biol 119 (1992) 893 – 903.
- [30] **Burridge, K., Chrzanowska-Wodnicka, M..**
Focal adhesions, contractility, and signalling.
Annu Rev Cell Dev Biol 12 (1996) 463 – 519.
- [31] **Calalb, M. B., Polte, T. R., Hanks, S. K..**
Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity. A role for Src family kinases.
Mol Cell Biol 15 (1995) 954 – 963.
- [32] **Calderwood, D. A., Shattil, S. J., Ginsberg, M. H..**
Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signalling.
J Biol Chem 275 (2000) 22607 – 22610.
- [33] **Cary, L. A., Han, D. C., Guan, J. L..**
Integrin-mediated signal transduction pathways.
Histol Histopathol 14 (1999) 1001 – 1009.
- [34] **Cerroni, L., Soyer, H. P., Kerl, H..**
Bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi.
Am J Dermatopathol 17 (1995) 7 – 11.
- [35] **Chanan-Khan, A., Czuczmann, M. S..**
Bcl-2 antisense therapy in B-cell malignant proliferative disorders.
Curr Treat Options Oncol 5 (2004) 261 – 267.
- [36] **Chang, H. Y., Yang, X..**

- Proteases for cell suicide : functions and regulation of caspases.
Microbiol Mol Biol Rev 64 (2000) 821 – 846.
- [37] **Chen, Y. P., O’Toole, T. E., Shipley, T., Forsyth, J., LaFlamme, S. E., Yamada, K. M., Shattil, S. J., Ginsberg, M. H.**
“Inside-out” signal transduction inhibited by isolated integrin cytoplasmic domains.
J Biol Chem 269 (1994) 18307 – 18310.
- [38] **Chen, Q., Lin, T. H., Der, C. J., Juliano, R. L.**
Integrin-mediated activation of MEK and mitogen-activated protein kinase is independent of Ras.
J Biol Chem 271 (1996) 18122 – 18127.
- [39] **Chen, Y. R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R. J., Tau, T. H.**
The role of C-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation.
J Biol Chem 271 (1996) 31929 – 31936.
- [40] **Cheresh, D. A.**
Structural and biologic properties of integrin-mediated cell adhesion.
Clin Lab Med 12(2) (1992) 217 – 236.
- [41] **Chinnaiyan, A. M., Prasad, U., Shankar, S., Hamstra, D. A., Shanaiah, M., Chenevert, T. L., Ross, B. D., Rehemtulla, A.**
Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy.
Proc Natl Acad Sci USA 97 (2000) 1754 – 1759.
- [42] **Choate, J. J., Mosher, D. F.**
Fibronectin concentration in plasma of patients with breast cancer, colon cancer, and acute leukaemia.
Cancer 51 (1983) 1142 – 1147.
- [43] **Collins, S. J., Gallo, R. C., Gallagher, R. E.**
Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture.
Nature 270 (1977) 347 – 349.
- [44] **Coppolino, M., Leung-Hugestjain, C., Dedhar, S., Wilkins, J.**

- Inducible interaction of integrin alpha 2 beta 1 with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin.
J Biol Chem 270 (1995) 23132 – 23138.
- [45] **Cordes, N., Blaese, M. A., Meineke, V., van Beuningen, D..**
Ionizing radiation induces up-regulation of functional β 1-integrin in lung tumour cell lines *in vitro*.
Int J Radiat Biol 78 (2002) 347 – 357.
- [46] **Cordes, N., Blaese, M. A., Plasswilm, L., Rodemann, H. P., van Beuningen, D..**
Fibronectin and laminin increase resistance to ionising radiation and the cytotoxic drug Ukrain® in human tumour and normal cells *in vitro*.
Int J Radiat Biol 79 (2003a) 709 - 720.
- [47] **Cordes, N., Meineke, V..**
Cell adhesion-mediated radioresistance (CAM-RR): extracellular matrix-dependent improvement of cell survival in human tumor and normal cells *in vitro*.
Strahlenther Onkol 179 (2003) 337 – 344.
- [48] **Cordes, N., van Beuningen, D..**
Cell adhesion to the extracellular matrix protein fibronectin modulates radiation-dependent G2 phase arrest involving integrin-linked kinase (ILK) and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) *in vitro*.
Brit J Cancer 88 (2003) 1470 – 1479.
- [49] **Cordes, N., Beinke C..**
Fibronectin alters A549 human lung cancer cell survival after irradiation.
Cancer Biol Ther 3 (2004) 47 – 53.
- [50] **Cordes, N., van Beuningen, D..**
Fibronectin improves survival of irradiated normal human lung fibroblasts by pronounced G2-phase arrest involving checkpoint kinases Chk1 and Chk2 and glycogen synthase kinase-3 β *in vitro*.
Int J Radiat Oncol Biol Phys 58 (2004) 453 – 462.
- [51] **Cordes, N., Meineke, V..**
Integrin signalling and the cellular response to ionizing radiation.
Journal of Molecular Histology 35 (2004) 327 – 337.

-
- [52] **Cordes, N..**
Overexpression of hyperactive integrin-linked kinase leads to increased cellular radiosensitivity.
Cancer Res 64 (2004) 5683 – 5692.
- [53] **Cordes, N., Beinke, C., Plasswilm, L., van Beuningen, D..**
Irradiation and various cytotoxic drugs enhance tyrosine phosphorylation and β 1-integrin clustering in human A549 lung cancer cells in a substratum-dependent manner *in vitro*.
Strahlenther Onkol, 180(3) (2004) 157 – 164..
- [54] **Cordes, N., Meineke, V..**
Modification of the cellular radiation survival and proliferation response by cell-matrix interactions: Implications for integrin targeting in therapeutic approaches for radiation accident patients.
Brit J Radiol, 27 (2005) 152 - 156.
- [55] **Cordes, N., Seidler, J., Durzok, R., Geinitz, H., Brakebusch, C..**
Beta1-integrin-mediated signaling essentially contributes to cell survival after radiation-induced genotoxic injury.
Oncogene 25 (9) (2006) 1378 – 1390.
- [56] **Croate, J. J., Mosher, D. F..**
Fibronectin concentration in plasma of patients with breast cancer, colon cancer, and acute leukaemia.
Cancer 51 (1983) 1142 – 1147.
- [57] **Dalton, W. T. Jr., Ahearn, M. J., McCredie, K., Freireich, E. J., Stass, S. A., Trujillo, J..**
HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3.
Blood 71 (1988) 242 – 247.
- [58] **Dalton, W. S..**
Drug resistance and drug development in multiple myeloma.
Semin Oncol 29 (2002) 21 – 25.
- [59] **Damiano, J. S. Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A., Dalton, W. S..**
Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines.
Blood 93 (1999) 1658 – 1667.

-
- [60] **Damiano, J. S., Hazlehurst, L. A., Dalton, W. S..**
Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) protects the K562 chronic myelogenous leukaemia cell line from apoptosis induced by BCR/ABL inhibition, cytotoxic drugs, and gamma-irradiation.
Leukemia 15 (2001) 1232 – 1239.
- [61] **Danen, E. H., Yamada, K. M..**
Fibronectin, integrins, and growth control.
J Cell Physiol 189 (2001) 1 – 13.
- [62] **Daniel, P. T..**
Dissecting the pathways of death.
Leukemia 14 (2000) 2035 – 2044.
- [63] **Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M. E..**
Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the intrinsic death machinery.
Cell 91 (1997) 231 – 241.
- [64] **Datta, S. R., Brunet, A., Greenberg, M. E..**
Cellular survival: a play in three acts.
Genes Dev 13(22) (1999) 2905 – 2927.
- [65] **Dechantsreiter, M. A., Planker, E., Mathä, B., Lohof, E., Hölzemann, G., Jonczyk, A., Goodman, S. L., Kessler, H..**
N-Methylacetad cyclic RGD peptides as highly activ and selective $\alpha\beta 3$ integrin antagonists.
J Med Chem 42 (1999) 3033 – 3040.
- [66] **Dedhar, S., Hannigan, G. E..**
Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling.
Curr Opin Cell Biol 8 (1997) 657 – 669.
- [67] **Del Pozo, M. A., Price, L. S., Alderson, N., Ren, X. D., Schwartz, M. A..**
Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector Pak.
EMBO J 19 (2000) 2008 – 2014.
- [68] **Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Ruel, L., Woodgett, J., Dedhar, S..**

- Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/Akt by the integrin-linked kinase.
Proc Natl Acad Sci USA 95 (1998) 11211 – 11216.
- [69] **Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., Sherr, C. J..**
Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization.
Genes Dev 12 (1998) 3499 – 3511.
- [70] **Doble, B. W., Woodgett, J. R..**
GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase.
J Cell Sci 116 (2003) 1175 – 1186.
- [71] **Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X..**
Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrom c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.
Cell 102 (2000) 33 – 42.
- [72] **Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S..**
A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and inhibitor ICAD.
Nature 391 (1998) 43 – 50.
- [73] **Erdreich-Epstein, A., Shimada, H., Groshen, S., Liu, M., Metelitsa, L. S., Kim, K. S., Stius, M. F., Seeger, R. C., Durden, D. L..**
Integrins alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 are expressed by endothelium of high-risk neuroblastoma and their inhibition is associated with increased endogenous ceramide.
Cancer Res 60 (2000) 712 – 721.
- [74] **Evan, G., Littlewood, T..**
A matter of life and cell death.
Science 281 (1998) 1317 – 1322.
- [75] **Fadok, V. A., Chimini, G..**
The phagocytosis of apoptotic cells.
Immunol 13 (2001) 365 – 372.
- [76] **Farely, N., Lee, Y-J., Oliver, J., Dive, C., Streuli, C. H..**

- Extracellular matrix regulates apoptosis in mammary epithelium through a control on insulin signalling.
J Cell Biol 144 (1999) 1337 – 1347.
- [77] **Fesus, L., Thomazy, V., Falus, A..**
Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death.
FEBS Lett 224 (1987) 104 – 108.
- [78] **Frisch, S. M., Francis, H..**
Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis.
J Cell Biol 124 (1994) 619 – 626.
- [79] **Frisch, S. M., Ruoslahti, E..**
Integrins and anoikis.
Curr Opin Cell Biol 9 (1997) 701 – 706.
- [80] **Frisch, S. M..**
Evidence for a function of death-receptor-related, death-domain-containing proteins in anoikis.
Curr Biol 9 (1999) 1047 – 1049.
- [81] **Frisch, S. M., Screaton, R. A..**
Anoikis mechanisms.
Curr Opin Cell Biol 13 (2001) 555 – 562.
- [82] **De la Fuente, M. T., Casanova, B., Garcia-Gila, M., Silva, A., Garcia-Pardo, A..**
Fibronectin interaction with $\alpha 4\beta 1$ integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leucemia: correlation with bcl-2 and bax.
Leukemia 13 (1999) 266 – 274.
- [83] **De la Fuente, M. T., Casanova, B., Moyano, J. V., Garcia-Gila, M., Sanz, L., Garcia-Marco, J., Silva, A., Garcia-Pardo, A..**
Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leucemia cells to fludarabine.
J of Leukoc Biol 71 (2002) 495 – 502.
- [84] **Fuks, Z., Vlodavsky, I., Andreeff, M., McLoughlin, M., Haimovitz-Friedman, A..**

- Effects of extracellular matrix on the response of endothelial cells to radiation in vitro.
Eur J Cancer 28A (1992) 725 – 731.
- [85] **Fukuda, T., Guo, L., Shi, X., Wu, C..**
CH-ILKBP regulates cell survival by facilitating the membrane translocation of protein kinase B/Akt.
J Cell Biol 7 (2002) 1001 – 1008.
- [86] **Fulda, S..**
Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer.
Oncogene 41 (2001) 5865).
- [87] **Fulda, S., Wick, W., Weller, M., Debatin, K. M..**
Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL – or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo.
Nat Med 8 (2002) 808 – 815.
- [88] **Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., Gallo, R..**
Characterization of the continuous differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukaemia.
Blood 54 (1979) 713 – 733.
- [89] **Gasparini, G., Brooks, P. C., Biganzoli, E., Vermueten, P. B., Bonoldi, E., Dirix, L. Y., Ranieri, G., Micehi, R., Cheresch, D. A..**
Vascular integrin alpha(v) beta 3: a new prognostic indicator in breast cancer.
Clin Cancer Res 4 (1998) 2625 – 2634.
- [90] **Giancotti, F. G..**
Integrin signalling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression.
Curr Opin Cell Biol 9 (1997) 691 – 700.
- [91] **Giancotti, F. G., Ruoslahti, E..**
Integrin signalling.
Science 285 (1999) 1028 – 1032.
- [92] **Gilmore, A. P., Metcalfe, A. D., Romer, L. H., Streuli, C. H..**

- Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization.
J Cell Biol 149 (2000) 431 – 446.
- [93] **Gottschalk, K. E., Adams, P. D., Brunger, A. T., Kessler, H..**
Transmembrane signal transduction of the $\alpha 5\beta 3$ integrin.
Protein Sci 11 (2002) 1800 – 1812.
- [94] **Gottschalk, K. E., Kessler, H..**
A computational model of transmembrane integrin clustering.
Structure (Camb) 12 (2004a) 1109 – 1116.
- [95] **Gottschalk, K. E., Kessler, H..**
Evidence for hetero-association of transmembrane helices of integrins.
FEBS Lett 557 (2004b) 253 – 258.
- [96] **Green, D. R., Reed, J. C..**
Mitochondria and Apoptosis.
Science 281 (1998) 1309 – 1312.
- [97] **Green, D. R., Evan, G. I..**
A matter of life and death.
Cancer Cell 1 (2002) 19 – 30.
- [98] **Grenman, R., Burk, D., Virolainen, E., Buick, R. N., Church, J., Schwartz, D. R., et al.**
Clonogenic cell assay for anchorage-dependent squamous carcinoma cell lines using limiting dilution.
Int J Cancer 44 (1989) 131 – 136.
- [99] **Gumbiner, B. M..**
Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis.
Cell 84 (1996) 345 – 357.
- [100] **Hall, A..**
Rho GTPases and the actin cytoskeleton.
Science 279 (1998) 509 – 514.
- [101] **Hanahan, D., Weinberg, R. A..**
The hallmarks of cancer.
Cell 100 (1) (2000) 57 – 70.
- [102] **Hanks, S. K., Ryzhova L., Shin, N-Y., Brábek J..**

- Focal adhesion kinase signalling and their implications in the control of cell survival and motility.
Front Biosci 8 (2003) d982 – d996.
- [103] **Hannigan, G. E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M. G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J. C., Dedhar, S..**
Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new β 1-integrin-linked protein kinase.
Nature 379 (1996) 91 – 96.
- [104] **Hazlehurst, L. A., Damiano, J. S., Buyuksal, I., Pledger, W. J., Dalton, W. S..**
Adhesion to fibronectin via β 1-integrins regulates p27^{kip1} levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR).
Oncogene 19 (2000) 4319 – 4327.
- [105] **Hazlehurst, L. A., Enkemann, S. A., Beam, C. A., Argilagos, R. F., Painter, J., Shain, K. H., Saporta, S., Boulware, D., Moscinski, L., Alsina, M., Dalton, W. S..**
Genotypic and phenotypic comparisons of de novo and acquired melphalan resistance in an isogenic multiple myeloma cell line model.
Cancer Res 63 (2003) 7900 – 7906.
- [106] **Henning, T., Kraus, M., Brischwein, M., Otto, A. M., Wolf, B..**
Relevance of tumor microenvironment for progression, therapy and drug development.
Anticancer Drugs 15(1) (2004) 7 – 14.
- [107] **Hersel, U., Dahmen, C., Kessler, H..**
RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond.
Biomaterials 24 (2003) 4385 – 4415.
- [108] **Hess, F., Estrugo, D., Fischer, A., Belka, C., Cordes, N..**
Integrin-linked kinase interacts with caspase-9 and caspase-8 in an adhesion-dependent manner for promoting radiation-induced apoptosis in human leukemia cells.
Oncogene (2006 Aug 28) Epub ahead of print.
- [109] **Hiddemann, W., Kern, W., Schoch, C., Fonatsch, C., Heineke, A., Woermann, B., Büchner, T..**

- Management of acute myeloid leukemia in elderly patients.
J Clin Oncol 17 (1999) 3569.
- [110] **Hildebrand, J. D., Taylor, J. M., Parsons, J. T.**
An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase.
Mol Cell Biol 16 (1996) 3169 – 3178.
- [111] **Hoeflich, K. P., Luo, J., Rubie, E. A., Tsao, M. S., Jin, O., Woodgett, J. R.**
Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NK-kB activation.
Nature 406 (2000) 86 – 90.
- [112] **Hogg, N., Clive Laudis, R., Bates, P. A., Stanley, P., Raudi, A. M.**
The sticking point: How integrins bind to their ligands.
Trends Cell Biol 4 (1994) 379 – 382.
- [113] **Horton, M. A.**
Introduction: Cell adhesion molecules and their functions.
Molecular Biology of Cell Adhesion Molecules (1996) 1 – 16.
- [114] **Howe, A., Aplin, A. E., Alahari, S. K., Juliano R. L.**
Integrin signalling and cell growth control
Curr Opin Cell Biol 10 (1998) 220 – 231.
- [115] **Hughes, P. E., Renshaw, M. W., Pfaff, M., Forsyth, J., Keivens, V. M., Schwartz, M. A., Ginsberg, M. H.**
Suppression of integrin activation: a novel function of a rRas/Raf-initiated MAP kinase pathway.
Cell 88 (1997) 521 – 530.
- [116] **Humphries, M. J., McEwan, P. A., Barton, S. J., Buckley, P. A., Bella, J., Paul Mould, A.**
Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble.
Trends Biochem Sci 28 (2003) 313 – 320.
- [117] **Hynes, R. O.**
Integrins: Versatility, modulation, and signalling in cell adhesion.
Cell 69 (1992) 11 – 25.
- [118] **Hynes, R. O.**

- Integrins: Bidirectional, allosteric signalling machines.
Cell 110 (2002) 673 – 687.
- [119] **Hynes, R. O..**
A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis.
Nat Med 8 (2002b) 918 – 921.
- [120] **Hynes, R. O..**
Changing partners.
Sciences 300 (2003) 755 – 756.
- [121] **Jacks, T., Weinberg, R. A..**
Taking the study of cancer cell survival to a new dimension.
Cell 111 (7) (2002) 923 – 925.
- [122] **Kang, J. S., Krauss, R. S..**
Ras induces anchorage-independent growth by subverting multiple adhesion-regulated cell cycle events.
Mol Cell Biol 16 (1996) 3370 – 3380.
- [123] **Kantlehner, M., Schaffner, P., Finsinger, D., Meyer, J., Jonczyk, A., Diefenbach, B., Nies, B., Hölzemann, G., Goodman, S. L., Kessler, H..**
Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation.
Chem Bio Chem 1 (2000) 107 – 114.
- [124] **Kasahara, T., Koguchi, E., Funakoshi, M., Aizu-Yokota, E., Sonoda, Y..**
Antiapoptotic action of focal adhesion kinase (FAK) against ionizing radiation.
Antioxid Redox Signal 4 (2002) 491 – 499.
- [125] **Kellersmann, R., Lazarovits, A., Grant, D., Garcia, B., Chan, B., Kellersmann, A., Wang, H., Jevnikar, A., Wagner, N., Mueller, W., Ulrichs, K., Thiede, A., Zhong, R..**
Monoclonal antibody against [beta]7 integrins, but not [beta]7 deficiency, attenuates intestinal allograft rejection in mice.
Transplantation 74 (2002) 1327.
- [126] **Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R..**
Apoptosis: a biological phenomen with wide-ranging implications in tissue kinetics.

- Brit J Cancer 26 (1972) 239-257.
- [127] **Kerst, J. M., Sanders, J. B., Slaper-Cortenbach, I. C., Doorackers, M. C., Hooibrink, B., van Oers, R. H., von dem Borne, A. E., van der Schoot, C. E.**
Alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta1 are differentially expressed during myelopoiesis and mediate the adherence of human CD 34+ cells to fibronectin in an activation-dependent way.
Blood 81 (1993) 344 – 351.
- [128] **Khwaja, A., Rodriguez-Viciana, P., Wennström, S., Warne, P. H., Downward, J.**
Matrix adhesion and ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/ Akt cellular survival pathway.
EMBO J 16 (1997) 2783 – 2793.
- [129] **Klasa, R. J., List, A. F., Cheson, B. D.**
Rational approaches to design of therapeutics targeting molecular markers.
Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) (2001) 443 – 462.
- [130] **Kornberg, L., Earp, H. S., Parson, J. T., Schaller, M., Juliano, R. L.**
Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of af focal adhesion-associated tyrosine kinase.
J Biol Chem 267 (1992) 23439 – 23442.
- [131] **Krammer, P. H.**
CD 95`s deadly mission in the immune system.
Nature 411 (2000) 789 – 795.
- [132] **Lane, D.**
How cells choose to die.
Nature 414 (2001) 25 – 26.
- [133] **Lee, J. O., Rien, P., Arnaout, M. A ., Liddington, R.**
Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b / CD 18).
Cell 80 (1995) 631 – 638.
- [134] **Leist, M., Jäättelä, M.**
Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms.
Nature Reviews 2 (2001) 1 – 10.

-
- [135] **Lewis, J. M., Truong, T. N., Schwartz, M. A.**
Integrins regulate the apoptotic response to DNA damage through modulation of p53.
Proc Natl Acad Sci USA 99 (2002) 3627 – 3632.
- [136] **Li, R., Mitra, N., Gratkowski H., Vilaire G., Litvinov, R., Nagasami C., Weisel, J. W., Lear, J. D., DeGrado, W. F., Bennett, J. S.**
Activation of integrin α 5 β 3 by modulation of transmembrane helix associations.
Science 300 (2003) 795 – 798.
- [137] **Lisiak, E., Cordes, N.**
Integrins and the cellular radiation response.
Cancer Ther 2 (2004) 271 – 278.
- [138] **Liu, S., Calderwood, D. A., Ginsberg, M. H.**
Integrin cytoplasmic domain-binding proteins.
J Cell Sci 113 (Pt20) (2000) 3563 – 3571.
- [139] **Lodish, H. (Hrsg.), Berk, A., Zipursky, S. L., Masudiar, P., Baltimore, D., Darnell, J. E.**
Molekulare Zellbiologie
Spektrum Akademiker Verlag, Heidelberg – Berlin, 2001, 4. Auflage.
- [140] **Loftus, J. C., Smith, J. W., Ginsberg, M. H.**
Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face.
J Biol Chem 269 (1994) 25235 – 25238.
- [141] **Lorenzo, H. K., Susin, S. A., Penninger, J., Kroemer, G.**
Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death.
Cell Death Differ 6 (1999) 516 – 524.
- [142] **Löffler, G., Petrides, P. E.**
Biochemie und Pathobiochemie.
Springer Verlag, Heidelberg, 6. Aufl.
- [143] **Lukashev, M. E., Werb, Z.**
ECM signalling: Orchestrating cell behaviour and misbehaviour.
Trends Cell Biol 8 (1998) 437 – 441.
- [144] **Lundell, B. I., McCarthy, J. B., Kovach, N. L., Verfaillie, C. M.**

- Activation-dependent $\alpha 5\beta 1$ integrin-mediated adhesion to fibronectin decreases proliferation of chronic myelogenous leukaemia progenitors and K562 cells.
Blood 87 (1996) 2450 – 2458.
- [145] **Lynch, P. K., Ellis, C. A., Edwards, P. A. W., Hiles, I. D..**
Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism.
Oncogene 18 (1998) 8024 – 8032.
- [146] **Martinou, J. C., Green, D. R..**
Breaking the mitochondrial barrier.
Nat Rev Mol Cell Biol 2 (2001) 63 – 67.
- [147] **Matter, M. L., Ruoslahti, E..**
A signaling pathway from the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha V\beta 3$ integrins that elevates bcl-2 transcription.
J Biol Chem 276 (2001) 27757 – 27763.
- [148] **McArthur Lewis, J., Truong, T. N., Schwartz M. A..**
Integrins regulate the apoptotic response to DNA damage through modulation of p53.
Proc Natl Acad Sci USA 99 (2002) 3627 – 3632.
- [149] **Meredith, J. E. Jr., Fazeli, B., Schwartz, M. A..**
The extracellular matrix as a cell survival factor.
Mol Biol Cell 4 (1993) 953 – 961.
- [150] **Miranti, C. K., Brugge, J. S..**
Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction.
Nat Cell Biol 4 (2002) E83 – 90.
- [151] **Moro, L., Dolce, L., Cabodi, S., Bergatto, E., Erba, E. B., Smeriglio, M., Turca, E., Retta, S. F., Giuffrida, M. G., Venturino, M., Godovac-Zimmermann, J., Conti, A., Schaefer, E., Beguinot, I., Tacchetti, C., Saggini, P., Silengo, I., Tarone, G., Defilippi, P..**
Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines.

- J Biol Chem 277 (2002) 9405 – 9414.
- [152] **Mould, A. P., Akiyama, S. K., Humphries, M. J..**
The inhibitory anti- β 1 integrin monoclonal antibody 13 recognizes an epitope that is attenuated by ligand occupancy. Evidence for allosteric inhibition of integrin function.
J Biol Chem 271 (1996) 20365 – 20374.
- [153] **Murphy-Ullrich, J. E..**
The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state?
J Clin Invest 107 (2001) 785 – 790.
- [154] **Nardi, V., Azam, M., Daley, G. Q..**
Mechanisms and implications of imatinib resistance mutations in BCR-ABL.
Curr Opin Hematol 11 (2004) 35 – 43.
- [155] **Novak, A., Hsu, S. C., Leung-Hagesteijn, C., Radeva, G., Papkoff, J., Montesano, R., Roskelly, C., Grosschedl, R., Dedhar, S..**
Cell adhesion and integrin-linked kinase regulate the LEF- and β -catenin signalling pathway.
Proc Natl Acad Sci USA 95 (1998) 4374 – 4379.
- [156] **Orian-Rousseau, V., Aberdam, D., Rousselle, P., Messent, A., Gavrilovic, J., Meneguzzi, G., Kedinger, M., Simon-Assmann, P..**
Human colonic cancer cells synthesize and adhere to laminin-5. Their adhesion to laminin-5 involves multiple receptors among which is integrin α 2 β 1.
J Cell Sci 111 (1998) 1993 – 2004.
- [157] **Owen, J. D., Ruest, P. J., Fry, D. W., Hanks, S. K..**
Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in Fak-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2.
Mol Cell Biol 19 (1999) 4806 – 4818.
- [158] **Ozathi, D., Kocoglu, H., Haznedaroglu, I. C., Kosar, A., Buyukasik, Y., Ozcebe, O..**

- Circulating thrombomodulin, thrombospondin, and fibronectin in acute myeloblastic leukemias.
Haematologia (Budap) 29 (1999) 277 – 283.
- [159] **Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., Conklin, D. S..**
Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells.
Genes Dev 16 (2002) 948 – 958.
- [160] **Park, C. C., Bissell, M. J., Barcellos-Hoff, M. H..**
The influence of the microenvironment on the malignant phenotype.
Mol Med Today 6 (2000) 324 – 329.
- [161] **Parlato, S., Giammariolo, A. M., Lo gozzi, M., Lozupone, F., Matarese, P., Lucani, F., Falchi, M., Malori, W., Fais, S..**
CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway.
EMBO J 19 (2000) 5123 – 5134.
- [162] **Pavalko, F. M., LaRoche, S. M..**
Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta-2-subunit (CD 18) and the actin binding protein alpha actinin.
J Immunol 151 (1993) 3795 - 3807.
- [163] **Persad, S., Dedhar, S..**
The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression.
Cancer Metastasis Rev 22 (4) (2003) 375 – 384.
- [164] **Petersen, E. L., Orntoft, T., Jensen, J. H., Nielsen, H. K..**
Plasma fibronectin in acute myeloid leukaemia.
Scand J Haematol 35 (1985) 225 – 228.
- [165] **Pfaff, M..**
Integrin-ligand interaction.
Ed.:J. A. Eble, Springer Verlag, Heidelberg (1997) 101 – 121.
- [166] **Polte, T. R., Hanks, S. K..**
Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas.
Proc Natl Acad Sci USA 92 (1995) 10678 – 10682.

-
- [167] **Raffael, A., Nebe, C. T., Valet, G..**
Grundlagen der Durchflusszytometrie.
In: "Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik", Schmitz, G., Rothe, G. (Hrsg.), Schattauer Verlagses.,
Stuttgart-New York, 1994, 3 – 49.
- [168] **Reed, J. C..**
Dysregulation of apoptosis in cancer.
J Clin Oncol 17 (1999) 2941 – 2953.
- [169] **Reed, J. C..**
Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery.
Trends Mol Med 7 (2001) 314 – 319.
- [170] **Renshaw, M. W., Price, L. S., Schwartz, M. A..**
Focal adhesion kinase mediates the integrin signalling requirement for growth factor activation of MAP kinase.
J Cell Biol 147 (1999) 611 – 618.
- [171] **Richardson, A., Malik, R. K., Hildebrand, J. D., Parsons, J. T..**
Inhibition of cell spreading by expression of the C-terminal domain of focal adhesion kinase (FAK) is rescued by coexpression of Src or catalytically inactive FAK: A role for paxillin tyrosine phosphorylation.
Mol Cell Biol 17 (1997) 6906 – 6914.
- [172] **Rose, D. M., Pozzi, A., Zent, R..**
Integrins as therapeutic targets.
Emerging Therapeutic Targets 4 (2000) 397.
- [173] **Rudner, J., Belka, C., Marini, P., Wagner, R. J., Faltin, H.,
Lepple-Wienhues, A., Bamberg, M., Budach, W..**
Radiation sensitivity and apoptosis in human lymphoma cells.
Int J Radiat Biol 77 (2001) 1 – 11
- [174] **Rudner, J., Lepple-Wienhues, A., Budach, W., Berschauer, J., Friedrich, B., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K., Belka, C..**
Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis.
J Cell Sci 114 (2001) 4161 – 4172.
- [175] **Ruoslahti, E..**

- Integrins.
J Clin Invest 87 (1991) 1 – 5.
- [176] **Ruoslahti, E., Pierschbacher, M. D..**
New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins.
Science 238 (1987) 491 – 497.
- [177] **Rytömaa, M., Martins, L. M., Downward, J..**
Involvement of FADD and caspase-8 signalling in detachment-induced apoptosis.
Curr Biol 9 (1999) 1043 – 1046.
- [178] **Rytömaa, M., Lehmann, K., Downward, J..**
Matrix detachment induces caspase-dependent cytochrome c release from mitochondria: inhibition by PKB/ Akt but not Raf signalling.
Oncogene 19 (2000) 4461 – 4468.
- [179] **Salvesen, G. S., Duckett, C. S..**
IAP proteins: blocking the road to death's door.
Nat Rev 3 (2002) 401 – 410.
- [180] **Sastry, S. K., Horwitz, A. F..**
Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signalling.
Curr Opin Cell Biol 5 (1993) 819 – 831.
- [181] **Schaller, M. D., Parsons, J. T..**
Focal adhesion kinase and associates proteins.
Curr Opin Cell Biol 6 (1994) 705 – 710.
- [182] **Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T., van der Geer, P..**
Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase.
Nature 372 (1994) 786 – 791.
- [183] **Schlaepfer, D. D., Broome, M. A., Hunter, T..**
Fibronectin-stimulated signalling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: Involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins.
Mol Cell Biol 17 (1997) 1702 – 1713.
- [184] **Schlungbaum, W..**
Strahlentherapie in Schlungbaum, W., Fleisch, U., Stabell, U..

- Medizinische Strahlenkunde, 7. Aufl. (1993), de Gruyter, Berlin.
- [185] **Schmidt-Ullrich, R. K., Dent, P., Grant, S., Mikkelsen, R. B., Valerie, K..**
Signal transduction and cellular radiation responses.
Radiat Res 153 (2000) 245 – 257.
- [186] **Schwartz, M. A., Toksoz, D., Khosravi-Far, R..**
Transformation by Rho exchange factor oncogenes is mediated by activation of an integrin-dependent pathway.
EMBO J 15 (1996) 6525 – 6530.
- [187] **Schwartz, M. A..**
Integrins, oncogenes, and anchorage independence.
J Cell Biol 139 (1997) 575 – 578.
- [188] **Schwartz, M. A..**
Integrin signalling revisited.
Trends Cell Biol 12 (2001) 466 – 470.
- [189] **Schwartz, M. A., Assoian, R. K..**
Integrins and cell proliferation: Regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signalling pathways.
J Cell Sci 114 (2001) 2553 – 2560.
- [190] **Schwartz, M. A., Ginsberg, M. H..**
Networks and crosstalk: integrin signalling spreads.
Nature Cell Biol 4 (2002) E65 – E68.
- [191] **Sethi, T., Rintoul, R. C., Moore, S. M., MacKinnon, A. C., Salter, D., Choo, C., Chilvers, E. R., Dransfield I., Donnelly, S. C., Strieter, R., Haslett, C..**
Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo.
Nature Med 5 (1999) 662 – 668.
- [192] **Shain, K. H., Dalton, W. S..**
Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): New targets for the prevention of acquired MDR.
Mol Cancer Ther 1 (2001) 69 – 78.
- [193] **Shattil, S. J., Kashiwagi, H., Pampori, N..**
Integrin signalling: The platelet paradigm.

- Blood 91 (1998) 2645 – 2657.
- [194] **Shi, Y..**
Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis.
Mol Cell 9 (2002) 459 – 470.
- [195] **Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T., Tsujimoto, Y..**
Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c.
J Biol Chem 275 (2000) 12321 – 12325.
- [196] **Steel, G. G..**
The case against apoptosis.
Acta Oncologica 40 (2001) 968 – 975.
- [197] **Stennicke, H. R., Salvesen, G. S..**
Properties of the caspases.
Biochim Biophys Acta 1387 (1998) 17 – 31.
- [198] **Stewart, M., Hogg, N..**
Regulation of leukocyte integrin function: Affinity vs. avidity.
J Cell Biochem 61 (1996) 554 – 561.
- [199] **Stupack, D. G., Puente, X. S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C. M., Cheresh, D. A..**
Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins.
J Cell Biol 155 (2001) 459 – 470.
- [200] **Stupack, D. G., Cheresh, D. A..**
Get a ligand, get a life: integrins, signalling and cell survival.
J Cell Sci 115 (2002) 3729 – 3738.
- [201] **Stupack, D. G., Cheresh, D. A..**
Apoptotic cues from the extracellular matrix: regulators of angiogenesis.
Oncogene 22 (2003) 9022 – 9029.
- [202] **Takada, Y., Kamata, T., Irie, A., Puzon-McLaughlin, W., Zhang, X. P..**
Structural basis of integrin-mediated signal transduction.
Matrix Biol 16 (1997) 143 – 151.
- [203] **Tamkun, J. W., De Simone, D. W., Fonda, D., Patel, R. S., Buck, C., Horwitz, A. F., Hynes, R. O..**

- Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin.
Cell 46(2) (1986) 271 - 282.
- [204] **Thornberry, N. A., Lazebnik, Y.**
Caspases: enemies within.
Sciences 281 (1998) 1312 – 1316.
- [205] **Treisman, R., Alberts, A. S., Sahai, E.**
Regulation of SRF activity by Rho family GTPases.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol 63 (1998) 643 – 651.
- [206] **Troussard, A. A., Tan, C., Yoganathan, T. N., Dedhar, S.**
Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner.
Mol Cell Biol 19 (1999) 7420 – 7427.
- [207] **Troussard, A. A., Costello, P., Yoganathan, T. N., Kumagai, S., Roskelley, C. D., Dedhar, S.**
The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9).
Oncogene 19 (2000) 5444 – 5452.
- [208] **Truong, T., Sun, G., Doorly, M., Wang, J. Y., Schwartz, M. A.**
Modulation of DNA damage-induced apoptosis by cell adhesion is independently mediated by p35 and c-Abl.
Proc Natl Acad Sci USA 100 (2003) 10281 – 10286.
- [209] **Tsuruta, F., Masuyama, N., Gotoh, Y.**
The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses bax translocation to mitochondria.
J Biol Chem 277 (2002), 14040 – 14047.
- [210] **Van der Flier, A., Sonnenberg, A.**
Function and interactions of integrins.
Cell Tissue Res 305 (2001) 285 – 298.
- [211] **Van der Kuip, H., Goetz, A. W., Miething, C., Duyster, J., Aulitzky, W. E.**
Adhesion to fibronectin selectively protects Bcr-Abl+cells from DNA damage-induced apoptosis.

- Blood 98 (2001) 1532 – 1541.
- [212] **Van der Velde-Zimmermann, D., Smits, V. A. J., Verdaasdonk, M. A. M., Rademakers, L. H. P. M., Werner, N., Spierings, D. C. J., De Weger, R. A., van den Tweel, J. G., Joling, P..**
β1-integrins dominate cell traffic of leukemic cells in human bone-marrow stroma.
Int J Cancer 66 (1996) 225 – 233.
- [213] **Vaupel, P., Kelleher, D. K., Hockel, M..**
Oxygen status of malignant tumors: Pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy.
Semin Oncol 28 (2001) 29 – 35.
- [214] **Verfaillie, C. M., Benis, A., Iida, J., McGlave, P. B., McCarthy, J. B..**
Adhesion of committed human hematopoietic progenitors to synthetic peptides from the C-terminal heparin-binding domain of fibronectin: cooperation between the integrin alpha 4 beta 1 and the CD 44 adhesion receptor.
Blood 84 (1994) 1802 – 1811.
- [215] **Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Conolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Vaux, D. L..**
Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.
Cell 102 (2000) 43 – 53.
- [216] **Vuori, K..**
Integrin signaling and cell cycle progression.
Journal of Membrane Biology 165 (1998) 191 – 199.
- [217] **Wachsberger, P., Burd, R., Dicker, A. P..**
Tumor response to ionizing radiation combined with antiangiogenesis or vascular targeting agents: Exploring mechanisms of interaction.
Clin Cancer Res 9 (2003) 1957 – 1971.
- [218] **Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C., Giancotti, F. G..**
A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth.
Cell 94 (1998) 625 – 634.
- [219] **Watt, F. M..**

- Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation.
EMBO J 21 (2002) 19 – 26.
- [220] **Wei, L., Yang, Y., Yu, Q..**
Tyrosine kinase-dependent, phosphatidylinositol 3`-kinase, and mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathways prevent lung adenocarcinoma cells from anoikis.
Cancer Res 61 (2001) 2439 – 2444.
- [221] **Wu, C., Keightley, S. Y., Leung-Hagesteijn, C., Radeva, G., Coppolino, M., Goicoechea, S., McDonald, J. A., Dedhar, S..**
Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression and tumorigenicity.
J Biol Chem 273 (1998) 528 – 536.
- [222] **Wu, C., Dedhar, S..**
Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: A new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signalling complexes.
J Cell Biol 155 (2001) 505 – 510.
- [223] **Xie, B., Laouar, A., Huberman, E..**
Autocrine regulation of macrophage differentiation and 92-kDa gelatinase production by tumor-necrosis factor-alpha via alpha 5 beta 1 integrin in HL-60 cells.
J Biol Chem 273 (1998) 11583 – 11588.
- [224] **Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L., Arnaout, M. A..**
Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha v beta 3.
Science 294 (2001) 339 – 345.
- [225] **Xu, L. H., Owens, L. V., Sturge, G. C., Yang, X., Liu, E. T., Craven, R. J., Cance, W. G..**
Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells.
Cell Growth Differ 7 (1996) 413 – 418.
- [226] **Yamada, K. M., Even-Ram, S..**
Integrin regulation of growth factor receptors.
Nat Cell Biol 4 (2002) E75 – E76.

-
- [227] **Yamamoto, M., Federico, M. H. H., Maria, D. A., Koike, M. A. A., Katayama, M. L. H., Roela, R. A., Sonohara, S., Brentani, M. M.**
Differential expression of fibronectin receptors during myeloid differentiation and in marrow- and peripheral blood-derived leukemic cells.
Int J Hematol 58 (1993) 169 – 176.
- [228] **Zhang, Z., Vuori, K., Reed, J. C., Ruoslahti, E.**
The $\alpha 5\beta 1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates bcl-2 expression.
Proc Natl Acad Sci USA 92 (1995) 6161 – 6165.
- [229] **Zimmermann, K. C., Bonzon, C., Green, D. R.**
The machinery of programmed cell death.
Pharmacol Ther 92 (2001) 57 – 70.

DANKVERMERK

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Priv. Doz. Dr. med. Nils Cordes für die großzügige Bereitstellung des Themas sowie des Arbeitsplatzes bedanken und für die Möglichkeiten, nationale Kongresse zu besuchen. Zudem danke ich Herrn Cordes ganz besonders herzlich für die exzellente und nimmermüde Betreuung dieser Arbeit. Die inspirierenden Gespräche und Anregungen trugen sehr zum Gelingen dieser Dissertation bei.

Herrn Prof. Dr. med. M. Molls danke ich für seine Bereitschaft, diese Arbeit vor der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zu vertreten sowie für den interessanten Einblick in die Welt der Strahlentherapie.

Herrn Prof. Dr. med. D. van Beuningen und Herrn Priv. Doz. Dr. med. V. Meineke möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Arbeit am Institut für Radiobiologie der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München durchführen zu können. Des Weiterhin möchte ich dem gesamten Team des Instituts für Radiobiologie der Sanitätsakademie der Bundeswehr für die großartige Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima danken.

Meinen Eltern danke ich besonders, dass sie mich über all die Jahre in allen Lebenslagen unterstützt haben. Ebenso gebührt all meinen Freunden, allen voran Bine und Julia, ein besonderer Dank für ihre Unterstützung und Aufmunterung auch in schweren Stunden.

Abschließend gilt mein Dank ganz besonders meinem Michael, der durch seine liebevolle und verständnisvolle Art maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name: Franziska C. Heß
Geburtsdatum und –ort: 20/07/1979 in Weiden i. d. Oberpfalz
Nationalität: Deutsch
Adresse: Johann-Michael-Fischer Weg 7
82229 Seefeld

Beruf

seit 08/2005: Assistenzärztin Abteilung für Chirurgie
Krankenhaus Weilheim (Prof. Dr. med. G.
Hauer)

Ausbildung

Promotion: seit 10/2001 Doktorandin am Institut für
Radiobiologie der Sanitätsakademie der
Bundeswehr in München zum Thema „Die
Rolle von Zell-Matrix-Interaktionen für die
strahleninduzierte Apoptose von humanen
promyelozytischen HL60-Zellen“.

Studium:

04/2005: Ärztliche Prüfung und Approbation
10/2000 – 05/2005: Klinische Abschnitt des Studiums für
Humanmedizin an der Technischen
Universität München
10/1998 – 09/2000: Vorklinischer Abschnitt des Studiums für
Humanmedizin an der Universität
Regensburg

Schulzeit:

09/1989 – 06/1998: Gymnasium Neustadt / Waldnaab
09/1985 – 07/1989: Grundschule Neustadt / Waldnaab