



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

Untersuchungen zur Integrin $\alpha\beta3$ -vermittelten
Apoptoseregulation in humanen
Ovarialkarzinomzellen

Julia Franziska Hingerl

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

Doktorin der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer*innen der Dissertation: 1. Prof. Dr. Ute Reuning

2. Prof. Dr. Marion B. Kiechle

Die Dissertation wurde am 18.11.2021 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.07.2022
angenommen.

Meinen Eltern

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Dolinschek, R., J. Hingerl, A. Benge, C. Zafiu, E. Schuren, E. K. Ehmoser, D. Lossner and U. Reuning (2021). "Constitutive activation of integrin alphavbeta3 contributes to anoikis resistance of ovarian cancer cells." Mol Oncol **15**(2): 503-522.

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	9
1. Das Ovarialkarzinom.....	9
1.1. Aszites und Sphäroidformation – Metastasierungswege des Ovarialkarzinoms	11
1.2. Integrin $\alpha\beta 3$ und das Ovarialkarzinom	14
2. Integrine	15
2.1. Integrin $\alpha\beta 3$ und seine Struktur	17
2.2. Integrin-Aktivierung durch Konformationsänderung.....	19
2.3. Integrin-vermittelte bidirektionale Signaltransduktion	23
3. Apoptose.....	26
3.1. Anoikis	28
4. Zielsetzung der vorliegenden Dissertation.....	32
II. Material und Methoden.....	33
1. Materialien	33
1.1. Zelllinie und Integrin $\alpha\beta 3$ -Mutanten.....	33
1.2. Reagenzien für die Zellkultur	36
1.2.1. Media und Lösungen für die Zellkultur	36
1.3. Antikörper.....	37
1.3.1. Antikörper für die Westernblot-Analyse	37
1.3.2. Antikörper für die Immunzytochemie	38
1.4. Chemikalien	39
1.5. Lösungen und Puffer.....	40
1.6. Gebrauchsfertige Lösungen.....	41
1.7. Sonstige Labormaterialien	41
1.8. Laborgeräte.....	42
2. Methoden	44
2.1. Zellkultur	44
2.1.1. Zellkultivierung.....	44
2.1.2. Zellzählung	44
2.1.3. Erstellen einer Zellsuspension in Kultur	45
2.1.4. Nachweis einer Mykoplasmeninfektion in der Zellkultur mittels PCR-Analyse	45
2.2. Proteinnachweis mittels Westernblot-Analyse	46
2.2.1. Herstellung von Polyacrylamidgelen für SDS-PAGE.....	48
2.2.2. Nachweis aktivierter Caspase-3	49
2.2.3. Nachweis von <i>p-Src</i>	49

2.2.4.	Nachweis von <i>Src</i>	50
2.2.5.	Nachweis von <i>p-FAK</i>	50
2.2.6.	Nachweis von <i>FAK</i>	50
2.2.7.	Nachweis von <i>p-Akt</i>	51
2.2.8.	Nachweis von <i>Akt</i>	51
2.3.	Immunzytochemie	51
2.3.1.	Nachweis aktivierter Caspase-3	51
2.4.	Durchflusszytofluorometrie	52
2.4.1.	Apoptosenachweis mittels Annexin V-Fluorescein-Färbung	53
2.4.1.1.	Suspensionszellen in DMEM	53
2.4.1.2.	Suspensionszellen in Aszites	54
2.5.	Immunzytochemische Darstellung des Apoptoseverhaltens mittels Annexin V-Fluorescein-Färbung	55
2.6.	Darstellung von Zellclustern	55
2.7.	Statistische Datenanalyse	55
III.	Ergebnisse	56
1.	Darstellung des Einflusses von Aszites auf die Apoptoseregulation in Suspension kultivierter OV-MZ-6 Zellen als Funktion des Integrin $\alpha\beta 3$-Aktivierungsstatus	56
1.1.	Nachweis früher Apoptose-Merkmale mittels Annexin V-Fluorescein- Färbung	56
1.1.1.	Darstellung in der Durchflusszytofluorometrie	57
1.1.2.	Darstellung mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie	60
2.	Aktivierung von Caspase-3 als Merkmal finaler Apoptoseprozesse in suspendierten Ovarialkarzinomzellen als Funktion des Integrin $\alpha\beta 3$- Aktivierungsstatus	61
2.1.	Darstellung aktivierter Caspase-3 mittels Westernblot-Analyse	61
2.2.	Immunzytochemischer Nachweis der aktivierten Caspase-3 und Auswertung mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie	63
3.	Darstellung der Clusterbildung in Abhängigkeit der unterschiedlichen Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Sequenzen in suspendierten OV-MZ-6 Zelltransfektanten	64
4.	Aktivierung der Integrin-assoziierten Signalmoleküle Fokale Adhäsionskinase (<i>FAK</i>), <i>Src</i>-Kinase und <i>PKB/Akt</i>-Kinase in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand des Integrin $\alpha\beta 3$ in adhärenten und suspendierten OV-MZ-6-Zelltransfektanten	66
4.1.	Darstellung der <i>FAK</i> -Expression und Aktivierung mittels Westernblot- Analyse	66

4.2.	Darstellung der <i>Src</i> -Kinase-Expression und Aktivierung mittels Westernblot-Analyse	69
4.3.	Darstellung der <i>PKB/Akt</i> -Kinase-Expression und Aktivierung mittels Westernblot-Analyse	72
IV.	Diskussion	76
1.	Die Integrin $\alpha\beta 3$-Aktivierung in humanen Ovarialkarzinomzellen und ihre Auswirkung auf das verankerungsunabhängige Zellüberleben	77
2.	Effekte einer konstitutiven Integrin $\alpha\beta 3$-Aktivierung auf das Überleben und die Anoikisresistenz von Ovarialkarzinomzellen als Funktion der Aktivierung intrazellulärer Integrin-Signalwege	81
3.	Integrin $\alpha\beta 3$ als therapeutische Zielstruktur	83
V.	Zusammenfassung	89
VI.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	91
VII.	Danksagung	94
VIII.	Literaturverzeichnis	95
1.	Zeitschriftenartikel	95
2.	Internetquelle.....	127

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bcl-2	B-cell leucemia 2 protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin (Bovines Serumalbumin)
CLSM	Confocal laser-scanning microscopy (konfokales Lasermikroskop)
c-myc	Cellular homologue avian myelocytomatosis virus oncogene
c-Src	Cellular homologue rous sarcoma oncogene
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal growth factor receptor (Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
EOC	Epithelial ovarian cancer (epitheliales Ovarialkarzinom)
Erk _{1/2}	Extracellular signal regulated kinases 1/2 (MAPK)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Foetal calf serum (fetales Kälberserum)
FN	Fibronectin (Fibronektin)
GAM	Growth Arrest Medium (Medium zur Wachstumshemmung)
GAPDH	Glyceraldehyd 3-Phosphate Dehydrogenase
GpA	Glycophorin A
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
h	Stunde(n)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IgG	Immunoglobulin G
IP	Immunpräzipitation
ICC	Immunocytochemistry (Immunzytochemie)
kDa	Kilo Dalton
mAk	Monoklonaler Antikörper
MAK	Membran-Angriffs-Komplex
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
min.	Minute(n)
mM	Millimol
nm	Nanometer
p	Phosphat-Gruppe
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium iodide (Propidium Jodid)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKB/Akt	Protein kinase B/cellular homologue AKT8 virus oncogene
pN	Pico Newton

RGD	Arginin-Glycin-Aspartat Tripeptid
RT	Raumtemperatur
S.D.	Standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
TBS	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBS-T	Tris-buffered saline - Tween®
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
VN	Vitronektin
v/v	Volumen per Volumen
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
w/v	Weight per volume (Masse per Volumen)
µg	Mikrogramm

I. EINLEITUNG

1. Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom stellt die gynäkologische Tumorentität mit der höchsten Letalität in den Industrienationen dar (Carioli et al. 2020). Dies liegt unter anderem an der meist späten Diagnosestellung aufgrund fehlender Frühsymptome sowie an mangelnden Screening-Untersuchungen. Schätzungen zufolge gab es in den USA im Jahr 2020 ca. 21.000 Neuerkrankungen und ca. 14.000 Ovarialkarzinom-bedingte Todesfälle (Carioli et al. 2020). Für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms besteht in den USA aktuell ein Lebenszeitrisko von 1,3%, was in etwa einer unter 78 Frauen entspricht (Torre et al. 2018).

Prinzipiell können aus allen Zellarten des Ovars maligne Tumoren entstehen, den größten Anteil machen jedoch epitheliale Ovarialkarzinome (EOC) aus. Diese heterogene Gruppe kann wiederum in zwei Hauptgruppen unterteilt werden (Karst und Drapkin 2010). Typ I sind niedrig-maligne und langsam wachsende Tumore, die nach ihrer histologischen Klassifizierung den serösen, endometrioiden, muzinösen oder klarzelligigen Ovarialkarzinomen zugeordnet werden können. Typ II-Karzinome entstehen am ehesten aus den epithelialen Zellen der Eileiter, sind hoch-maligne und können histologisch in seröse Karzinome, epitheliale Mischtypen und undifferenzierte Karzinome unterteilt werden (Karst und Drapkin 2010, Sodek et al. 2012).

Gemäß der Definition der „Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique“ (FIGO) wird der Tumorprogress des Ovarialkarzinoms in vier Stadien unterteilt, wobei Stadium I die lokale Ausbreitung in einem oder beiden Ovarien, Stadium II und III die Ausbreitung von den Organen des kleinen Beckens bis in die Bauchhöhle und den Befall von Lymphknoten und Stadium IV extraperitoneale metastatische Absiedelungen beschreibt (Shepherd 1989, Cannistra 2004, Colombo et al. 2006). Da die frühen Stadien meist asymptomatisch verlaufen, wird das Ovarialkarzinom oft erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, wenn die intraperitoneale Ausbreitung zu Symptomen wie Völlegefühl, Appetitlosigkeit und

Bauchumfangszunahme aufgrund des erhöhten abdominalen Drucks durch Aszites und Befall des Omentums führt (Cannistra 2004). Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit liegt zu diesem Zeitpunkt nur noch bei etwa 30% (Jemal et al. 2004), sodass die späte Diagnosestellung den Hauptgrund für die schlechte Prognose von Patientinnen mit dieser Tumorerkrankung darstellt.

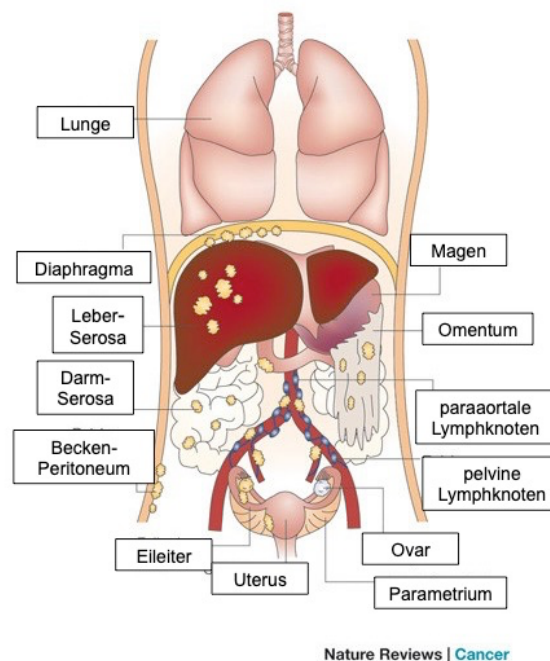


Abbildung 1: Metastasierung des Ovarialkarzinoms

Nachdem Tumorzellen die Kapsel des Eierstocks durchbrochen haben, können sie sich ungehindert im Bauchraum ausbreiten. Zum einen geschieht das durch direkte Ausbreitung auf die umliegenden Organe (Eileiter, Uterus und Peritoneum), zum anderen werden abgelöste Tumorzellen durch die physiologische Peritonealflüssigkeit transportiert und können sich so im gesamten Bauchraum verteilen. Tumorzellabsiedelungen finden sich besonders häufig im Omentum und im Mesenterium. Zudem bildet sich im Zuge der peritonealen Tumoraussaat Aszitesflüssigkeit, mittels derer die abgelösten Tumorzellen flottierend in der Bauchhöhle verteilt werden. Die lymphatische Ausbreitung erfolgt in die pelvinen und paraaortalen Lymphknoten (Naora und Montell 2005). Abb. modifiziert nach (Naora und Montell 2005).

Primärer Therapieansatz ist – anders als bei anderen Tumorarten – auch in fortgeschrittenen und metastasierten Stadien die Zytoreduktion, d.h. ein ausgedehntes operatives Tumordebulking mit dem Ziel eines postoperativen Tumorrests <1cm. Dies hat den größten Einfluss auf das

Überleben der Patientin. Im Anschluss an die operative Therapie erfolgt in der Regel eine Platin- und Taxan-haltige Chemotherapie. Trotz anfänglich guter Wirksamkeit dieses Therapieschemas kann jedoch auch hierdurch die Entstehung von resistenten Rezidiven meist nicht verhindert werden (Agarwal und Kaye 2003, Cannistra 2004, Chien et al. 2007, Sodek et al. 2012).

Um effektivere Therapieansätze zu entwickeln sind daher weiterführende Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen, die zur Verbreitung und Invasivität der Ovarialkarzinomzellen beitragen sowie Untersuchungen zu Mechanismen des Zellüberlebens von Tumorzellen, die in die Aszitesflüssigkeit freigesetzt werden und sich hier bis zur Absiedelung auf den Organen des kleinen Beckens in Suspension ohne EZM-Kontakt in einem wenn auch beschränkten Zeitraum als überlebensfähig erweisen, notwendig.

1.1. Aszites und Sphäroidformation – Metastasierungswege des Ovarialkarzinoms

Das Ovarialkarzinom unterscheidet sich in seinem Metastasierungsverhalten grundlegend von anderen Tumorentitäten (Chambers et al. 2002, Pantel und Brakenhoff 2004). Die Ausbreitung der Tumorzellen kann direkt auf benachbarte Organe erfolgen, insbesondere aber werden abgelöste Tumorzellen über die physiologische Bewegung der Peritonealflüssigkeit in der gesamten Bauchhöhle verteilt (vgl. Abb. 2). Diese peritoneale Aussaat ist meist mit der Produktion von Aszites („Bauchwasser“) vergesellschaftet. Eine hämatogene Metastasierung wie bei anderen Karzinomen ist dagegen vergleichsweise selten (Naora und Montell 2005).

Etwa ein Drittel der Ovarialkarzinompatientinnen entwickelt im Verlauf ihrer Erkrankung Aszites, eine Ansammlung exsudativer Flüssigkeit in der Bauchhöhle (Ahmed und Stenvers 2013). Diese entsteht durch das Zusammenspiel von vermindertem Lymphabfluss, Obstruktion der Lymphabflusswege, erhöhter Gefäßpermeabilität und Zellsekretion (Tan et al. 2006) und korreliert mit einer schlechteren Prognose (Carduner et al. 2014). Die Aszitesflüssigkeit, die eine einzigartige Tumor-Mikroumgebung

darstellt, enthält eine Fülle an Überlebensfaktoren wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone, Angiogenesefaktoren, Proteasen und EZM-Proteine, die die Tumorzellfunktionen im Hinblick auf Adhäsion, Migration, Invasion und Überleben maßgeblich beeinflussen können (Puiffe et al. 2007, Lane et al. 2010, Carduner et al. 2013).

Lane et al. haben gezeigt, dass maligner Aszites die Aktivierung von Apoptosemechanismen durch sogenannte Todesrezeptoren wie „tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand“ (TRAIL) inhibieren und somit zum Zellüberleben beitragen kann (Lane et al. 2007).

Die peritoneale Metastasierung hängt also zu einem Großteil von der Fähigkeit der abgelösten Ovarialkarzinomzellen ab, im Bauchraum flottierend zu überleben und später an das Mesothel der Bauchhöhle zu adhären und dieses zu infiltrieren. Diese Zellen können in Aszites sowohl als Einzelzellen, aber auch als multizelluläre Sphäroide vorkommen (Allen et al. 1987, Naora und Montell 2005, Shield et al. 2009). Die Sphäroidbildung wiederum könnte über Ausbildung einer „verankerungsunabhängigen“ Tumor-Mikroumgebung das Überleben der Tumorzellen durch die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten und zellulären Co-Stimulationen sichern und so zur peritonealen Verbreitung der Tumorzellen beitragen (Shield et al. 2009). Zudem haben Shield et al. gezeigt, dass Sphäroide *in vitro* in der Lage sind, „verankerungsunabhängig“ zu überleben (Shield et al. 2007).

An der Sphäroidbildung vom Primärtumor abgelöster Zellen sind Cadherine, eine Familie von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen (Waleh et al. 1994) maßgeblich beteiligt. Die Verankerung an der EZM wiederum erfolgt über die Vermittlung von Integrinen (Burleson et al. 2004, Shield et al. 2007). Die Aktivierung von Proteasen, den sog. Matrix-Metalloproteasen (MMPs) führt schließlich zur Degradierung der Basalmembran, wodurch die Gewebsinfiltration ermöglicht und die Metastasenbildung gewährleistet wird (Shield et al. 2009) (vgl. Abb. 2).

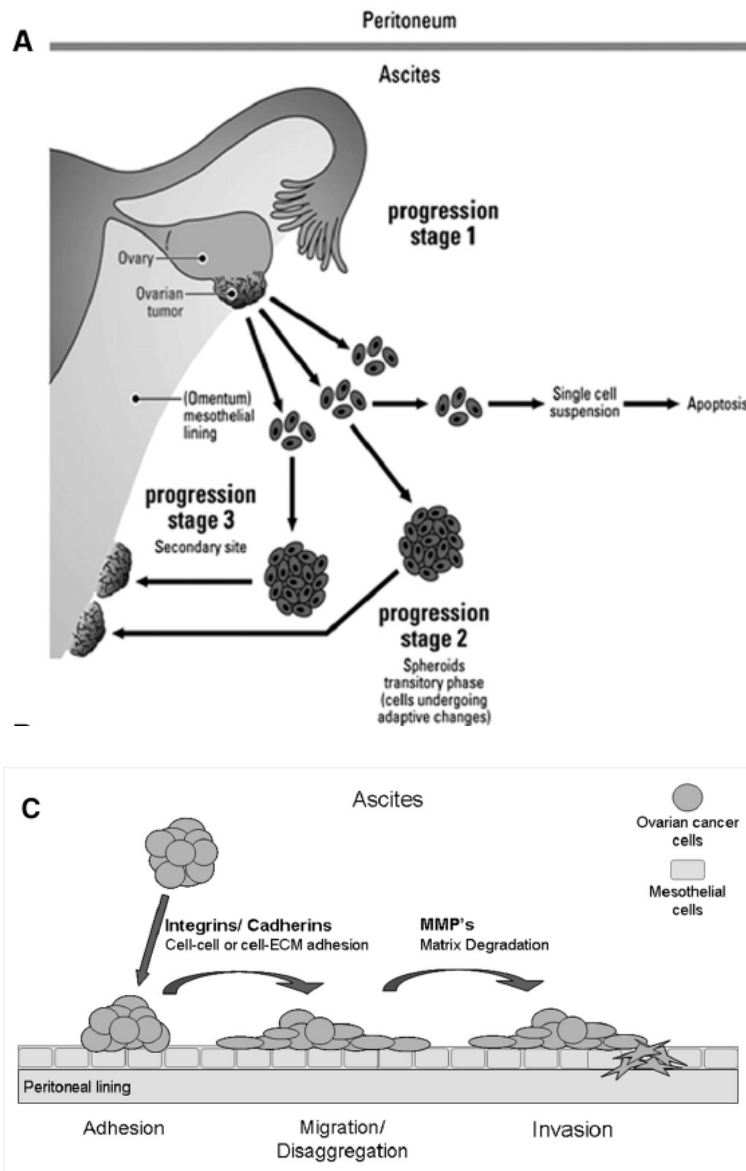


Abbildung 2: Modell der Tumorphyse des Ovarialkarzinoms

A) Schematische Darstellung des möglichen Verlaufs der peritonealen Aussaat, welche hier in drei Stadien unterteilt wird: Stadium 1 bezeichnet das initiale Tumorwachstum im Bereich des Ovars und der Tuba uterina. Im Stadium 2 kommt es zur Ablösung einzelner Tumorzellen vom Primärtumor, welche entweder in die Apoptose gehen oder sich zu Sphäroiden formieren. Stadium 3 bezeichnet die Adhäsion und Invasion einer Sekundärlokalisation wie z.B. des Omentum majus. C) Darstellung der Metastasenbildung durch multizelluläre Sphäroide in Ascites: Adhäsion der Sphäroide an das Mesothelium der Peritonealhöhle durch Zell-EZM-Adhäsionsmoleküle (Integrine) und Disaggregation durch Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle (Cadherine). Infiltration des Mesotheliums und der EZM durch Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und die Degradation der Basalmembran (Shield et al. 2009). Abb. aus (Shield et al. 2009).

Wie Makhija et al. gezeigt haben, schützt die Sphäroidformation Ovarialkarzinomzellen zudem vor Apoptose, die durch Bestrahlung oder Chemotherapie mit Taxol therapeutisch angestrebt wird (Makhija et al.

1999). Dies kann zum einen durch die Schaffung eines metabolischen Dichtegradienten erfolgen, der verhindert, dass Chemotherapeutika die innersten Zellschichten erreichen (Sutherland und Durand 1976, Kobayashi et al. 1993), zum anderen führt das Wachstum unter „verankerungsunabhängigen“ Bedingungen zu einem Zellzyklusarrest (Carduner et al. 2014), sodass Chemotherapeutika, die insbesondere stark proliferierende Zellen wie Tumorzellen angreifen, ihre Wirkung verlieren.

1.2. Integrin $\alpha\beta 3$ und das Ovarialkarzinom

Integrinen und insbesondere dem Integrin $\alpha\beta 3$ kommt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese verschiedenster Tumore zu (Nemeth et al. 2007). Zudem wird es im Zuge der Progression des Ovarialkarzinoms verstärkt exprimiert (Hemminki et al. 2001).

So konnten Liapis et al. zeigen, dass Integrin $\alpha\beta 3$ in primären Ovarialkarzinomzellen signifikant höher exprimiert wird, als in niedrig-malignen Ovarialtumoren (Liapis et al. 1997). Diese Überexprimierung führte in Anwesenheit des Integrin-Liganden VN *in vitro* zu einer signifikant verbesserten Tumorzelladhäsion, einer dadurch gesteigerten Zellmigration und Veränderungen des Zytoskeletts und der Zellmorphologie sowie zu einer erhöhten Proliferationsrate humaner Ovarialkarzinomzellen (Hapke et al. 2003). Zudem beobachteten Wang et al., dass die Expression von Integrin $\alpha\beta 3$ mit einer peritonealen Metastasierung korreliert und somit für die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Metastasierung von Bedeutung sein könnte (Wang et al. 2011).

Diese Eigenschaften machen Integrin $\alpha\beta 3$ sowie die zellulären Auswirkungen seiner Aktivierung bzw. Inaktivierung auf humane Ovarialkarzinomzellen zu einem interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

2. Integrine

Die Familie der Integrine beschreibt eine Gruppe von Transmembranproteinen, welche in der Welt der Metazoen die wichtigste Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen darstellt. Integrine vermitteln sowohl Zell-Zelladhäsion als auch Zelladhäsion an Proteine der extrazellulären Matrix (EZM). Zudem bilden sie Verbindungen zum Zytoskelett und führen zur Aktivierung von multiplen intrazellulären Signalwegen, wodurch sie eine Schlüsselrolle bei der Zellmigration, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und dem Zellüberleben sowie bei vielen weiteren wichtigen Zellfunktionen einnehmen. Aufgrund dieses immensen Einflusses auf die Zellfunktionen sind Integrine maßgeblich an den physiologischen Abläufen bei der Embryonalentwicklung, der Inflammation, der Aktivierung des Immunsystems und der Hämostase beteiligt. Andererseits kann ihre Dysregulation zur Ausbildung von Pathologien wie Autoimmunkrankheiten, Thrombose und insbesondere auch zum Wachstum und zur Metastasierung vielzähliger Tumoren beitragen (Hynes 2002, Shattil et al. 2010).

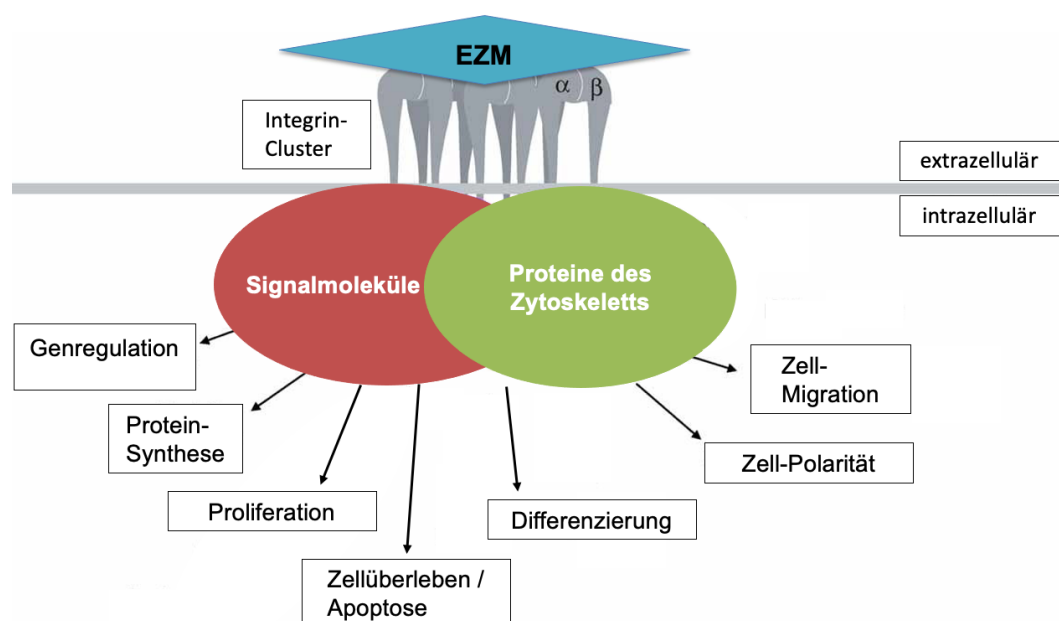


Abbildung 3: Übersicht über die zellulären Auswirkungen der Integrin-vermittelten Zell-Matrix-Adhäsion und Signaltransduktion

Integrin-Cluster vermitteln die Adhäsion der Zelle an die extrazelluläre Matrix (EZM) und rekrutieren über ihre zytoplasmatischen Domänen eine Vielzahl an Signalmolekülen sowie Proteinen des Zytoskeletts, die vielfältige Zellfunktionen

wie Zelldifferenzierung, Zellüberleben / Apoptose, Zellproliferation, Zellmigration und β -polarität sowie die Proteinsynthese und die Genregulation beeinflussen (Berrier und Yamada 2007). Abb. modifiziert nach (Berrier und Yamada 2007).

Die Bindung der Integrine an die vielfältigen Liganden der EZM führt zur Gruppierung mehrerer Integrine in einem sog. Integrin-Cluster, was eine erhöhte lokalisierte Konzentration dieser Rezeptoren – auch mit anderen Zelloberflächenproteinen, wie zum Beispiel Tetraspaninen, Wachstumsfaktor-Rezeptoren und dem Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor (Miranti und Brugge 2002) – sowie intrazellulärer Signalmoleküle mit sich bringt (Li et al. 2005, Berrier und Yamada 2007). An diesen Zell-EZM-Adhäsionskomplexen sind mehr als 50 zytoplasmatische Signalmoleküle und Zytoskelettproteine beteiligt (Lo 2006). Eines dieser Zytoskelettproteine ist Talin, das die Rekrutierung von Actin-Filamenten an die β -Untereinheit der Integrine und somit die Verbindung zum Zytoskelett vermittelt (Horwitz et al. 1986, Critchley 2004, Nayal et al. 2004) und das eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Integrine einnimmt (Tadokoro et al. 2003).

Eines der meist untersuchten Integrine ist das Integrin $\alpha\beta 3$. Dieses Integrin wurde 1985 von Pytela erstmals aus Plazentagewebe extrahiert und 1986 von Suzuki kloniert und sequenziert (Horton 1997). Es ist physiologischerweise in den unterschiedlichen Geweben eines erwachsenen Organismus nicht sehr verbreitet und zeigt nur eine geringe Expression in Zellen des Intestinaltrakts, des Gefäßsystems sowie in den Zellen der glatten Muskulatur des Uterus. Außerdem findet es sich in aktivierten Leukozyten, Makrophagen und in Osteoklasten (Eliceiri und Cheresch 1999). Andererseits zeigen durch angiogene Wachstumsfaktoren wie dem *fibroblast growth factor-2* (FGF-2), TNF- α und dem Interleukin-8 (IL-8) aktivierte Endothelzellen des Gefäßsystems hohe Expressionsspiegel an Integrin $\alpha\beta 3$, was dessen wichtige Rolle in Bezug auf die Regulierung der Angiogenese widerspiegelt (Danhier et al. 2012). Diese Wachstumsfaktoren sind in Wunden, Entzündungsherden und epithelialen Tumoren hochreguliert (Brooks et al. 1994, Avraamides et al. 2008).

Als Zelladhäsionsmolekül erkennt Integrin $\alpha\beta 3$ eine Vielzahl an Proteinen

der EZM wie Vitronektin (VN), Fibronektin (FN), Fibrinogen, Thrombospondin, Collagen, von Willebrand-Faktor und Osteopontin. Allen gemein ist das Erkennungsmotiv des Aminosäuren-Tripletts Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) (Eliceiri und Cheresh 1999).

Im Folgenden sollen nun die Struktur dieses Integrins sowie die Mechanismen der Aktivierung und Inaktivierung, die die Grundlage für diese Arbeit darstellen, genauer betrachtet werden.

2.1. Integrin $\alpha\beta3$ und seine Struktur

Integrine sind heterodimere, transmembranäre Typ I-Glykoproteine, welche aus jeweils einer nicht-kovalenten α - und einer β -Untereinheit bestehen. Die Untereinheiten wiederum setzen sich jeweils aus einer großen extrazellulären Domäne (ca. 80-150 kDa), einer einzelnen transmembranären α -Helix sowie einer relativ kleinen intrazellulären Domäne zusammen (Humphries 2002, Campbell und Humphries 2011). Nach bisherigen Erkenntnissen besitzen Säugetiere insgesamt 8 β - und 18 α -Untereinheiten, welche 24 verschiedene Integrin-Heterodimere bilden (Hynes 2002).

Xiong und Mitarbeiter haben die Kristallstruktur von Integrin $\alpha\beta3$ entschlüsselt (Xiong et al. 2001). Die N-terminalen extrazellulären Domänen der α - und β -Untereinheit bilden gemeinsam eine Kopfstruktur („head“) des Integrins, an die EZM-Liganden binden. Dabei besteht die α -Untereinheit aus einem sieben-blättrigen β -Propeller (Springer 1997), gefolgt von drei β -Sandwich Domänen: einer Immunglobulin (Ig)-entsprechenden „thigh“-Domäne und zwei sehr ähnlichen Domänen, die den sogenannten „calf“ bilden. Die β -Untereinheit besteht aus einer β A-Domäne, die aus einer Immunglobulin (Ig)-ähnlichen „Hybrid“-Domäne entspringt, gefolgt von einer „PSI“ (Plexin, Semaphorin und Integrin)-Domäne, vier *epidermal growth factor* (EGF)- und einer β -„tail“-Domäne(n) (β -TD).

In einer weiteren Arbeit zeigen Xiong et al., dass die Liganden-Bindungsstelle im Bereich des Integrin-„heads“ in einem Spalt zwischen dem β -Propeller und der β A-Domäne liegt (Xiong et al. 2002) (vgl. auch Abb. 4).

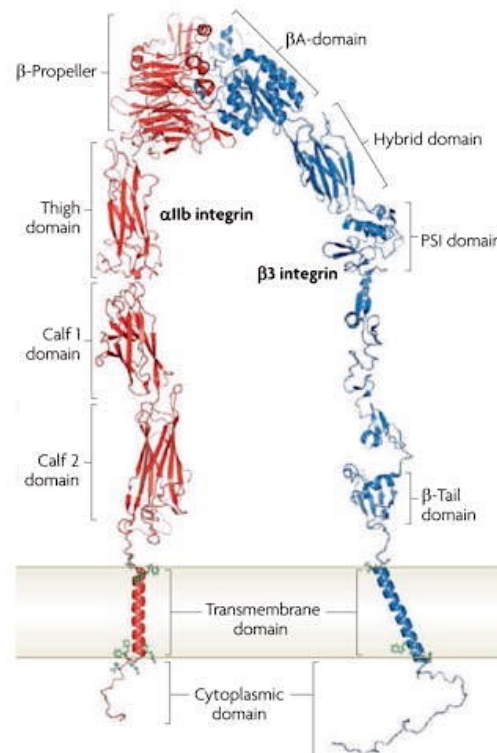


Abbildung 4: Struktureller Aufbau der Integrin-Domänen

Die heterodimeren Integrine bestehen aus jeweils einer α - und einer β -Untereinheit. Dargestellt ist hier die Struktur von Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, das eine große Homologie zum Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ aufweist. Die N-terminalen Domänen der α - und β -Untereinheiten (in der Abbildung zu sehen als β -Propeller und βA -Domäne) bilden die „head“-Struktur und stellen die Liganden-Bindungsstelle dar. Die C-terminalen Domänen beider Untereinheiten bilden die „tails“, welche im Bereich der α -Untereinheit wiederum in „thigh“ und „calf“ unterteilt werden. Im Bereich der β -Untereinheit schließt sich an die βA -Domäne eine Ig-entsprechende „Hybrid“-Domäne sowie eine „PSI“-Domäne, vier *epidermal growth factor* (EGF)- und eine β -„tail“-Domäne an (Xiong et al. 2001, Shattil et al. 2010). Abb. aus (Shattil et al. 2010).

Das Verbindungsstück zwischen extra- und intrazellulärem Anteil bildet die sog. Transmembrandomäne (TMD), der über Konformationsänderungen eine wesentliche Rolle bei der Integrinaktivierung und bei der Signaltransduktion zukommt (Kim et al. 2011). Die Struktur dieses Abschnitts ist Gegenstand intensiver Forschung und wurde lange kontrovers diskutiert (Li et al. 2001, Vinogradova et al. 2002, Luo et al. 2004, Gottschalk 2005, Li et al. 2005, Partridge et al. 2005). Lau und Mitarbeitern gelang es schließlich, die NMR-Struktur (NMR = *nuclear magnetic resonance*, Kernspinresonanz) der TMD von Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ zu entschlüsseln (Lau et al. 2008, Lau et al. 2008, Lau et al. 2009). In diesem Modell ist die αIIb -TMD-Helix kürzer und nimmt in Bezug auf die

Zellmembran eine aufrechte Position ein, wohingegen die β 3-TMD-Helix länger ist und eine um 25° gekippte Position zur α II-TMD-Helix einnimmt. Beide Helices sind rechtsgängig und damit thermodynamisch instabiler, was eine wichtige Rolle bei der Separation der TMD und somit der Integrinaktivierung und Signalübertragung spielt (Hoefling et al. 2009).

2.2. Integrin-Aktivierung durch Konformationsänderung

Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Integrinaktivierung mit Konformationsänderungen in der Integrinstruktur einhergeht (Takagi et al. 2002, Mould et al. 2003, Takagi et al. 2003, Xiao et al. 2004, Iwasaki et al. 2005, Nishida et al. 2006).

Strukturelle Analysen legten nahe, dass Integrine verschiedene Konformationszustände annehmen können (Luo et al. 2007): i) eine zur Zellmembran hin gebeugte Konformation mit geschlossenem Kopfstück "bent (closed)" (Xiong et al. 2001), ii) eine gestreckte/aufrechte Konformation mit entweder geschlossener ("extended closed") oder geöffneter ("extended open") „head“-Domäne (Takagi et al. 2002, Nishida et al. 2006) (vgl. hierzu Abb. 5).

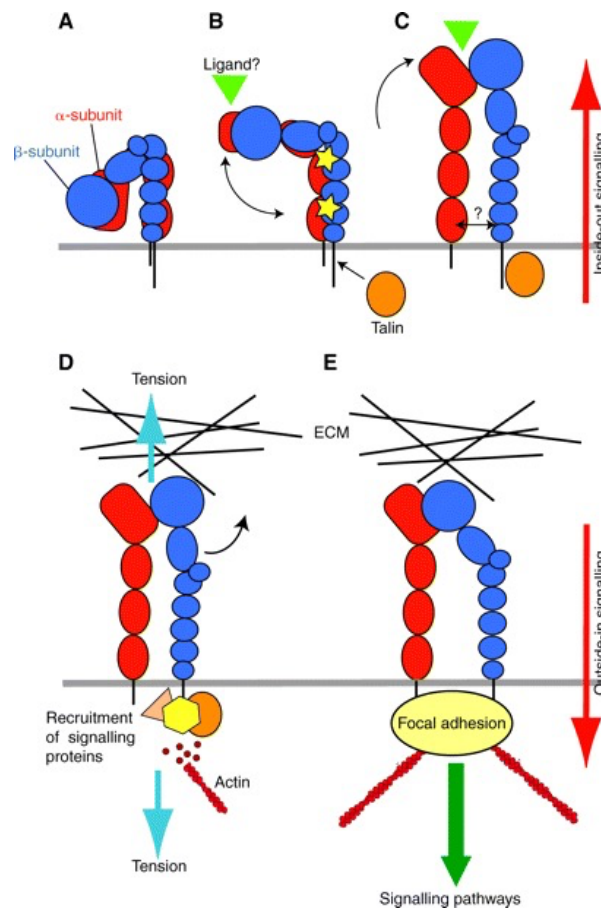


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Integrin-Konformationsänderungen im Zuge der Integrinaktivierung als Voraussetzung für eine Integrin-vermittelte bidirektionale Signaltransduktion

Die α -Integrinuntereinheit ist rot dargestellt, die β -Untereinheit blau. In der Abbildung sind die drei bislang postulierten Konformationszustände während der Integrinaktivierung dargestellt. (A) zeigt den inaktivierten Zustand, (B) den „primed“ Zustand als Vorbereitung für die Ligandenbindung und (C) die Bindung eines Liganden (der Ligand ist hierbei als grünes Dreieck dargestellt). Hierbei stehen die Bilder (A)-(C) für die „inside-out“ Signaltransduktion, die Bilder (D) und (E) für die „outside-in“ Signaltransduktion. A) Im inaktivierten Zustand findet sich das Integrin in einer gebeugten („bent“) Konformation, wobei sowohl die Extrazellulärdomänen als auch die TMD und die zytoplasmatischen Domänen der α - und der β -Untereinheit assoziiert vorliegen. B) Intrazelluläre Signale, insbesondere die Bindung von Talin (hier als oranges Oval dargestellt) an die zytoplasmatische Region der β -Untereinheit, führen zur Aufrichtung des Integrins sowie zur Exposition und Konformationsänderung der Liganden-Bindungsstelle der Hybrid-Domäne. Dies führt zu einer hohen Liganden-Bindungsaffinität. C) Im „primed“ Zustand kommt es zur Bindung des Liganden und zur Aufrichtung der Extrazellulärdomäne. Dies stellt den Abschluss der „inside-out“ Signaltransduktion dar. D) Durch die Bindung an das Zytoskelett wird das Integrin einer Zugspannung ausgesetzt. E) Die auf diese Weise auf die „head“-Domäne des Integrins wirkende Kraft führt durch Bewegung der Hybrid-Domäne zu einer Verstärkung der Ligandenbindung und zur Etablierung stabiler fokaler Adhäsionskomplexe sowie zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden (dargestellt als grüner Pfeil). Dies stellt den Abschluss der „outside-in“ Signaltransduktion dar (Askari et al. 2009). Abb. aus (Askari et al. 2009)

Die „bent“ und damit weitgehend inaktive Konformation, die eine verminderte, jedoch nicht gänzlich aufgehobene EZM-Liganden-Affinität aufweist, wird durch Assoziationen zwischen der α - und der β -Integrinuntereinheit, sowohl der extrazellulären als auch der TMD- und der intrazellulären Domäne, stabilisiert. Die Interaktion zwischen den Helices erfolgt hier ähnlich wie bei dem homodimeren, transmembranären Sialoglykoprotein Glycophorin A (GpA), das auf menschlichen Erythrozyten vorkommt und das in seiner Transmembrandomäne das Dimerisierungsmotiv GxxxG enthält (G steht für Glycin, x steht in diesem Fall für nicht-konservierte Aminosäuren) (Lemmon et al. 1992, Gottschalk et al. 2002, Psachoulia et al. 2010, Ludwig et al. 2021). Bereits frühe Untersuchungen zu GpA hoben die zentrale Rolle des GxxxG-Motivs für die Helix-Helix-Interaktion im transmembranären L⁷⁵IxxGVxxGVxxT⁸⁷-Motiv hervor (Lemmon et al. 1992, Treutlein et al. 1992, Adams et al. 1996, Fleming et al. 1997, Bu und Engelman 1999, Fisher et al. 1999, Petrache et al. 2000, Fisher et al. 2003, Fleming et al. 2004) (vgl. Abbildung 6).

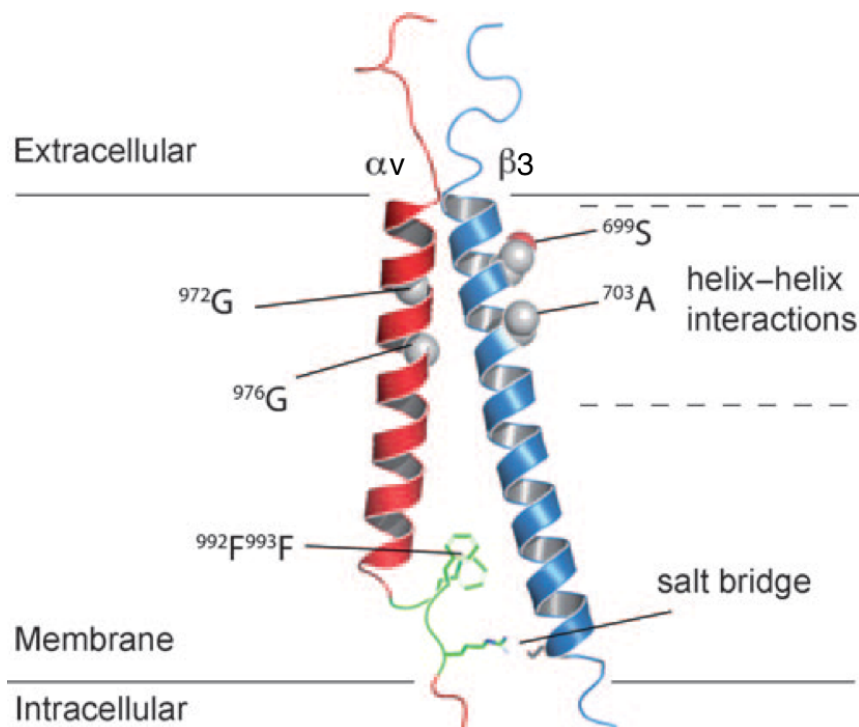


Abbildung 6: Struktur der TMD und zytoplasmatischen Domäne von Integrin $\alpha\beta 3$

Darstellung der beiden TMD-Helices und der kurzen zytoplasmatischen Regionen von Integrin $\alpha\beta 3$. Die rote Helix entspricht der α -Untereinheit, die blaue der β -Untereinheit. Das ⁹⁷²Gxxx⁹⁷⁶G-Motiv vermittelt die Dimerisierung der Integrin-TMD und ermöglicht somit die „Helix-Helix-Interaktion“ (grau). Eine weitere Interaktionsstelle ist das nahe der intrazellulären Membranseite gelegene,

konservierte GFFKR-Motiv der α -Untereinheit (grün) sowie die daran anschließende Salzbrücke (Hoefling et al. 2009). Abb. modifiziert nach (Hoefling et al. 2009).

An die TMD schließen sich auf der intrazellulären Seite der Membran die kurzen zytoplasmatischen Enden der beiden Integrinuntereinheiten an. An der β -Untereinheit findet sich hier das NPxY-Motiv, die Bindungsstelle für intrazytoplasmatische Proteine (Calderwood 2004).

Durch die Bindung von Talin oder anderer Zytoskelett-Proteine an die zytoplasmatische Domäne der β -Integrinuntereinheit kommt es zu Destabilisierung der Salzbrücke, die die α - und β -Integrinuntereinheit verbindet sowie zur Dissoziation der TMD. Als Folge davon kommt es ebenfalls zu einem Auseinanderweichen der beiden Extrazellulärdomänen. Dies führt wiederum zu einer Destabilisierung und Aufrichtung des Integrins (Luo et al. 2007, Ludwig et al. 2021).

Abb. 7 zeigt eine elektronenmikroskopische Darstellung der Kristallstruktur der Extrazellulärdomäne von Integrin $\alpha\beta 3$ in den drei beschriebenen Konformationszuständen.

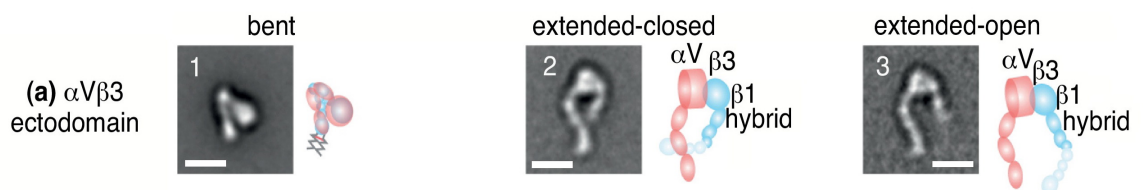


Abbildung 7: Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von Integrin $\alpha\beta 3$

Elektronenmikroskopische Darstellung der Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von Integrin $\alpha\beta 3$ in den drei verschiedenen Konformationszuständen nach (Takagi et al. 2002). Die Maßstabsleiste entspricht 10 nm. Schematische Darstellungen sind jeweils rechts abgebildet. 1) zeigt die gebeugte „bent“ und damit weitgehend inaktive Konformation der Integrin-Extrazellulärdomäne, die eine verminderte, jedoch nicht gänzlich aufgehobene EZM-Liganden-Affinität aufweist. 2) stellt die aufgerichtete „extended closed“ Konformation mit geschlossenem Kopfstück dar, die einen intermediären Konformationszustand im Zuge der Integrinaktivierung repräsentiert. 3) zeigt die aufgerichtete Konformation mit geöffnetem Kopfstück „extended open“, die zu einer Liganden-Bindungsstelle mit hoher Liganden-Bindungsaffinität führt. Abb. aus (Springer und Dustin 2012).

Im Rahmen dieser Konformationsänderungen kommt es zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade, welche neben vielen wichtigen

Auswirkungen auf die Zellfunktion auch maßgeblich am Überleben der Zelle bzw. an deren Zelltod beteiligt ist.

2.3. Integrin-vermittelte bidirektionale Signaltransduktion

Die Integrin-vermittelte Bindung von Zellen an Proteine der EZM hat ausgeprägte Auswirkungen auf die Zellfunktion. In ihrer Funktion als Verbindungselement zwischen Extra- und Intrazellulärraum erfolgt die Signaltransduktion der Integrine hierbei bidirektional über die Zellmembran hinweg, das heißt, sowohl von außen nach innen als auch von innen nach außen („outside-in“ und „inside-out“). Die Zelladhäsion ist jedoch kein statischer, sondern ein extrem dynamischer Zustand, da epitheliale Zellen unablässig ihre Umgebung sondieren und auf kleinste Veränderungen mit sofortiger Anpassung ihrer Position oder ihres Differenzierungszustands reagieren. Daher ist ein potenter Aktivierungsmechanismus für Integrine unabdingbar, um so schnell wie möglich auf diese Veränderungen reagieren zu können.

Durch die Bindung eines extrazellulären Liganden erfolgt die Signaltransduktion von außen nach innen, was wiederum eine intrazelluläre Signalkaskade zur Folge hat (Schwartz et al. 1995, Shattil und Ginsberg 1997). Diese Affinität für extrazelluläre Liganden ist durch einen intrazellulären Mechanismus gesteuert.

Integrine selbst besitzen keinerlei intrinsische enzymatische Aktivität, vielmehr sorgt eine Ansammlung von Signalkomplexen an der zytoplasmatischen Region der β -Untereinheit für die Etablierung einer Signalkaskade (Liu et al. 2000, Mitra et al. 2005, Campbell und Humphries 2011). Die Proteine, die an diesen Zell-EZM-Adhäsionskomplexen beteiligt sind, können grob in drei Klassen eingeteilt werden:

Zum einen finden sich Zytoskelettproteine, die direkt an die zytoplasmatische Domäne der β -Integrinuntereinheit binden. Beispiele hierfür sind Talin und Kindlin, welche durch ihre Bindung maßgeblich an der Integrin-Aktivierung und -Signaltransduktion beteiligt sind (Calderwood 2004). Talin besteht aus einer ≈ 47 kDA großen „head“- und einer ≈ 190 kDA großen „tail“-Domäne (Rees et al. 1990). Die „head“-Domäne enthält wiederum eine FERM-Domäne (Rees et al. 1990), die die

Hauptbindungsstelle an die β -Integrinuntereinheit darstellt (Calderwood et al. 1999, Patil et al. 1999, Yan et al. 2001). Die Aktivierung durch Talin wiederum erfordert, wie bereits im vorangehenden Kapitel beschrieben, weitreichende Konformationsänderungen der verschiedenen Integrindomänen (Harburger und Calderwood 2009).

Eine zweite Gruppe bilden die Adapter-Proteine wie zum Beispiel Vinculin, Paxillin und α -Actinin, welche keinerlei intrinsische enzymatische Aktivität besitzen und Integrin-assoziierte Proteine mit Actin oder anderen Proteinen verbinden.

Die dritte Gruppe bilden Enzyme wie die Tyrosinkinase *FAK* (*focal adhesion kinase*) und *Src*, welche nachgeschaltete Effektor-Proteine in der Signalkaskade modifizieren (Li et al. 2005), indem sie durch Phosphorylierung die intrazelluläre Anzahl an Tyrosin-phosphorylierten und somit aktivierten Proteinen erhöhen. Zudem werden auch Lipidkinasen wie *PI3K* (*Phosphatidylinositol 3-kinase*), Serin/Threonin-Kinasen und Phosphatasen durch Integrine reguliert. Die hierdurch aktivierten Signalkaskaden führen zu post-translationalen Veränderungen, die wiederum Protein-Interaktionen beeinflussen (Li et al. 2005, Berrier und Yamada 2007). Durch die Rekrutierung bestimmter Proteine an die Adhäsionskomplexe gelingt eine selektive Verbindung zwischen der Adhäsion an die EZM und der Regulierung verschiedenster Signalkaskaden, welche wiederum die Genregulation, die Organisation des Zytoskeletts sowie verschiedene andere Prozesse der Zelle kontrollieren (Hervy et al. 2006).

Eines der wichtigsten intrazellulären Proteine für die Integrin-vermittelte Signaltransduktion stellt hierbei *FAK* dar. *FAK* wird gemeinsam mit der „Integrin-linked kinase“ (*ILK*) zu sogenannten „focal adhesions“ rekrutiert, einem Proteinkomplex, der sich auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran durch Integrin-vermittelten Zell-EZM-Kontakt bildet. Im Zellinneren ist dieser „focal adhesion complex“ zudem mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden. Diese strukturelle EZM-Aktin-Verbindung ermöglicht unter anderem die Zelltraktion im Rahmen der Zellmotilität (Zaidel-Bar et al. 2007, Schiller et al. 2011, Horton et al. 2015, Tapial Martinez et al. 2020).

Durch Bildung der „focal adhesions“ erfolgt zudem eine Phosphorylierung und somit Aktivierung des Signalmoleküls *FAK*, was wiederum die Rekrutierung und Aktivierung der *Src*-Kinase zur Folge hat (Calalb et al. 1995, Lietha et al. 2007). Zusätzlich werden viele weitere Signalmoleküle zu den „focal adhesions“ rekrutiert, wodurch die Signalkaskade aktiviert wird. In diesem Zusammenhang spielt die Aktivierung von *PI3K* durch *FAK* eine wichtige Rolle. *PI3K* rekrutiert und aktiviert „protein kinase B“ (*PKB/Akt*) (Chen et al. 1996, Ilic et al. 1998, Hanks et al. 2003, Xia et al. 2004), eine Serin/Threonin-Kinase, der eine entscheidende Rolle im Zellüberleben zukommt, da sowohl die Integrin- als auch die Wachstumsfaktor-vermittelte Signaltransduktion zu ihrer Aktivierung beiträgt (Chiarugi und Giannoni 2008).

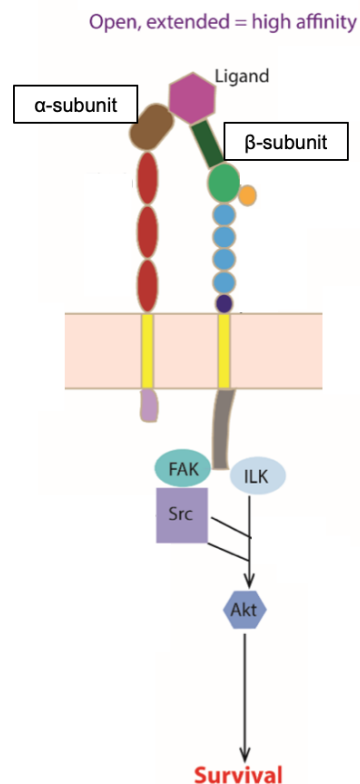


Abbildung 8: Vereinfachte schematische Darstellung der durch Integrinaktivierung vermittelten Initiierung intrazellulärer überlebensfördernder Signalkaskaden

Die Bindung eines Liganden / der EZM an das hochaffine, aufgerichtete Integrin führt im Rahmen der „outside-in“-Signaltransduktion zur Aktivierung der Schlüsselenzyme *FAK* und *ILK*. Hierdurch kommt es zur Aktivierung der *Src*- und schließlich der *PKB/Akt*-Kinase, die ein essentielles Element der überlebensfördernden zellulären Signaltransduktion darstellt (Ilic et al. 1998, Hanks et al. 2003, Chiarugi und Giannoni 2008, Cheah und Andrews 2018). Abb. modifiziert nach (Cheah und Andrews 2018).

3. Apoptose

Die Balance zwischen Zellproliferation, Zelldifferenzierung und „programmiertem“ Zelltod, auch Apoptose genannt (Raff 1992, Lee et al. 1993), stellt die Grundlage für eine physiologische Homöostase normaler epithelialer Zellen und Gewebe in multizellulären Organismen dar (Frisch und Screaton 2001). Bei diesen Prozessen spielen Integrine ebenfalls eine wesentliche Rolle.

Apoptotische Vorgänge in der Zelle können durch verschiedene Signalwege und Prozesse ausgelöst und propagiert werden. Diese führen im Verlauf zu vielzähligen morphologischen Veränderungen der apoptotischen Zelle (Hacker 2000). Im Frühstadium zeigen sich eine Zellschrumpfung und Zellkerndegeneration (auch Pyknose genannt), die durch Kondensation des Chromatins charakterisiert ist (Kerr et al. 1972). Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einer Bläschenbildung der Plasmazellmembran („blebbing“) sowie zur Karyorrhesis und zur Aufteilung der Zellfragmente auf sogenannte Apoptosekörper, ein Prozess, der „budding“ genannt wird (Elmore 2007).

Dieser programmierte Zelltod kann durch zwei intrazelluläre Signalwege, den intrinsischen (mitochondrialen) und den extrinsischen Signalweg ausgelöst werden (Grossmann 2002, Gilmore 2005).

Der intrinsische Signalweg wird maßgeblich durch Störungen und Veränderungen der zellulären Mikroumgebung verursacht. Dies kann unter anderem durch Wachstumsfaktor-Entzug, Schädigung der DNA, mitochondrialen Stress, reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS), Veränderungen der Mikrotubuli und viele weitere Faktoren ausgelöst werden (Nunez et al. 1990, Brumatti et al. 2010, Czabotar et al. 2014, Roos et al. 2016, Pihan et al. 2017, Vitale et al. 2017, Galluzzi et al. 2018). Der wichtigste und irreversible Schritt des intrinsischen Apoptosewegs ist die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP) (Tait und Green 2010, Galluzzi et al. 2016). Diese wird durch die pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie reguliert, eine Gruppe von Proteinen, die aus einer bis vier homologen Bcl-2-Domänen (BH) besteht (d.h. BH1, BH2, BH3 und BH4) (Shamas-Din et al. 2013, Czabotar

et al. 2014, Galluzzi et al. 2018).

Durch zelluläre Stresssignale werden pro-apoptotische BH3-Proteine (wie Puma, Bid, Bim und Noxa, jeweils bestehend aus einer einzigen BH3-Domäne) sowohl transkriptional als auch posttranslational aktiviert (Bouillet et al. 1999, Bouillet et al. 2002, Villunger et al. 2003, Galluzzi et al. 2014). Diese wiederum bewirken Konformationsänderungen und letztendlich die Aktivierung der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine Bax und Bak auf der äußeren Mitochondrienmembran (Wei et al. 2001, Kim et al. 2006, Gavathiotis et al. 2008, Kim et al. 2009, Gavathiotis et al. 2010, Dai et al. 2011, Chen et al. 2015), wo sie durch Oligomerisierung Kanäle bilden. Dies führt zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und zur Freisetzung von Cytochrom c (Shimizu et al. 1999, Galluzzi et al. 2018). Daraufhin kommt es zur Bildung des „Apoptosoms“ aus Caspase-9, dem „apoptosis protease activating factor“ (Apaf) sowie Cytochrom c, einem Komplex, der wiederum die Aktivierung von Caspase-9 ermöglicht (Li et al. 1997). Aktivierte Caspase-9 katalysiert daraufhin die proteolytische Aktivierung der Caspasen-3 und -7, die letztendlich verantwortlich für die Destruktion der Zelle sind und deshalb auch als Effektor-Caspasen bezeichnet werden (Cohen 1997, Zou et al. 1997, Thornberry 1998, Shalini et al. 2015, Julien und Wells 2017, Galluzzi et al. 2018) (Abb. 9).

Der extrinsische Signalweg wird im Gegensatz zum intrinsischen Signalweg durch die extrazelluläre Bindung eines Liganden an die sogenannten „Todesrezeptoren“ wie Fas, „tumor necrosis factor receptor“ (TNFR1) und „TNF-related apoptosis inducing ligand receptor-1 and -2“ (TRAIL) induziert. Dies führt zur Bildung des „death-inducing signaling-complex“ (DISC) und zur Rekrutierung und Aktivierung von Caspase-8, welche ihrerseits die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 aktiviert (Wajant 2002, Taylor et al. 2008, Paoli et al. 2013). Zusätzlich zu dem bereits beschriebenen Mechanismus kann die Aktivierung von Caspase-8 jedoch auch zur Aktivierung von Bid führen. Dies hat ebenso die Freisetzung von Cytochrom c und die Bildung des „Apoptosoms“ zur Folge, womit eine Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischem Signalweg besteht (Valentijn und Gilmore 2004) (Abb. 9).

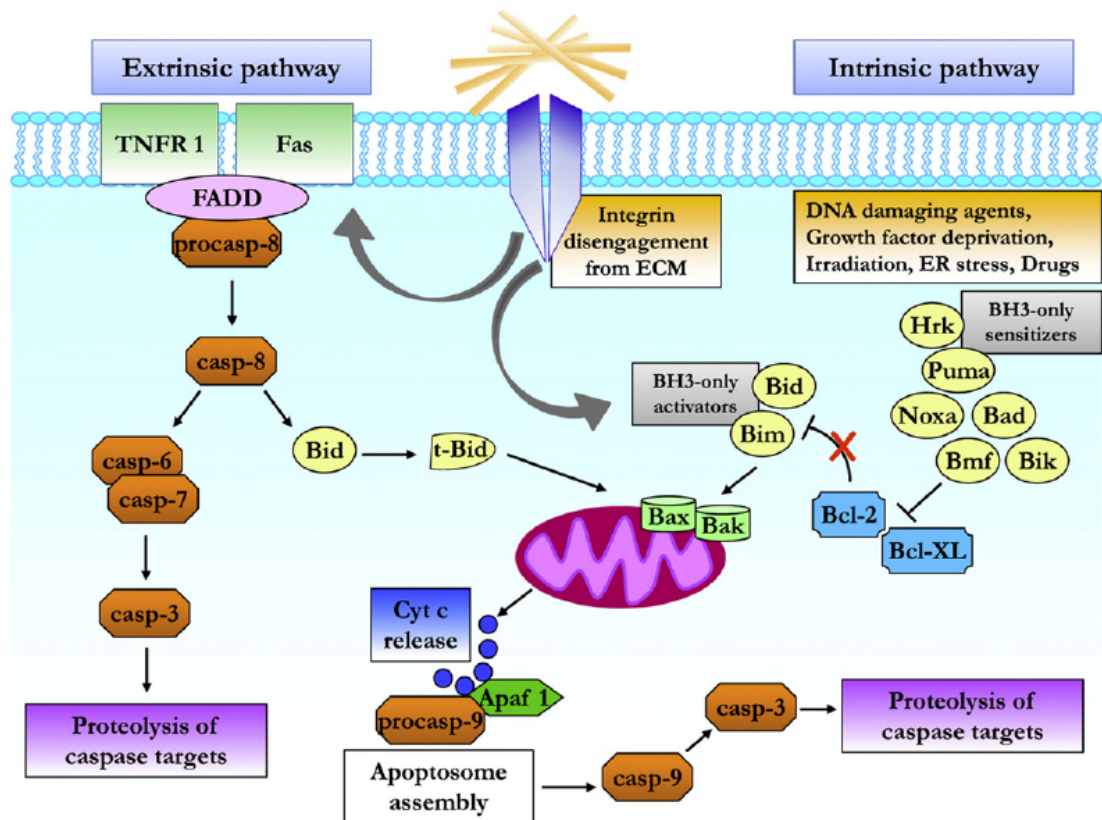


Abbildung 9: Extrinsischer und intrinsischer Apoptose-Signalweg

Der Verlust des Zellkontakts zur EZM oder die Adhäsion an eine ungeeignete EZM führt bei verankerungsabhängigen Zellen wie Epithelzellen zur Aktivierung des Apoptosemechanismus, einerseits über Todesrezeptoren (Fas, extrinsischer Signalweg) und andererseits über den mitochondrialen (intrinsischen) Signalweg. Der extrinsische Weg hat über die Aktivierung von Caspase-8 durch die sogenannten „Todesrezeptoren“ TNFR 1 und Fas die Aktivierung der Effektor-Caspasen (z. Bsp. Caspase-3) zur Folge. Der intrinsische Weg führt über die Aktivierung der pro-apoptischen Proteine Bax und Bak durch die BH3-Proteine Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, Noxa, Puma und Hrk (und durch die Hemmung der anti-apoptischen Proteine Bcl-2 und Bcl-XL) zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma, was wiederum die Formation des „Apoptosoms“ aus Cytochrom c, Apaf 1 und Procaspase-9 und die Aktivierung der Effektor-Caspasen (insbesondere Caspase-3) induziert. Dies führt zur Proteolyse der Caspase-Zielstrukturen und zur Destruktion der Zelle (Paoli et al. 2013). Abb. aus (Paoli et al. 2013).

3.1. Anoikis

Anoikis stellt eine besondere Form der Apoptose dar (Chiarugi und Giannoni 2008) und wird aus dem Griechischen für „Heimatlosigkeit“ hergeleitet. Dieser apoptotische Mechanismus tritt als physiologisch wichtiger Regulator der Gewebshomöostase immer dann in Kraft, wenn *per se* verankerungsabhängige epitheliale Zellen den Kontakt zur EZM verlieren. Hierdurch können die Adhäsion dieser abgelösten Zellen an neue

Matrizes und ein dysplastisches Wachstum verhindert werden. (Frisch und Francis 1994, Chiarugi und Giannoni 2008, Taddei et al. 2012).

Die Adhäsion epithelialer Zellen an die EZM wird größtenteils durch die Superfamilie der Integrine vermittelt. Folglich führt der Verlust dieser Interaktion mit der EZM durch unligierte Integrine über den sogenannten „Integrin-mediated death“ (IMD) zu Anoikis (Desgrosellier und Cheresh 2010, Dolinschek et al. 2021). Hierbei kommt es wie bei der Apoptose zur Aktivierung entweder des intrinsischen oder extrinsischen Signalweges und letztendlich zur Caspasenaktivierung und DNA-Fragmentation (Grossmann 2002, Gilmore 2005).

Tumorzellen sind im Gegensatz zu normalen epithelialen Zellen meist resistent gegen Anoikis. Dieser Eigenschaft kommt insbesondere in der Metastasierung eine große Bedeutung zu, da sich hierbei Zellen aus dem Verband des Primärtumors lösen und ohne adäquaten Kontakt zur EZM nach Verbreitung über Blut, Lymphe und – wie im Falle des Ovarialkarzinoms – auch über die Peritonealflüssigkeit an einen entfernten Metastasenort gelangen, um dort erneut zu adhären und Tumorabsiedelungen auszubilden.

Diese Anoikis-Resistenz kann durch eine Vielzahl zellulärer und extrazellulärer Veränderungen erreicht werden.

Einen möglichen Ansatz stellt die Veränderung der Integrin-Expressionsmuster auf der Zelloberfläche von Tumorzellen dar. Dieser Vorgang kann durch intrazelluläre Signalkaskadenaktivierung das Tumorzellüberleben in verschiedenen Mikroumgebungen beeinflussen (Taddei et al. 2012). Eine solche Veränderung des Integrin-Expressionsmusters konnte beispielsweise im Rahmen der Progression des malignen Melanoms gezeigt werden. Melanomzellen exprimieren hierbei Integrin $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 1$ (van der Flier und Sonnenberg 2001), wohingegen in Melanozyten oder Melanomzellen in frühen Tumorstadien kein $\beta 3$ -Integrin nachgewiesen werden konnte, da dieser Nachweis mit dem malignen Potenzial der Tumorzellen korreliert (Albelda et al. 1990, Natali et al. 1993, Melchiori et al. 1995).

Auch die Veränderung der Zusammensetzung der EZM kann das

Überleben von Tumorzellen positiv beeinflussen. Burnier et al. konnten zeigen, dass murine Lungenkarzinomzellen Typ IV Kollagen überexprimieren und somit den Integrin $\alpha 2$ – *FAK* – *PI3K*-Signalweg aktivieren, was zu einem Schutz vor Anoikis und einem höheren Potenzial für eine Lebermetastasierung führt (Burnier et al. 2011).

Eine weitere Strategie der Anoikisresistenz in Tumorzellen stellt die konstitutive Aktivierung überlebensfördernder, Integrin-abhängiger Signalkaskaden, wie beispielsweise der *FAK* (Sulzmaier et al. 2014), der *Src*-Kinasen (Parsons und Parsons 2004, Roskoski 2015) und der *PKB/Akt* und *ERK*-Signalwege (Fresno Vara et al. 2004) dar (Taddei et al. 2012). Desgrosellier et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass Integrin $\alpha\beta 3$ verankerungsunabhängiges Wachstum von Tumorzellen fördern und somit zur Tumorprogression sowie zur Metastasierung beitragen kann. Dies erfolgte überraschenderweise durch direkte Rekrutierung und Aktivierung von *c-Src* durch Integrin $\alpha\beta 3$ und war somit unabhängig von der Tumorzelladhäsion an die EZM und folglich auch von der Aktivierung der Proteinkinase *FAK* (Desgrosellier et al. 2009). Bereits in früheren Studien über das auf Thrombozyten vorkommende Integrin $\alpha 11\beta 3$ war eine Rekrutierung und Aktivierung von *c-Src* durch die C-terminale Dömane der zytoplasmatischen $\beta 3$ -Untereinheit nachgewiesen worden (Arias-Salgado et al. 2003). Dies konnten Desgrosellier et al. nun auch für Integrin $\alpha\beta 3$ zeigen, was die Vermutung nahelegt, dass unligiertes Integrin $\alpha\beta 3$ und *c-Src* als „onkogene Einheit“ maßgeblich das maligne Potenzial von Tumoren beeinflussen können (Desgrosellier et al. 2009).

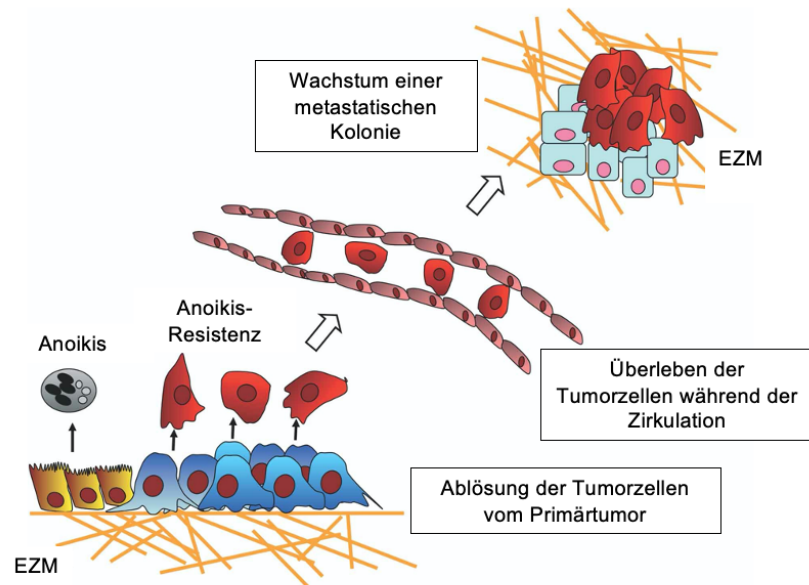


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Metastasierung durch Anoiis-resistente Tumorzellen

Die Ablösung epithelialer Zellen von der EZM führt physiologischerweise zu Anoikis. Im Gegensatz hierzu können Tumorzellen durch verschiedenste Mechanismen Resistenz gegen Anoikis erlangen und nach Ablösung vom Primärtumor zirkulierend im Blut oder in Lymphe überleben, um an anderer Stelle durch erneute Adhäsion an die EZM eine metastatische Kolonie zu bilden. Abb. modifiziert nach (Taddei et al. 2012).

Integrine und die von ihnen aktivierten zellulären Signaltransduktionswege sind somit Schlüsselfiguren der Anoikisresistenz metastasierender Tumorzellen, weshalb das tiefere Verständnis dieser Rezeptoren und intrazellulären Proteine einen wichtigen klinischen Beitrag zur Identifizierung neuer therapeutischer Angriffspunkte leisten kann.

Im Hinblick auf das EOC konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Expression von Integrin $\alpha\beta 3$ maßgeblich die Tumorprogression beeinflusst und mit einem schlechten Outcome der Patientinnen korreliert (Liapis et al. 1997, Felding-Habermann 2003, Hapke et al. 2003, Kellouche et al. 2010, Nieberler et al. 2017).

In dieser Arbeit wurde deshalb das Ausmaß der Anoikisresistenz in Suspension gehaltener EOC-Zellen als Folge der verschiedenen Konformations-/Aktivierungszustände des Integrin $\alpha\beta 3$ und der daraus resultierenden zellulären Signaltransduktion untersucht.

4. Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung des Apoptoseverhaltens von in Zellkulturmedium oder Aszites suspendiert kultivierter Ovarialkarzinomzellen als Funktion der Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung und daraus resultierender Signaltransduktion.

Um die Auswirkungen der Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung auf die Zellfunktionen darstellen zu können, wurde die humane Ovarialkarzinom-Zelllinie OV-MZ-6 verwendet, welche bereits in einer vorhergehend publizierten Arbeit durch unsere Arbeitsgruppe mit zwei unterschiedlichen Integrin $\alpha\beta 3$ -Chimären transfiziert worden war.

Hierfür wurde die ursprüngliche Integrin $\alpha\beta 3$ -TMD durch die TMD-Sequenz von GpA ersetzt, welche das stark dimerisierende GxxxG-Motiv enthält (Lemmon et al. 1992). Die so entstandene Integrin $\alpha\beta 3$ -Chimäre (TMD-GpA) entspricht einem intermediären Aktivierungszustand des Integrin $\alpha\beta 3$ und ist nicht in der Lage, die Zellmigration oder die Signaltransduktion ins Zellinnere zu beeinflussen (Muller et al. 2013).

Als Gegenstück wurde das Dimerisierungsmotiv GxxxG durch eine Punktmutation zu GxxxI verändert, was bekanntermaßen zu einer Aufhebung der Dimerisierung und somit zu einer Dissoziation der TMD führt (Lemmon et al. 1992). Das hieraus entstandene Integrin $\alpha\beta 3$ (TMD-GpA-I) stellt demzufolge einen konstitutiv aktiven Zustand des Integrins mit verstärkter bidirektionaler Signaltransduktion dar (Muller et al. 2013).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden mit OV-MZ-6-Zellen, die diese unterschiedlichen Integrin $\alpha\beta 3$ -Chimären exprimierten, folgende Fragestellungen untersucht:

- 1) In welchem Ausmaß beeinflusst der Aktivierungszustand von Integrin $\alpha\beta 3$ das Zellüberleben / das Apoptoseverhalten humaner Ovarialkarzinomzellen in Suspension?
- 2) Welche Signaltransduktionswege werden im Rahmen dieses Zellüberlebens aktiviert?
- 3) Welchen Einfluss hat Aszites auf das Zellüberleben humaner Ovarialkarzinomzellen in Suspension?

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien

1.1. Zelllinie und Integrin $\alpha\beta 3$ -Mutanten

Alle Versuche dieser Arbeit wurden mit der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 durchgeführt. Diese Zelllinie wurde ursprünglich aus dem malignen Aszites einer Patientin mit serös-papillärem Zystadenokarzinom (FIGO IV) isoliert (Mobus et al. 1992).

Um die Integrin $\alpha\beta 3$ -vermittelten zellbiologischen Prozesse als Funktion seines Aktivierungsstatus untersuchen zu können, wurden in Vorarbeiten zu dieser Promotionsarbeit OV-MZ-6-Zellen mit folgenden für TMD-Varianten des Integrin $\alpha\beta 3$ kodierenden Expressionsplasmiden stabil transfiziert:

- 1) **TMD-GpA:** Diese Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Chimäre enthält die TMD-Sequenz von GpA und somit das stark dimerisierende GxxxG-Motiv. Ovarialkarzinomzellen, die mit dieser Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Chimäre transfiziert wurden, exprimierten ein niedrig-affines Integrin $\alpha\beta 3$, das nur eine schwache Zelladhäsion vermittelte sowie keine Signaltransduktion und keine Bindung von Talin an die zytoplasmatische Untereinheit ermöglichte (Muller et al. 2013).
- 2) **TMD-GpA-I:** Zum Vergleich wurde eine zweite Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Chimäre generiert, welche das durch Punktmutation veränderte Dimerisierungsmotiv GxxxI enthielt. Bekannterweise führt diese Punktmutation zu einer Aufhebung der TMD-Dimerisierung. Auf diese Weise transfizierte Ovarialkarzinomzellen exprimierten ein vollständig aktiviertes, hochaffines Integrin $\alpha\beta 3$, welches eine starke Verbindung zu Proteinen des Zytoskeletts und eine konstitutive Signaltransduktion aufwies.

(Lemmon et al. 1992, Gottschalk et al. 2002, Xiao et al. 2004, Hoefling

et al. 2009, Lau et al. 2009, Muller et al. 2013)

Diese zuvor in der Arbeitsgruppe Reuning etablierten Zelltransfektanten wurden freundlicherweise für die Untersuchungen dieser Promotionsarbeit zur Verfügung gestellt.

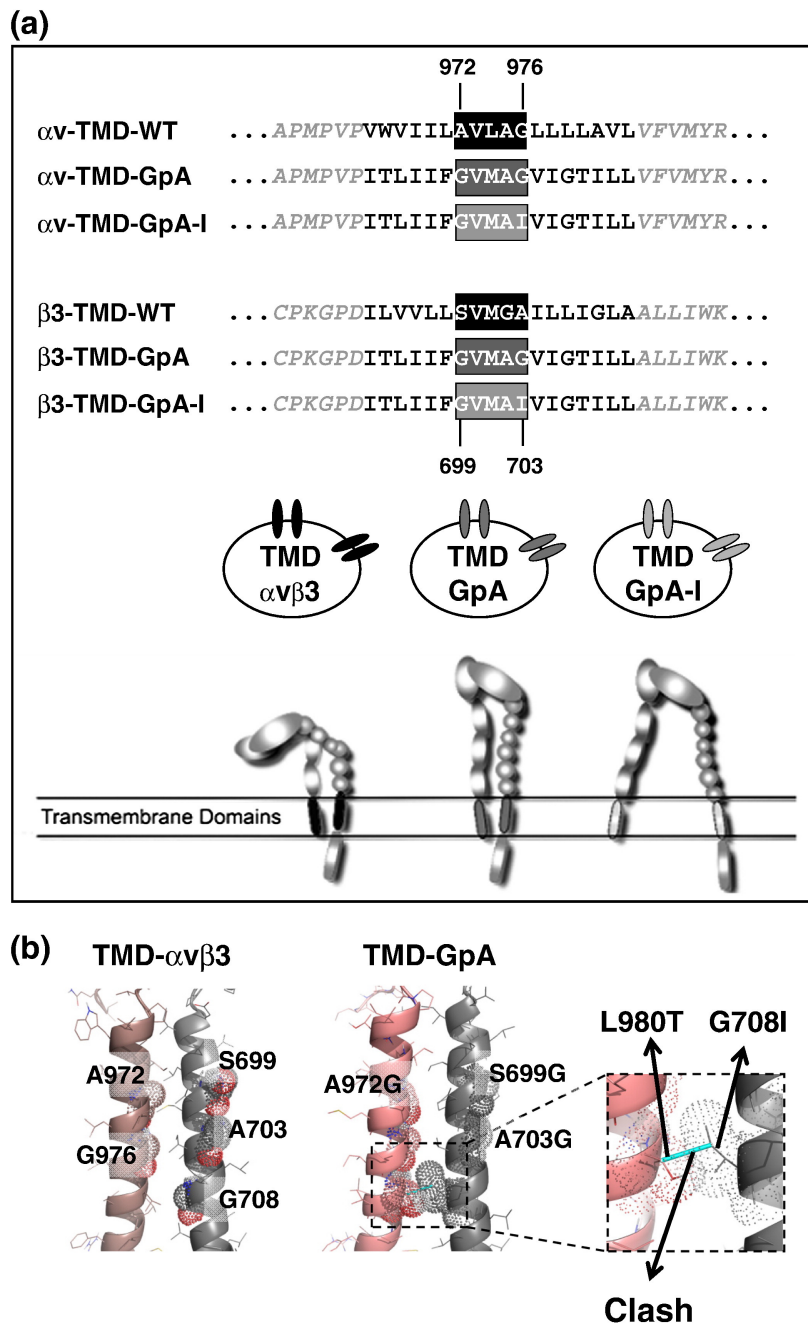


Abbildung 11: Übersicht über die TMD-Dimerisierungsmotive der Integrin $\alpha\beta3$ /GpA-Chimären

(a) Die in dieser Arbeit verwendeten Integrin $\alpha\beta3$ /GpA-Chimären wurden durch Ersatz der jeweils kompletten TMD sowohl der α -, als auch der β -Untereinheit des WT-Integrins generiert. Entweder durch die stark dimerisierende TMD des GpA (α -TMD-GpA/ $\beta3$ -TMD-GpA) oder durch die nicht-dimerisierende TMD GpA-I, welche durch Punktmutation des GxxxG Motivs zu GxxxI geschaffen wurde (α -TMD-GpA-I: G⁹⁷⁶I/ $\beta3$ -TMD-GpA-I: G⁷⁰³I). Abgebildet sind die jeweiligen

Aminosäuren. Hierfür wurden die Zellen mit α v-TMD-WT plus β 3-TMD-WT, mit α v-TMD-GpA plus β 3-TMD-GpA, oder mit α v-TMD-GpA-I plus β 3-TMD-GpA-I transfiziert.

(b) Gegenüberstellung der TMD-Struktur von WT TMD- α v β 3 und TMD-GpA. Links ist die Wildtyp-Sequenz abgebildet. Hierbei wurden die Aminosäuren A⁹⁷² und G⁹⁷⁶ der α -Untereinheit sowie G⁷⁰⁸ der β -Untereinheit hervorgehoben, welche den Verschluss der äußeren Zellmembran darstellen. Ebenfalls abgebildet ist das GxxxG-ähnliche S⁶⁹⁹xxxA⁷⁰³-Motiv der β -Untereinheit. Rechts ist die GpA TMD-Sequenz dargestellt. Der Austausch von G⁷⁰⁸I in der β -Untereinheit führt zu einer Dimerisierung der TMD (in der Abb. bezeichnet als „clash“) (Muller et al. 2013). Abb. aus (Muller et al. 2013).

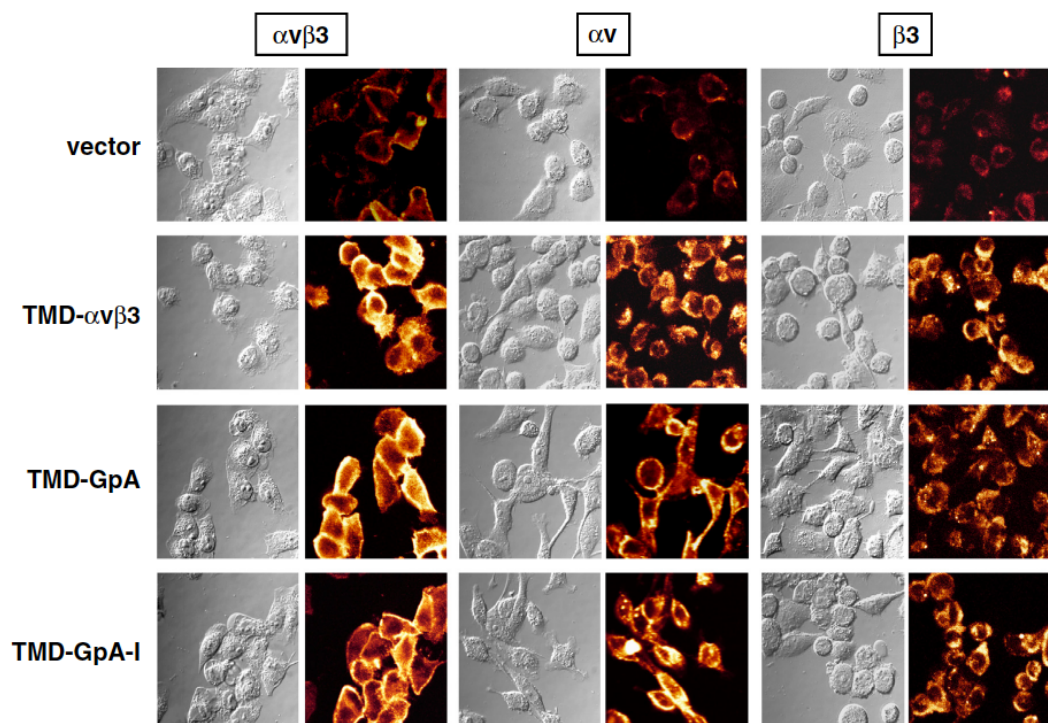


Abbildung 12: Darstellung der Integrin α v β 3-Expression in transfizierten OV-MZ-6 Zellen mittels konfokaler Lasermikroskopie

Es erfolgte die Anfärbung transfizierter OV-MZ-6 Zellen mit monoklonalen Ak gegen α v β 3, α v und β 3. Die Abbildung zeigt repräsentative Fluoreszenzbilder mit den dazugehörigen Differentialinterferenzkontrast-Bildern von Zelltransfektanten, die entweder TMD-GpA-I, TMD-GpA oder TMD- α v β 3 exprimieren. Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, dienten als Kontrollen („vector“). Hierbei zeigte sich eine deutlich verstärkte Integrin α v β 3-Expression der transfizierten Zellen im Vergleich zum Vektor. Die unterschiedlichen Integrin α v β 3 Zelltransfektanten zeigten untereinander jedoch vergleichbar hohe Integrin α v β 3-Expressionsspiegel (Muller et al. 2013). Abb. aus (Muller et al. 2013).

1.2. Reagenzien für die Zellkultur

Substanz	Hersteller
Albumin aus Rinderserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybri-Max™ D2650	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM (1X) + GlutaMAX™-I)	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA
EDTA 1% in PBS (w/v) (Ethylendiamintetraacetat)	Biochrom GmbH, Berlin, D
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA
Geneticin® G-418 Sulphat Gentamycin	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA
HEPES Pufferlösung (1M) (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- Piperazinyl)-Ethansulfonsäure)	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA
L-Arginin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Asparagin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau-Lösung 0,4% (w/v)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Universal-Agarose peqGOLD	peqLab, Erlangen, D

Tabelle 1: Reagenzien für die Zellkultur

1.2.1. Media und Lösungen für die Zellkultur

Komplettmedium für OV-MZ-6 Zellen:

DMEM	500 ml
HEPES	10 mM
Arginin	550 mM
Asparagin	272 mM
FCS	10% (v/v)

Zur Herstellung eines Selektionsmediums für stabil transfizierte OV-MZ-6 Zellen erfolgte die Zugabe von Geneticin® G418 (finale Konzentration 1g/l) zu o.g. Kompletmedium.

Medium zur Kryokonservierung der Zellen:

FCS	90% (v/v)
DMSO	10% (v/v)

Splitting-Lösung:

0,05% (v/v) EDTA in PBS

1.3. Antikörper

1.3.1. Antikörper für die Westernblot-Analyse

Erstantikörper

Name	Antigen	Wirt	Klonalität	Verdünnung / Stockkonzentration	Hersteller
PI3K/Akt Antikörper	Akt1, Akt2, Akt3	Hase	polyklonal	1:2000 34 µg/ml	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Human FAK Antikörper	Phospho-FAK (pY397)	Maus	monoklonal	1:1000 250 µg/m	BD Biosciences, San Jose, USA
Cleaved Caspase-3 Antikörper	Cleaved Caspase-3 (Asp175)	Hase	polyklonal	1:500 80 µg/ml	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
FAK Antikörper	FAK	Maus	monoklonal	1:1000 250 µg/ml	BD Biosciences, San Jose, USA
MAB 374, Klon 6C5 Antikörper	GAPDH	Maus	monoklonal	1:10000 1 mg/ml	EMD Millipore, Billerica, USA

Phospho-Akt (D9E) Antikörper	Phospho-PKB / Akt (Ser473)	Hase	monoklonal	1:2000 90 µg/ml	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phospho-Src Family Antikörper	Phospho-Src (Tyr 416)	Hase	polyklonal	1:1000 69 µg/ml	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Src Antikörper	Src	Hase	monoklonal	1:1000 139 µg/ml	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Tabelle 2: Erstantikörper für die Westernblot-Analyse

Zweitantikörper

Bezeichnung	Verdünnung/ Stockkonzentration	Hersteller
Ziege anti-Maus IgG (H+L), HRP-konjugiert	1:5000 / 1:10000 0,8 mg/ml	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Ziege anti-Hase IgG (H+L), HRP-konjugiert	1:10000 1mg/ml	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

Tabelle 3: Zweitantikörper für die Westernblot-Analyse

1.3.2. Antikörper für die Immunzytochemie

Erstantikörper

Name	Antigen	Wirt	Klonalität	Verdünnung / Stockkonzentration	Hersteller
Cleaved Caspase-3 Antikörper	Cleaved Caspase-3 (Asp175)	Hase	polyklonal	1:100 80 µg/ml	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Tabelle 4: Erstantikörper für die Immunzytochemie

Zweitantikörper

Bezeichnung	Verdünnung/ Stockkonzentration	Hersteller
Ziege anti-Hase IgG H+L, Alexa Fluor® 488 konjugiert	1:1000 2 mg/ml	Life Technologies, Carlsbad, USA

Tabelle 5: Zweitantikörper für die Immunzytochemie

1.4. Chemikalien

Substanz	Hersteller
Albumin (Rind), Fraktion V $\geq 98\%$	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
cOmplete, EDTA-free Proteasen-Inhibitor Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Emsure® Ethanol 100%	Merck KGaA, Darmstadt, D
Glycerin Rotipuran® $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Milchpulver Blotting-Grad	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS-Pellets)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natrium Orthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumpyrophosphat Decahydrat, ACS Reagens ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Westernblot Marker)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Roti®-Load 1, reduzierend, 4x konz.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Saponin S-1252	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Triton™ X-100 (Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau-Lösung 0,4 % (w/v)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tween® 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
---	-------------------------------

Tabelle 6: Chemikalien**1.5. Lösungen und Puffer**

Bezeichnung	Verwendung	Zusammensetzung
0,5 M Tris-Puffer	Sammelgel Westernblot	0,5 M Tris mit HCl auf pH 6,8 einstellen
1,5 M Tris-Puffer	Trenngel Westernblot	1,5 M Tris mit HCl auf pH 8,8 einstellen
Blocking-Lösung	Westernblot	5% (w/v) Milchpulver in 1x TBST (s.u.) oder 5% (w/v) BSA in 1x TBST
	Immunzytochemie	2% (w/v) BSA in PBS
Elektrophorese-Puffer (10x)	SDS- Gelelektrophorese	1,6 M Glycin 250 mM Tris 1% (w/v) SDS
Lysepuffer	Für Zellysate	50 mM HEPES, pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 10% (v/v) Glycerin 1% (v/v) Triton X-100 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 1 mM Na ₃ VO ₄
Paraformaldehyd (PFA)-Lösung	Zellfixierung	Lösung A: 0,1 M Na ₂ HPO ₄ Lösung B: 0,1 M NaH ₂ PO ₄ Lösung AB auf pH 7,4 einstellen Lösung AB auf 80° C erhitzen und 4% (w/v) PFA darin lösen

Stripping-Lösung	Westernblot	200 mM Glycin 280 mM NaCl pH 2,5
TBS (10x), pH 7,6	physiologischer Puffer	1,5 M NaCl 0,5 M Tris
TBS-T (1x)	Westernblot Waschlösung	1x TBS 0,1% (v/v) Tween® 20
Wet-Blot-Puffer (1x)	Westernblot Proteintransfer	192 mM Glycin 25 mM Tris 20% (v/v) Methanol

Tabelle 7: Lösungen und Puffer

1.6. Gebrauchsfertige Lösungen

Name	Hersteller
Amersham ECL Prime (Reagens zum Nachweis von Westernblot Proteinbanden)	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Annexin-V-Fluorescein	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
High Pure PCR Template Preparation Kit (Zubehör zur Erstellung einer PCR Matrize)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Pierce BCA Protein Assay Kit (Zubehör zur Proteinbestimmung)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Pierce ECL (Reagens zum Nachweis von Westernblot Proteinbanden)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

Tabelle 8: Verwendete gebrauchsfertige Lösungen

1.7. Sonstige Labormaterialien

Alle Pipettenspitzen, 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße und 0,2 ml PCR-Gefäße wurden von Sarstedt (Nümbrecht, D) bezogen.

Material	Hersteller
Cellstar® Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Cellstar® Röhrchen, konisch (15, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

Cellstar® Zellkultur Flaschen (25, 75, 175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
FACS-Röhrchen, konisch	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Falcon® 6 Well-Platten	Corning Incorporated, Corning, USA
Injekt® 20 ml Spritze	B. Braun, Melsungen, D
Microlon® 96-Well Polystyrol Microplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Minisart® 0,10 µm (Spritzenvorsatzfilter)	Sartorius, Göttingen, D
Nalgene™ Cryoware Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Pasteurpipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, D
Roti®- Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran, Porengröße 0,45 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Sterican® 20 G Nadel	B. Braun, Melsungen, D

Tabelle 9: Labormaterialien**1.8. Laborgeräte**

Gerät	Hersteller
Axio Observer. Z1 + LSM700 (konfokales Lasermikroskop)	Carl Zeiss, Jena, D
Axiovert 25 (Mikroskop)	Carl Zeiss, Jena, D
Cawomat 2000 IR (Westernblot Entwickler)	CAWO Photochemisches Werk GmbH, Schrobenhausen, D
Centrifuge 5424R (Zentrifuge)	Eppendorf, Hamburg, D
FACS Calibur (Durchflusszytofluorometer)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Gelschlitten und Käme für die Gelelektrophorese	BioRad, Hercules, USA

Haake D8 (Wasserbad)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Heracell™ (Zell-Inkubator)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Heraeus™ Labofuge™ 400R (Zentrifuge)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Herasafe™ (Sterilbank)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Labcycler (Thermozykler, Polymerasekettenreaktion (PCR)-Block)	SensoQuest GmbH, Göttingen, D
Laborwaage BP1200	Sartorius, Göttingen, D
Laborwaage Sartorius basic BA 110S	Sartorius, Göttingen, D
Mini Protean II (Elektrophorese, Wet Blot)	BioRad, Hercules, USA
Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (Westernblot Entwickler)	BioRad, Hercules, USA
Multiskan FC (Mikrotiterplatten-Photometer)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Neubauer Zählkammer für Zellen	Assistent, Sondheim, D
pH Meter Lab 850	Schott Instruments, Mainz, D
Polymax 2040 (Schüttler)	Heidolph Instruments GmbH&Co.KG, Schwabach, D
Power Pac 300 (Stromquelle für Elektrophorese)	BioRad, Hercules, USA
Varioklav 400E 1991 (Autoklav)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

Tabelle 10: Laborgeräte

2. Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zelllinie OV-MZ-6 erfolgte in Brutschränken bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5% (v/v). Die Zellen wurden nach Standardprotokollen drei Mal wöchentlich passagiert. Hierbei erfolgte das Ablösen der adhärenen Zellen von den Kulturgefäßen durch Inkubation der Zellen mit 0,05% (v/v) EDTA in PBS für 3 - 5 min. bei 37 °C. Danach wurden die Zellen mit 5 ml PBS von den Kulturgefäßen gewaschen und in ein Cellstar® Röhrchen von passendem Fassungsvermögen überführt. Die Zentrifugation erfolgte bei 246 x g für 3 min. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die benötigte Zellmenge in Medium resuspendiert und in ein neues Kulturgefäß überführt.

Zur Kryokonservierung der Zellen erfolgte das Ablösen der adhärenen Zellen wie oben beschrieben. Nach dem Absaugen des Zellüberstands wurden die Zellen in einem adäquaten Volumen an Einfriermedium resuspendiert, rasch in Kryokonservierungsgefäße überführt und auf Eis gelagert. Die temporäre Lagerung des gefrorenen Zellbestands erfolgte bei -80 °C, die langfristige Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

Zur erneuten Kultivierung der eingefrorenen Bestände wurden die Zellen langsam aufgetaut und mit 5 ml eiskaltem Kompletmedium gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte wiederum bei 246 x g für 3 min. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in Kompletmedium resuspendiert und in 25 cm² Zellkulturgefäße überführt. Die Zellen wurden dann mindestens noch einmal passagiert, bevor sie für Experimente verwendet wurden. Die Zellkonfluenz der Zellen, die für Experimente verwendet wurden, betrug stets 60 - 80%.

2.1.2. Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen nach dem Ablösen, Waschen und Absaugen (s.o.) in einem geeigneten Volumen Medium resuspendiert. 10 µl dieser Suspension wurden 1:10 mit Trypanblau-Lösung gemischt und in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Es wurden jeweils 4

Quadrate ausgezählt und deren Mittelwert bestimmt. Die Zellzahl pro Milliliter ergibt sich durch Multiplikation mit 10^5 . Um eine exaktere Bestimmung der tatsächlichen Zellzahl zu erreichen, wurde dieser Zählvorgang jeweils mindestens dreimal durchgeführt.

2.1.3. Erstellen einer Zellsuspension in Kultur

Um die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit untersuchen zu können, war es notwendig, OV-MZ-6 Zellen in Suspension zu halten und Adhäsion zu verhindern. Dazu wurden Zellen bei einer Konfluenz von 60 - 80% aus dem ursprünglichen Kulturgefäß abgelöst, zentrifugiert und resuspendiert (s.o.). Nach erfolgter Zellzählung wurden die Zellen in einer adäquaten Menge Medium resuspendiert. Die Zellkonzentration in den Kulturgefäßen betrug je nach Experiment 500.000 Zellen/ml Medium, beziehungsweise 250.000 Zellen/ml Medium. Um den Kontakt der Suspensionszellen mit der Wachstumsfläche der Zellkulturflasche zu minimieren, wurde diese nicht wie üblich liegend, sondern aufrecht in den Inkubator gestellt. Auf diese Weise wurden die Zellen für 48 h bei 37 °C inkubiert. Die Ernte der Zellsuspension aus der Zellkulturflasche erfolgte durch behutsames Abnehmen mit einer Pipette, um etwaige adhärenzte Zellen nicht mit abzulösen.

2.1.4. Nachweis einer Mykoplasmeninfektion in der Zellkultur mittels PCR-Analyse

Die verwendeten Zellen wurden routinemäßig mittels PCR auf eine mögliche Mykoplasmenkontamination getestet. Zur Extraktion der vollständigen zellulären DNA wurde das High Pure PCR Template Preparation Kit von Roche Diagnostics nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die PCR-Analyse erfolgte in 50 µl Reaktionsvolumen in wässriger Lösung. Die zu untersuchenden Proben enthielten außerdem eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Die PCR-Produkte wurden mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, wobei die amplifizierte Mykoplasmen-DNA bei 500 bp zu erwarten war.

Vorwärts- und Rückwärtsprimer-Sequenz:**5'**

5'- CGC CTG AGT AGT ACG TTC GC -3'

3'

5'- GCG GTG TGT ACA AGA CCC GA -3'

Protokoll:

5 µl 10x PCR-Puffer

0,15 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)

1,2 µM 3'-Primer

1,2 µM 5'-Primer

1 µg DNA-Template

1 Einheit Taq Polymerase

PCR-Zyklen

94 °C	5'	1x
94 °C	30''	
60 °C	1'	30x
72 °C	30''	
72 °C	5'	1x

2.2. Proteinnachweis mittels Westernblot-Analyse

Zur Immunodetektion von Proteinen wurden ca. 6 Mio. Zellen in Lysepuffer lysiert. Dazu wurden zunächst Zellen bei Erreichen einer 60 - 80%igen Konfluenz der Zellmonolayer auf stehende Zellkulturflaschen ausgesät und nach 48 h Zellkultivierung vorsichtig mit einer Pipette geerntet. Als Kontrolle zu suspendiert kultivierten Zellen dienten die entsprechenden Zelltransfektanten, die bis zu einer Konfluenz ihrer Zellrasen von 60 - 80% in Adhärenz kultiviert wurden. Adhärente und suspendierte Zellen wurden

nun gleichermaßen in PBS gewaschen, der Zellüberstand abgesaugt und die Zellpellets anschließend in einem angemessenen Volumen Zellysepuffer (vgl. Kap. II.1.5.) unter Zugabe eines Proteaseninhibitor-Cocktails resuspendiert und 1 h auf dem Rad bei 4 °C lysiert. Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts der jeweiligen Probe erfolgte mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben.

Die benötigte Menge Proteinlysate wurde mit 4-fach konzentriertem, reduzierend wirkendem Roti®-Load 1 Puffer im Verhältnis 1:4 versetzt und 5 min. bei 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese bei zunächst 100 V, bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, und wurde dann mit 120 V fortgeführt. Der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran erfolgte durch Wet-Blotting unter Verwendung des Wet-Blot-Puffers bei 300 mA für 1 h.

Anschließend wurde zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen der Antikörper mit der PVDF-Membran diese für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler in Blocking-Lösung inkubiert. Nach Waschung der Membran in PBS wurde sie zum Nachweis eines spezifischen Antigens mit einem gegen dieses gerichteten Antikörper schüttelnd inkubiert. Die Detektion des Erstantikörpers erfolgte mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Zweitantikörper (die Inkubationszeiten unterschieden sich je nach verwendeten Antikörpern und werden in den entsprechenden Kapiteln genauer erörtert). Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mittels Inkubation der PVDF-Membran mit dem Peroxidase-Substrat Pierce ECL Westernblotting Substrate oder Amersham ECL Westernblotting Detection Reagent nach Herstellerangaben. Die Detektion der Chemilumineszenz der Proteinbanden erfolgte mit den Entwicklern Cawomat und BioRad Chemidoc™ +XRS, die densitometrische Quantifizierung mit Hilfe der Software „Scion Image“ sowie „Image Lab™“.

Um etwaige Schwankungen der Proteinkonzentration sowie Unterschiede in der Blotting-Effizienz auf die PVDF-Membran zu normalisieren, wurde auf jeder Membran parallel auch die Menge des „Housekeeping“-Proteins GAPDH nachgewiesen und dessen Konzentration zur Signalstärke des entsprechend nachzuweisenden Antigens ins Verhältnis gesetzt. Dazu

wurde die Membran ggf. vor einer weiteren Belegung mit einem gegen GAPDH-gerichteten Antikörper durch Zugabe einer „Stripping“-Lösung von der Antikörper-Belegung der vorhergehenden Untersuchung gereinigt und erneut mit „Blocking“-Lösung inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem gegen GAPDH gerichteten monoklonalen Maus-Erstantikörper (MAB 374, Klon 6C5 Antikörper) in der Verdünnung 1:10000 nach Herstellerangaben für 1 h bei Raumtemperatur (RT) und dem entsprechenden HRP-konjugierten Ziege anti-Maus Zweitantikörper für 1 h bei RT in TBS-T. Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden erfolgte wie bereits unter Kap. II.2.2. beschrieben.

2.2.1. Herstellung von Polyacrylamidgelen für SDS-PAGE

Die zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine verwendeten Polyacrylamidgele wurden nach folgendem Protokoll unter Verwendung von Gelschlitten und Kämmen der Firma BioRad selbst hergestellt. Zur Anwendung kamen je nach Größe des zu untersuchenden Proteins 15 bzw. 10%-ige Gele.

Sammelgel (4% (w/v) Polyacrylamid)

Inhaltsstoff	Volumenanteil
dH ₂ O	6,3 ml
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
10% (w/v) SDS	100 µl
Acrylamid / Bis 40%	1 ml
10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)	50 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	10 µl
	Gesamtvolumen: ≈ 10 ml

Trenngel (1,5 mm Dicke)

Inhaltsstoff	Gel 10%	Gel 15%
dH ₂ O	4,8 ml	3,5 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
10% (w/v) SDS	100 µl	100 µl
Acrylamid / Bis 40%	2,5 ml	3,8 ml
10% (w/v) APS	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl
	≈ 10 ml	≈ 10 ml

2.2.2. Nachweis aktivierter Caspase-3

Zur Immunodetektion von gespaltenen und somit aktivierter Caspase-3 wurden zunächst Zelllysate mit einer Proteinmenge von 70 µg auf einem 15%-igen SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Westernblot-Analyse – wie oben beschrieben – durchgeführt. Zum Nachweis aktivierter Caspase-3 wurde der gegen das große Fragment der gespaltenen Caspase-3 gerichtete polyklonale Erstantikörper (Cleaved Caspase-3 (Asp 175) Antibody) in der Verdünnung 1:500 verwendet. Die Inkubation der PVDF-Membran erfolgte nach Herstellerangaben bei 4 °C über Nacht. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation der PVDF-Membran mit dem HRP-konjugierten Zweitantikörper Ziege anti-Hase in einer Verdünnung von 1:10000 in TBS-T für 2,5 h bei RT.

Das Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins liegt bei 17 und 19 kDa.

2.2.3. Nachweis von p-Src

Zum immunologischen Nachweis der an Tyrosin 416 phosphorylierten und somit aktivierten Tyrosinkinase Src wurden Zelllysate mit einem Proteingehalt von 30 µg mittels 10%-igem SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Westernblotting auf eine PVDF-Membran

aufgebracht. Der Nachweis von *p*-Src erfolgte mittels Inkubation mit dem 1:1000 in 5% (w/v) BSA / TBS-T (vgl. Kap. II.1.5.) verdünnten Phospho-Src Family (Tyr416) Antikörper nach Herstellerangaben bei 4 °C über Nacht. Als Zweitantikörper wurde HRP-konjugierter Ziege anti-Hase Antikörper 1:10000 in TBS-T für 1,5 h bei RT verwendet.

Das Molekulargewicht von *p*-Src liegt bei 60 kDa.

2.2.4. Nachweis von Src

Neben der Bestimmung des aktivierten *p*-Src erfolgte zudem auch der Nachweis des Gesamt-Src-Proteins. Hierfür wurden ebenfalls Zelllysate mit einem Proteingehalt von 30 µg mittels 10%-iger SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zum Nachweis von Src erfolgte die Inkubation der PVDF-Membran mit dem 1:1000 in 5% (w/v) BSA / TBS-T (vgl. Kap II.1.5.) verdünnten Src Antikörper nach Herstellerangaben bei 4 °C über Nacht. Als Zweitantikörper wurde HRP-konjugierter Ziege anti-Hase Antikörper 1:10000 in TBS-T für 1,5 h bei RT verwendet.

Das Molekulargewicht von Src liegt ebenfalls bei 60 kDa.

2.2.5. Nachweis von *p*-FAK

Zur Immunodetektion der an Y397 phosphorylierten und somit aktivierten *focal adhesion kinase* FAK erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung von Zelllysaten mit 40 µg Proteingehalt mittels 10%-iger SDS-PAGE. Die Inkubation der PVDF-Membran zum Nachweis von *p*-FAK erfolgte mit dem 1:1000 in 5% (w/v) BSA / TBS-T (vgl. Kap II.1.5.) verdünnten monoklonalen Anti-Human FAK Antikörper nach Herstellerangaben bei RT für 2 h. Als Zweitantikörper wurde HRP-konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper 1:5000 in TBS-T für 45 min. bei RT verwendet.

Das Molekulargewicht von *p*-FAK liegt bei 125 kDa.

2.2.6. Nachweis von FAK

Zum immunologischen Nachweis des Gesamt-FAK-Proteins wurden ebenfalls Zelllysate mit 40 µg Proteingehalt verwendet und mittels 10%-iger SDS-PAGE aufgetrennt. Die Inkubation der PVDF-Membran zum Nachweis von FAK erfolgte mit dem 1:1000 in 1% (w/v) BSA / TBS-T (vgl. Kap II.1.5.) verdünnten monoklonalen Anti-FAK Antikörper nach Herstellerangaben bei

RT für 2 h. Als Zweitantikörper wurde HRP-konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper 1:10000 in TBS-T für 45 min. bei RT verwendet.

Das Molekulargewicht von *FAK* liegt ebenfalls bei 125 kDa.

2.2.7. Nachweis von *p-Akt*

Der immunologische Nachweis der an Serin 473 phosphorylierten und somit aktivierten Proteinkinase *Akt* erfolgte zunächst analog Kap. II.2.2.2., jedoch mit Zelllysaten mit 30 µg Proteingehalt. Die Inkubation der PVDF-Membran erfolgte mit dem 1:2000 in 5% (w/v) BSA / TBS-T (vgl. Kap II.1.5.) verdünnten monoklonalen Phospho-*Akt* Antikörper nach Herstellerangaben bei RT für 2 h. Als Zweitantikörper wurde HRP-konjugierter Ziege anti-Hase Antikörper 1:8500 in TBS-T für 1 h bei RT verwendet.

Das Molekulargewicht von *p-Akt* liegt bei 60 kDa.

2.2.8. Nachweis von *Akt*

Die Immunodetektion des Gesamt-*Akt*-Proteins erfolgte ebenfalls mit Zelllysaten mit 30 µg Proteingehalt und gelelektrophoretischer Auftrennung mittels 10%-iger SDS-PAGE. Die Inkubation der PVDF-Membran zum Nachweis von *Akt* erfolgte mit dem 1:2000 in 5% (w/v) BSA / TBS-T (vgl. Kap II.1.5.) verdünnten polyklonalen *Akt*-Antikörper nach Herstellerangaben bei RT für 2 h. Als Zweitantikörper wurde HRP-konjugierter Ziege anti-Hase Antikörper 1:8500 in TBS-T für 1 h bei RT verwendet.

Das Molekulargewicht von *Akt* liegt bei 60 kDa.

2.3. Immunzytochemie

2.3.1. Nachweis aktivierter Caspase-3

Die Aussaat der OV-MZ-6 Zellen zum Nachweis aktivierter Caspase-3 erfolgte wie oben beschrieben als Suspensionszellen in 50% (v/v) Aszites, 50% (v/v) Komplettmedium ohne FCS.

Der für die Versuche dieser Arbeit verwendete Aszites stammte von einer an Ovarialkarzinom im Stadium FIGO IV erkrankten Patientin, die nicht chemotherapeutisch vorbehandelt worden war. Die Aszitesgewinnung

sowie die Verwendung wurden vom Ethik-Komitee der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München genehmigt. Die Spenderin gab gemäß der Deklaration von Helsinki ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung ihrer Proben für Forschungszwecke. Der Aszites wurde vor Gebrauch zentrifugiert, um Partikel sowie Fibrinablagerungen zu entfernen. Auf eine Filtrierung wurde bewusst verzichtet, um die ursprüngliche Zusammensetzung der Aszitesflüssigkeit nicht zu verändern.

Als Kontrolle dienten OV-MZ-6 Zellen, die in Selektionsmedium für 48 h in Suspension gehalten wurden, sowie adhärent kultivierte Zellen. Nach der Ernte erfolgte die Fixierung mit 4% (w/v) PFA für 15 min. bei RT sowie die Behandlung mit 0,05% (w/v) Saponin für 10 min., ebenfalls bei RT. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 1 h bei RT in PBS, 2% (w/v) BSA inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem gegen aktivierte Caspase-3 gerichteten polyklonalen Erstantikörper in der Verdünnung 1:100 in PBS, 1% (w/v) BSA für 2,5 h bei RT sowie anschließend mit dem Alexa-488-konjugierten Zweitantikörper Ziege anti-Hase in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS, 1% (w/v) BSA für 45 min. bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen und Überführen der Zellsuspension in Mikrochamberslides erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenz-Intensitäten und somit der Nachweis aktivierter Caspase-3 in den unterschiedlichen Zelltransfektanten mithilfe eines konfokalen Lasermikroskops (CLSM).

2.4. Durchflusszytofluorometrie

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Durchflusszytofluorometrie handelt es sich um das Prinzip des „fluorescence-activated cell sorting“ (FACS). Mit dieser Methode können größere Populationen suspendierter Zellen in einem flüssigen Medium schnell untersucht werden. Hierbei werden die suspendierten Zellen einzeln in das Gerät gesogen und nach ihrer Größe und Zellmorphologie aufgetrennt. Zudem können spezifische Zellsubpopulationen nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die gegen hochspezifische Zelloberflächenantigene gerichtet sind, durch Fluoreszenzdetektoren selektiert werden.

Das Durchflusszytofluorometer detektiert hierbei sowohl gebrochenes als

auch durch Fluoreszenz emittiertes Licht. Die einzelnen Zellen werden im Innern des Geräts mit Hilfe eines fokussierten Laserlichtstrahls beleuchtet. Hierbei kommt es zur Brechung und Streuung des Lichtstrahls. Das „Vorwärtsstreulicht“ (*Forward Scatter* = FSC) gibt Auskunft über die Zellgröße und die Beschaffenheit der Zelloberfläche. Das „Seitwärtsstreulicht“ (*Sidewarts Scatter* = SSC) dient der Bestimmung der Granularität der Zelle sowie der Größe und Struktur ihres Zellkerns (<https://www.antikoerper-online.de/resources/17/1247/was-ist-durchflusszytometrie-facs/>).

Anhand dieser Eigenschaften werden die Zellen in der Durchflusszytofluorometrie sortiert und die Ergebnisse mittels Histogramm dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Gerät FACS Calibur der Firma Becton-Dickinson verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Cell Quest™ Pro.

2.4.1. Apoptosenachweis mittels Annexin V-Fluorescein-Färbung

In der hier durchgeführten Untersuchung erfolgte der Apoptosenachweis mittels Annexin V-Fluorescein-Färbung. Annexin V ist ein Phospholipid-Bindeprotein, welches eine hohe Affinität für Phosphatidylserin aufweist. Phosphatidylserin wird in frühen Stadien der Apoptose von der inneren auf die äußere Plasmazellmembran verlagert und kann dort durch Bindung von Annexin V nachgewiesen werden (Koopman et al. 1994, Homburg et al. 1995, Verhoven et al. 1995, Vermes et al. 1995). Da nicht nur apoptotische, sondern auch nekrotische Zellen aufgrund des Verlusts der intakten Zellmembran Phosphatidylserin exprimieren, erfolgte zur Differenzierung zwischen den beiden Formen des Zelltods eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit Propidium Jodid (PI), welches die DNA nekrotischer Zellen, die eine undichte Zellmembran aufweisen, anfärbt. Annexin V ist in diesem Assay bereits von Herstellerseite mit Fluorescein markiert, sodass die Inkubation mit einem Zweitantikörper entfällt.

2.4.1.1. Suspensionszellen in DMEM

Humane OV-MZ-6 Zellen wurden wie bereits beschrieben für 48 h in Suspension mit Medium gehalten und dann geerntet. Die jeweils ausgesäte

Zellmenge betrug pro Zellkulturflasche 1,5 Mio. Zellen bei einer Konzentration von 250.000 Zellen/ml für jede Zelltransfektante. Als Kontrolle wurden adhärenente OV-MZ-6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden bei 246 x g für 2 min. zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und anschließend in die Probenröhrchen für die FACS-Analyse überführt. Pro zu untersuchender Zelltransfektante ergaben sich daraus vier Probenröhrchen: i) Autofluoreszenz, ii) Inkubation mit Annexin V-Fluorescein, iii) Inkubation mit PI, iii) Inkubation mit Annexin V-Fluorescein und PI. Die weitere Vorgehensweise der Inkubation mit Annexin V-Fluorescein, PI oder Annexin V-Fluorescein/PI und die erforderlichen Waschschrirte erfolgten nach Herstellerangaben des verwendeten Kits *Annexin-V-Fluos*. Die durchflusszytometrische Auswertung erfolgte mittels Quadrantenanalyse: Zellen, die weder durch Annexin V noch PI gefärbt waren, wurden als vitale Zellen gewertet. Zellen, die durch Annexin V aber nicht durch PI gefärbt waren, wurden als apoptotische Zellen gewertet und Zellen, die sowohl durch Annexin V als auch durch PI gefärbt waren, wurden als nekrotische Zellen gewertet.

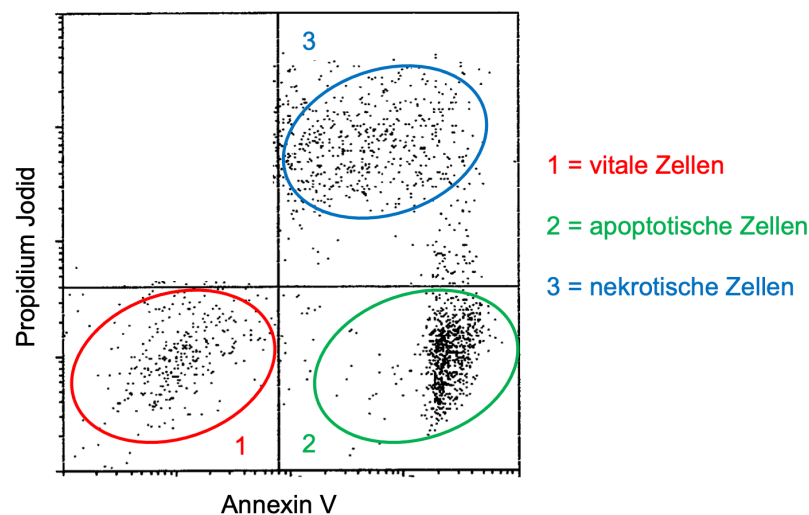


Abbildung 13: Darstellung der Zellviabilität im Durchflusszytometer mittels Annexin V-Fluorescein-Färbung

Schematische Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse Annexin V-Fluorescein/PI-gefärbter Zellen. Im linken unteren Quadranten des Histogramms kommen vitale Zellen zur Darstellung, im rechten unteren Quadranten apoptotische Zellen und im rechten oberen Quadranten nekrotische Zellen. Abb. modifiziert nach (van Engeland et al. 1998).

2.4.1.2. Suspensionszellen in Aszites

Humane OV-MZ-6 Zellen wurden 48 h in einer Suspension aus 50% (v/v)

Aszites und 50% (v/v) Komplettmedium ohne FCS kultiviert. Als Kontrolle dienten OV-MZ-6 Zellen, die in Selektionsmedium für 48 h in Suspension kultiviert wurden. Das weitere Vorgehen geschah wie in Kap. II.2.4.1.1 beschrieben.

2.5. Immunzytochemische Darstellung des Apoptoseverhaltens mittels Annexin V-Fluorescein-Färbung

Die Aussaat und Behandlung der Zellen zum immunzytochemischen Nachweis von Apoptose und Nekrose mittels Annexin V-Fluorescein erfolgte analog dem Vorgehen bei der Durchflusszytofluorometrie. Die Darstellung der Fluoreszenz erfolgte mittels CLSM nach Aufpipettieren der Zellsuspension auf Objektträger.

2.6. Darstellung von Zellclustern

Für die Bestimmung der Zellcluster-Größe der unterschiedlichen Zelltransfektanten in Suspension erfolgte zunächst die Beschichtung von 6-Well-Platten mit 1% (w/v) Agarose in „growth arrest cell culture medium“ (GAM) (ohne FCS und zugesetzte Aminosäuren), um eine Adhäsion der Zellen an der Wachstumsfläche zu verhindern. Anschließend erfolgte die Aussaat von 50.000 Zellen pro Zelltransfektante pro Well und Inkubation in 2 ml Komplettmedium für 1 h. Dann wurden die Zellsuspensionen in Eppendorf-Gefäße überführt und die Zellcluster unter dem Mikroskop (CLSM) begutachtet.

2.7. Statistische Datenanalyse

Die statistische Auswertung ausgewählter Daten erfolgte mit Sigma Plot 14 (Systat Inc., Erkrath, D) unter Verwendung einer zweifaktoriellen ANOVA mit einem paarweisen *post hoc* Signifikanztest. Die Datensätze wurden auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk; Bedingung $P \geq 0,050$) und auf Varianzhomogenität (Braun-Forsythe; Bedingung $P \geq 0,050$) getestet. Im Falle eines bestandenen Tests wurde die ANOVA parametrisch mit paarweisem *post hoc* Bonferroni *t*-Test durchgeführt. Ansonsten wurde die Analyse mit einer Kruskal-Wallis ANOVA mit paarweisem *post hoc* Tukey *t*-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede sind in den graphischen Darstellungen durch * für $P < 0,050$, ** für $P < 0,010$ und *** für $P < 0,001$ gekennzeichnet.

III. ERGEBNISSE

Die überwiegende Mehrzahl humaner Ovarialkarzinomzellen exprimiert das Integrin $\alpha\beta 3$ (Carreiras et al. 1999), welches entscheidend an der intraabdominellen Ausbreitung und Metastasierung der Tumorzellen beteiligt ist (Wang et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung auf das Zellüberleben und die Apoptose in einem humanen Ovarialkarzinomzellmodell *in vitro* untersucht. Hierfür wurde die Expression proapoptotischer Faktoren sowie die Aktivierung von Integrin-assoziierten Signalmolekülen, die zum Zellüberleben beitragen, an den verschiedenen Zelltransfektanten TMD- $\alpha\beta 3$, TMD-GpA und TMD-GpA-I, die das Integrin $\alpha\beta 3$ in unterschiedlich aktiven TMD-Konformationen exprimieren, sowohl unter Kultivierungsbedingungen in Adhärenz als auch in Suspension untersucht. Zudem wurde der Einfluss von Aszites auf die Apoptoseregulation und das Zellüberleben in Suspension analysiert.

1. Darstellung des Einflusses von Aszites auf die Apoptoseregulation in Suspension kultivierter OV-MZ-6 Zellen als Funktion des Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierungsstatus

1.1. Nachweis früher Apoptose-Merkmale mittels Annexin V-Fluorescein-Färbung

In der hier durchgeführten Untersuchung erfolgte der Apoptosenachweis in Suspension mit Aszites kultivierter Ovarialkarzinomzellen mittels Annexin V-Fluorescein-Färbung. Annexin V ist ein Phospholipid-Bindeprotein, welches eine hohe Affinität für Phosphatidylserin aufweist. Phosphatidylserin wird in frühen Stadien der Apoptose von der inneren auf die äußere Plasmazellmembran verlagert (sog. „Phosphatidylserin-Switch“) und kann dort durch Bindung von Annexin V nachgewiesen werden (Koopman et al. 1994, Homburg et al. 1995, Verhoven et al. 1995, Vermes et al. 1995)

1.1.1. Darstellung in der Durchflusszytometrie

Um das pro-apoptotische Ereignis des „Phosphatidylserin-Switchs“ nachzuweisen, wurden die verschiedenen Zelltransfektanten für 48 h suspendiert in Aszites oder in DMEM kultiviert. Anschließend erfolgte, wie in Kap. II.2.4.1 beschrieben, die Inkubation der Zellen mit Annexin V-Fluorescein und PI sowie die durchflusszytometrische Auswertung mittels Quadrantenanalyse zur Ermittlung vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellfraktionen.

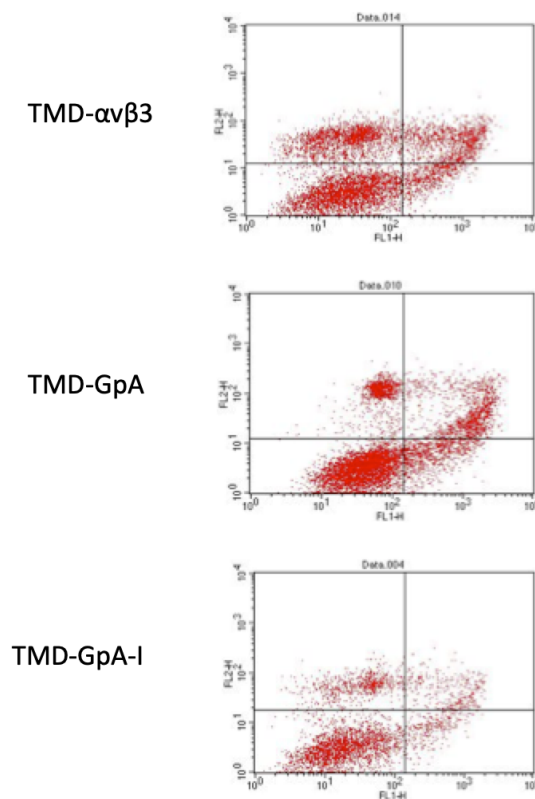


Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der Quadrantenanalyse zur Ermittlung der vitalen, apoptotischen und nekrotischen Fraktionen der verschiedenen in Aszites suspendiert kultivierten Integrin $\alpha v\beta 3$ TMD-Zelltransfektanten nach durchflusszytometrischer Bestimmung der Annexin- und PI-Färbung

Nach 48-stündiger Kultivierung von suspendierten Integrin $\alpha v\beta 3$ TMD-Zelltransfektanten in Aszites wurden die Färbungen mit Annexin V-Fluorescein und PI, wie in Kap. II.2.4.1 beschrieben, durchgeführt. Abgebildet ist eine typische und repräsentative Quadrantenanalyse der Daten zur durchflusszytometrischen Messung aller drei verschiedener Integrin $\alpha v\beta 3$ TMD-Zelltransfektanten zur Ermittlung vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellfraktionen. Hierbei kam die Fraktion vitaler Zellen im linken unteren Quadranten (keine Anfärbung) zur Darstellung, die Fraktion apoptotischer Zellen im rechten unteren Quadranten (nur Annexin-Färbung) und die Fraktion nekrotischer Zellen im rechten oberen Quadranten (Annexin- und PI-Färbung) (vgl. auch Kap. II.2.4.1.1. und Abb. 13).

Die Annexin V-Fluorescein- und PI-Färbung ergab deutliche Unterschiede hinsichtlich des Gehalts an apoptotischen, nekrotischen und vitalen Zellen nach Suspensionskultur in DMEM oder Aszites.

TMD-GpA-I-Zelltransfektanten wiesen hierbei sowohl nach Suspensionskultur in Aszites (~ 71%) als auch in DMEM (~ 58%) den höchsten Anteil vitaler Zellen auf. Im Vergleich hierzu zeigten TMD-GpA-Zelltransfektanten nach suspendierter Kultivierung in Aszites ~ 34% und in DMEM nur ~ 18% vitale Zellen. TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten nahmen mit einem prozentualen Anteil von ~ 55% vitaler Zellen in Aszites und ~ 29% vitaler Zellen in DMEM eine Mittelstellung ein. Insgesamt wiesen somit alle Zelltransfektanten nach Suspensionskultur in Aszites deutlich höhere Anteile vitaler Zellen als in DMEM auf.

Bei der Betrachtung der apoptotischen Zellfraktionen zeigten TMD-GpA-I-Zelltransfektanten den niedrigsten Anteil sowohl nach suspendierter Kultivierung in Aszites (~ 12%) als auch in DMEM (~ 29%). Danach folgten TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten mit einem Anteil von ~ 23% apoptotischer Zellen nach Suspensionskultur in Aszites und ~ 53% in DMEM. TMD-GpA-Zelltransfektanten wiesen mit ~ 42% nach suspendierter Kultivierung in Aszites und ~ 63% in DMEM den höchsten Anteil apoptotischer Zellfraktionen auf.

Bei der Auswertung der nekrotischen Zellfraktionen zeigten in Suspension mit Aszites kultivierte TMD-GpA-I-Zelltransfektanten den niedrigsten Anteil nekrotischer Zellen mit ~ 16%. Im Vergleich dazu wiesen TMD-GpA-Zelltransfektanten sowohl nach Suspensionskultur in Aszites (~ 37%) als auch in DMEM (~ 22%) den höchsten Anteil nekrotischer Zellen auf. TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten nahmen nach Suspensionskultur in Aszites mit ~ 28% nekrotischen Zellen erneut eine Mittelstellung ein, in DMEM zeigten sie mit ~ 10% einen vergleichbar hohen Anteil wie TMD-GpA-I-Zelltransfektanten (~ 13%) (Abb. 15 und 16). Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltransfektanten sind ebenfalls in Abb. 15 und 16 und in den jeweils zugehörigen Legenden dargestellt.

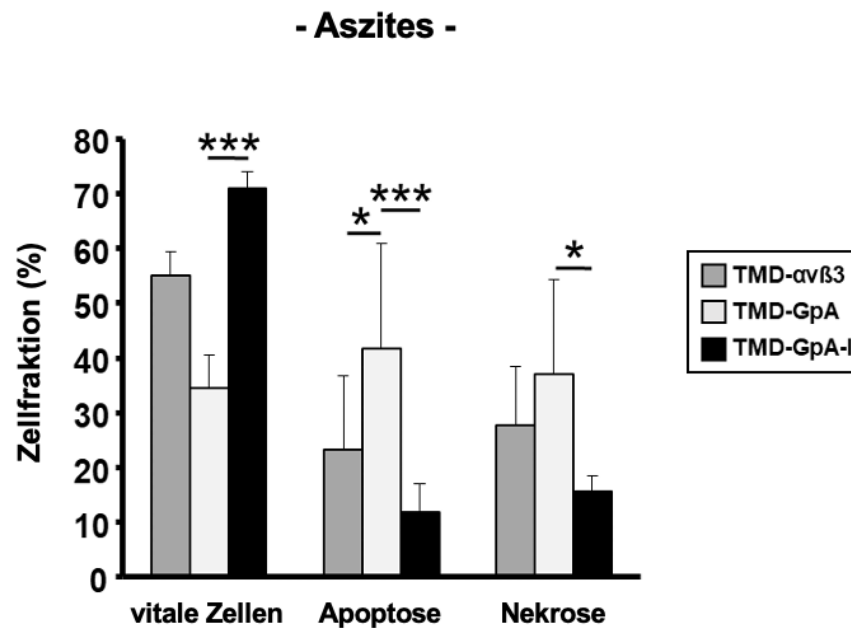


Abbildung 15: Darstellung früher Apoptose-Merkmale als Funktion der Integrinaktivierung in Aszites suspendiert kultivierter Integrin α v β 3 TMD-Zelltransfektanten

Integrin α v β 3 TMD-Zelltransfektanten wurden für 48 h in Suspension mit Aszites kultiviert und dann mit dem Annexin V-Fluorescein/PI Apoptose Assay behandelt, um die Anteile vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellfraktionen jeder Zelltransfektante zu ermitteln. Die Abbildung zeigt den Anteil jeder Zellfraktion in %. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte des prozentualen Anteils in % aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$, \pm S.D.). Die Signifikanztestung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit *post hoc* Bonferroni *t*-Test. Signifikante Unterschiede sind hierbei durch * $P < 0,050$, ** $P < 0,010$ und *** $P < 0,001$ gekennzeichnet.

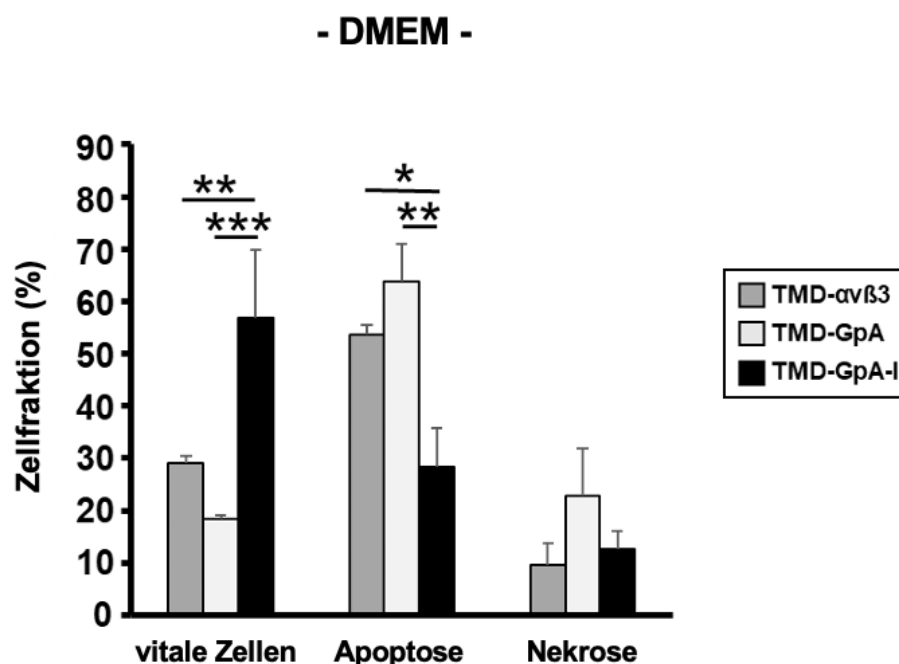


Abbildung 16: Darstellung früher Apoptose-Merkmale als Funktion der Integrinaktivierung in DMEM suspendiert kultivierter Integrin $\alpha\beta3$ TMD-Zelltransfektanten

Integrin $\alpha\beta3$ TMD-Zelltransfektanten wurden für 48 h in Suspension mit DMEM kultiviert und dann mit dem Annexin V-Fluorescein/PI Apoptose Assay behandelt, um die Anteile vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellfraktionen jeder Zelltransfektante zu ermitteln. Die Abbildung zeigt den Anteil jeder Zellfraktion in %. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte des prozentualen Anteils in % aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$, \pm S.D.). Die Signifikanztestung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit *post hoc* Bonferroni *t*-Test. Signifikante Unterschiede sind hierbei durch * $P < 0,050$, ** $P < 0,010$ und *** $P < 0,001$ gekennzeichnet.

1.1.2. Darstellung mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie

Parallel zur durchflusszytometrischen Analyse der Annexin V-Fluorescein/PI-Färbung wurde diese mittels CLSM auf den Zelltransfektanten visualisiert. Hierbei zeigten sich nach Inkubation mit Annexin V-Fluorescein erneut die höchsten Fluoreszenz-Intensitäten für TMD- $\alpha\beta3$ - sowie für TMD-GpA-Zelltransfektanten. Außerdem wiesen TMD-GpA-Zelltransfektanten die intensivste Fluoreszenz nach Inkubation mit PI auf. Zellen, die TMD-GpA-I enthielten, zeigten sowohl nach Inkubation mit Annexin V-Fluorescein als auch mit PI die niedrigsten Fluoreszenz-Intensitäten. Als Kontrolle dienten adhärenente TMD-GpA-I-Zelltransfektanten, welche weder nach Inkubation mit Annexin V-Fluorescein noch mit PI detektierbare Fluoreszenz-Intensitäten aufwiesen (Daten nicht dargestellt).

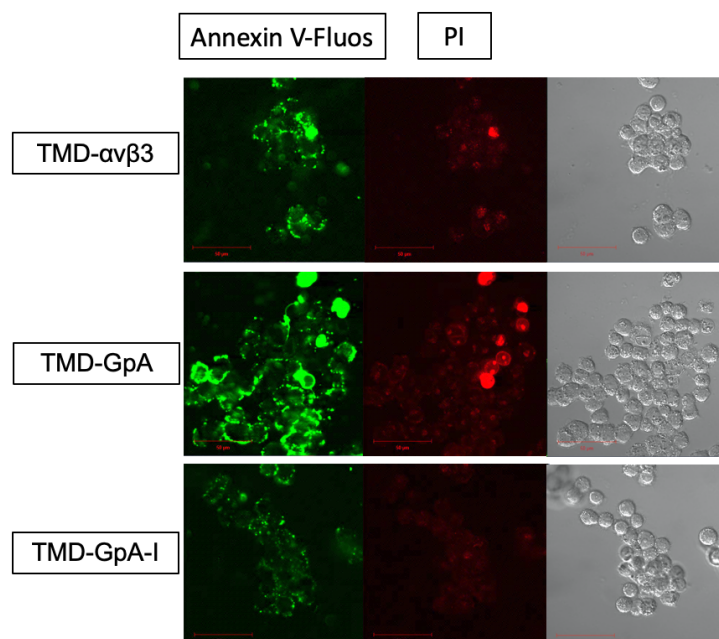


Abbildung 17: Darstellung früher Apoptose-Merkmale mittels in der CLSM detektierbarer Fluoreszenzsignalintensitäten als Funktion der Integrinaktivierung in DMEM suspendiert kultivierter Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Zelltransfektanten

Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Zelltransfektanten wurden für 48 h in Suspension mit DMEM kultiviert und dann mit dem Annexin V-Fluorescein/PI Apoptose Assay behandelt, um die Anteile vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellfraktionen jeder Zelltransfektante zu ermitteln. Die Visualisierung der Fluoreszenzsignalintensitäten für Annexin V-Fluorescein (grün) und PI (rot) erfolgte mittels CLSM. Die Abbildung zeigt repräsentative differentielle Interferenzkontrastbilder und die korrespondierenden Fluoreszenzbilder (Maßstabsleiste: 50 μm).

2. Aktivierung von Caspase-3 als Merkmal finaler Apoptoseprozesse in suspendierten Ovarialkarzinomzellen als Funktion des Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierungsstatus

In der Apoptoseregulation humaner Zellen nimmt die Cysteinprotease Caspase-3 eine entscheidende Position ein (Cohen 1997). Sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Apoptosesignalweg münden letztendlich in der Aktivierung dieser Effektor-Caspase, welche wiederum die proteolytische Spaltung weiterer Schlüsselproteine der Apoptose vermittelt und somit spezifische zellmorphologische und biochemische Veränderungen durch Zersetzung von Proteinen und DNA in Gang setzt (Cohen 1997, Fiandalo und Kyprianou 2012). Caspase-3 wird dabei, wie viele andere Proteasen, als sogenanntes Proenzym synthetisiert, welches zunächst proteolytisch in die aktive Form gespalten werden muss (Thornberry 1998). Aktivierte Caspase-3 besteht aus zwei Fragmenten mit einem Molekulargewicht von 17 und 19 kDa.

2.1. Darstellung aktivierter Caspase-3 mittels Westernblot-Analyse

Der Nachweis gespaltener und somit aktivierter Caspase-3 erfolgte zunächst mittels Westernblot-Analyse. Zelllysate adhärenter oder in DMEM suspendiert kultivierter OV-MZ-6 Zelltransfektanten, welche die unterschiedlichen Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Varianten exprimierten, wurden, wie in Kap. II.2.2. beschrieben, generiert. Die Immunodetektion erfolgte wie in Kap. II.2.2.2. dargestellt.

Hierbei zeigte sich unter verankerungsunabhängigen Kultivierungsbedingungen eine deutliche und differenzielle Caspase-3-Aktivierung. Die Integrin $\alpha\beta 3$ Zelltransfektante TMD-GpA mit assoziierten TMD, niedriger Ligandenbindungsaffinität und Inkompetenz zur Vermittlung der Signaltransduktion zeigte hierbei eine ca. 3-fach höhere Caspase-3-Aktivierung als die Zelltransfektante TMD-GpA-I mit aufgehobener TMD-Dimerisierung, hoher Ligandenbindungsaffinität und konstitutiver Signaltransduktion. TMD-GpA wies zudem eine ca. 1,4-fach höhere Caspase-3-Aktivierung als die Zelltransfektante TMD- $\alpha\beta 3$ auf, welche das Wildtyp-Integrin $\alpha\beta 3$ exprimiert. TMD-GpA-I zeigte auch im Vergleich zu TMD- $\alpha\beta 3$ die niedrigsten Caspase-3-Aktivierungslevel. Die Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant. Die an GAPDH normalisierte Caspase-3-Expressionshöhe der TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten wurde hierbei jeweils gleich „1“ gesetzt (Abb. 18).

Im Gegensatz dazu wurde in den unter Adhärenz kultivierten Zelltransfektanten keine Caspase-3-Aktivierung beobachtet.

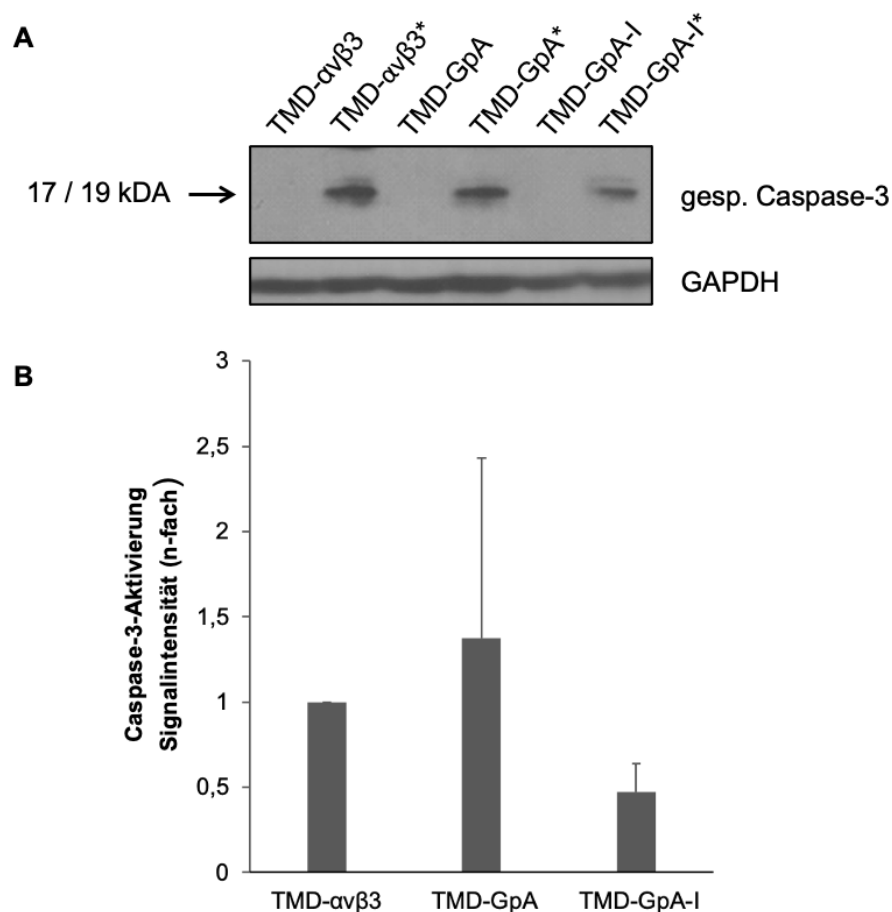


Abbildung 18: Nachweis aktivierter Caspase-3 in Abhängigkeit der zellulären Expression von Integrin $\alpha\beta 3$ in verschiedenen TMD-konformationellen Aktivierungszuständen mittels Westernblot-Analyse

Die verschiedenen Zelltransfektanten wurden für 48 h entweder adhärent oder suspendiert in DMEM kultiviert und Westernblot-Analysen wie unter Kap. II.2.2.2. beschrieben durchgeführt. **A)** Typischer und repräsentativer Westernblot nach Immunfärbung aktivierter Caspase-3 in adhärent oder suspendiert (*) kultivierten OV-MZ-6-Zelltransfektanten. **B)** Densitometrische Analyse der für aktivierte Caspase-3 erhaltenen Signalstärke. Die Signalintensitäten für Caspase-3 wurden densitometrisch ermittelt und am Gehalt des „house keeping“-Proteins GAPDH normalisiert. Der Gehalt an aktivierter Caspase-3 in adhären Zelltransfektanten lag unter der Detektionsgrenze der Westernblot-Analyse. Die Expressionsprofile der suspendiert kultivierten Zellen sind im Histogramm als Mittelwerte der relativen Signalintensitäten für Caspase-3 aufgezeigt, wobei dessen Expressionshöhe in den TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten auf „1“ gesetzt wurde (n=2, \pm S.D.).

2.2. Immunzytochemischer Nachweis der aktivierten Caspase-3 und Auswertung mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie

Die Detektion aktivierter Caspase-3 erfolgte parallel auch nach immunzytochemischer Färbung und Darstellung mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie (CLSM). Hierfür wurde, wie in Kap. II.2.4.1. beschrieben, aktivierte Caspase-3 in den verschiedenen in DMEM oder Aszites suspendierten Zelltransfektanten immunzytochemisch angefärbt und anschließend die Fluoreszenz-Intensitäten am CLSM bestimmt. Als Kontrolle dienten Zelltransfektanten, die TMD- $\alpha\beta 3$ exprimierten. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Westernblot-Analyse zeigte sich auch hierbei ein deutlich intensiveres Fluoreszenzsignal für aktivierte Caspase-3 in TMD-GpA-Zelltransfektanten, die für 48 h in DMEM kultiviert worden waren. TMD-GpA-I-Zelltransfektanten wiesen die niedrigste Fluoreszenz-verstärkte Signalintensität auf. Im Vergleich dazu zeigten alle Zelltransfektanten, die in Aszites suspendiert kultiviert worden waren, deutlich niedrigere Fluoreszenzintensitäten für die aktivierte Caspase-3, wobei auch hierbei TMD-GpA-I-Transfektanten die niedrigsten und TMD-GpA-Transfektanten die höchsten Fluoreszenzintensitäten aufwiesen. Zellen, die TMD- $\alpha\beta 3$ exprimierten, zeigten erneut mittlere Signalintensitäten für aktivierte Caspase-3.

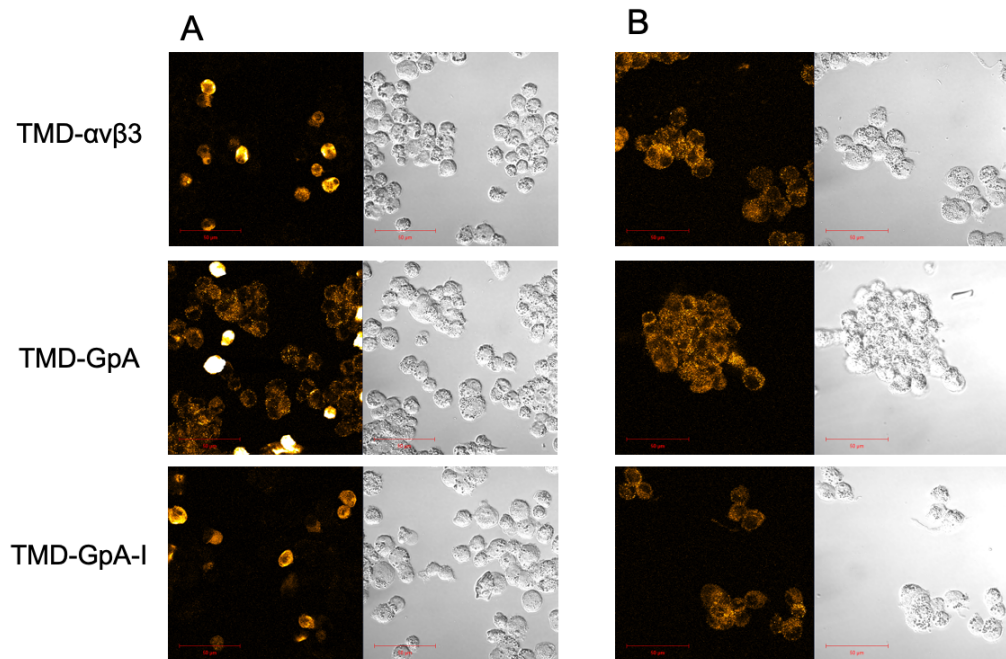


Abbildung 19: Nachweis aktivierter Caspase-3 in suspendiert kultivierten Ovarialkarzinomzellen in Abhängigkeit vom Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierungszustand mittels immunzytochemischer Färbung und Auswertung am CLSM

Die verschiedenen Ovarialkarzinomzelltransfektanten TMD GpA, TMD-GpA-I und TMD- $\alpha\beta 3$ wurden für 48 h entweder in DMEM (A) oder in Aszites (B) flottierend kultiviert, geerntet und der immunzytochemische Nachweis von aktivierter Caspase-3 – wie unter Kap. II.2.4.1 beschrieben – durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Fluoreszenzsignalintensitäten erfolgte mittels CLSM. Abgebildet sind repräsentative Fluoreszenzbilder der verschiedenen Zelltransfektanten sowie die korrespondierenden Differenzialinterferenzkontrast (DIC)-Bilder der Zellen. In beiden Suspensionsmedien wiesen TMD-GpA-Zelltransfektanten hierbei die höchste Fluoreszenzintensität auf und TMD-GpA-I-exprimierende Zellen die niedrigste. In Abhängigkeit von der TMD- $\alpha\beta 3$ -Expression wurde eine intermediäre Signalintensität beobachtet. Die Fluoreszenzsignalintensitäten für aktivierte Caspase-3 aller in Aszites suspendierten Zelltransfektanten waren deutlich geringer als die der Zellsuspensionen in DMEM.

3. Darstellung der Clusterbildung in Abhängigkeit der unterschiedlichen Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Sequenzen in suspendierten OV-MZ-6-Zelltransfektanten

Bereits bei den immunzytochemischen Untersuchungen an suspendiert kultivierten Zelltransfektanten fiel eine ausgeprägte Tendenz zur Zellaggregation in multizelluläre Cluster, insbesondere bei Zellen, die TMD-GpA enthielten, auf. Diese Beobachtung sollte nun noch einmal objektiviert werden, weshalb wie in Kap. II.2.5. beschrieben, die Inkubation der

unterschiedlichen TMD-Transfektanten in mit Agarose beschichteten Sixwell-Platten in DMEM erfolgte und die Clusterbildung nachfolgend mittels CLSM begutachtet wurde. Hierbei bestätigte sich bei allen suspendiert kultivierten TMD-Zelltransfektanten die Tendenz zur Clusterbildung. Die ausgeprägteste Tendenz zeigte sich bei TMD-GpA-Zelltransfektanten, TMD-GpA-I-Zelltransfektanten wiesen die niedrigste Tendenz auf. Zellen, die TMD- $\alpha\beta 3$ enthielten, nahmen eine Mittelstellung hinsichtlich der Zellclustergrößen ein (Abb. 20).

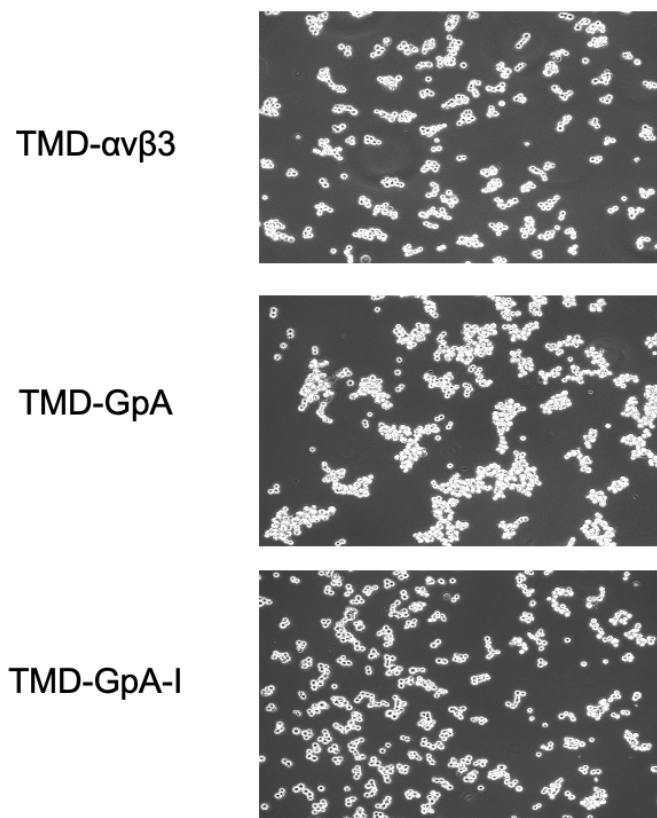


Abbildung 20: Darstellung der Clusterbildung in Suspensionszellen in Abhängigkeit der verschiedenen Integrin $\alpha\beta 3$ TMD mittels CLSM

TMD-Zelltransfektanten wurden, wie in Kap. II.2.5. beschrieben, in mit Agarose beschichteten Sixwell-Platten in Suspension in DMEM kultiviert. Sodann erfolgte der Nachweis der Zellclusterbildung mittels CLSM. Abgebildet sind repräsentative Bilder der verschiedenen TMD-Zelltransfektanten. TMD-GpA-Zelltransfektanten wiesen hierbei die größte Tendenz zur Clusterbildung auf, TMD-GpA-I-Zelltransfektanten die niedrigste. Zellen, die TMD- $\alpha\beta 3$ enthielten, nahmen eine Mittelstellung hinsichtlich der Zellclustergrößen ein.

4. Aktivierung der Integrin-assoziierten Signalmoleküle Fokale Adhäsionskinase (FAK), Src-Kinase und PKB/Akt-Kinase in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand des Integrin $\alpha\beta 3$ in adhärennten und suspendierten OV-MZ-6-Zelltransfektanten

Im Gegensatz zu normalen epithelialen Zellen sind Tumorzellen meist unempfindlich gegenüber Anoikis und demzufolge in der Lage, ohne Adhäsion an die EZM zu überleben und zu proliferieren. Damit stellt die Anoikisresistenz eine natürliche molekulare Voraussetzung für das aggressive Metastasierungsverhalten von Tumorzellen dar (Taddei et al. 2012). Da bestimmten Integrinen bekanntermaßen eine Schlüsselposition beim Zellüberleben und beim Schutz vor Apoptose zukommt (Zhang et al. 1995, O'Brien et al. 1996, Brassard et al. 1999, Cheresch und Stupack 2008, Paoli et al. 2013), liegt die Vermutung nahe, dass Tumorzellen unter anderem durch die konstitutive Aktivierung Integrin-abhängiger Signaltransduktionsmoleküle wie *FAK* (Sulzmaier et al. 2014), die *Src*-Kinasen (Parsons und Parsons 2004, Roskoski 2015) und die *PKB/Akt*-Kinasen (Fresno Vara et al. 2004) in der Lage sind, Anoikis zu entgehen (Dolinschek et al. 2021).

Neben der Expression früher und später pro-apoptotischer Ereignisse, wie dem „Phosphatidylserin-Switch“ und der Aktivierung der Caspase-3, wurde deshalb ebenfalls die Aktivierung der Integrin-relevanten Signalmoleküle *FAK*, *Src*-Kinase und *PKB/Akt*-Kinase in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand des Integrin $\alpha\beta 3$ in adhärennten und suspendierten TMD-Zelltransfektanten untersucht.

4.1. Darstellung der *FAK*-Expression und Aktivierung mittels Westernblot-Analyse

Die Aktivierung von *FAK* wurde in der Westernblot-Analyse mit einem Antikörper nachgewiesen, der entweder gegen *FAK* oder die phosphorylierte aktivierte Form der *FAK* gerichtet war. Dazu wurden Zellen entweder adhärennt oder suspendiert in DMEM kultiviert und nach 48 h Zelllysate, wie in Kap. II.2.1.3 und II.2.2. beschrieben, gewonnen. Die densitometrische Auswertung der *FAK*-Expression in den einzelnen

Zelltransfektanten erfolgte nach Normalisierung an der erhaltenen Signalintensität für GAPDH mittels des BIORAD-Imagers. Die suspendiert kultivierten TMD-GpA-I- und TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten zeigten keinen wesentlichen Unterschied in der *FAK*-Expression. Jedoch wiesen sie eine ca. 1,7-fach erhöhte *FAK*-Expression im Vergleich zu Zelltransfektanten, die TMD-GpA exprimierten, auf. Auch bei den adhären kultivierten Zelltransfektanten zeigten sich insgesamt nur sehr marginale Unterschiede in der *FAK*-Expression. TMD- $\alpha\beta 3$ -exprimierende Zellen zeigten die niedrigsten *FAK*-Expressionslevel. TMD-GpA-I-Zelltransfektanten wiesen eine ca. 1,4-fach höhere Expression als TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten und eine ca. 1,3-fach höhere Expression als Zellen, die TMD-GpA exprimierten, auf. Die normalisierte *FAK*-Expressionshöhe der TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten wurde hierbei ebenfalls gleich „1“ gesetzt (Abb. 21).

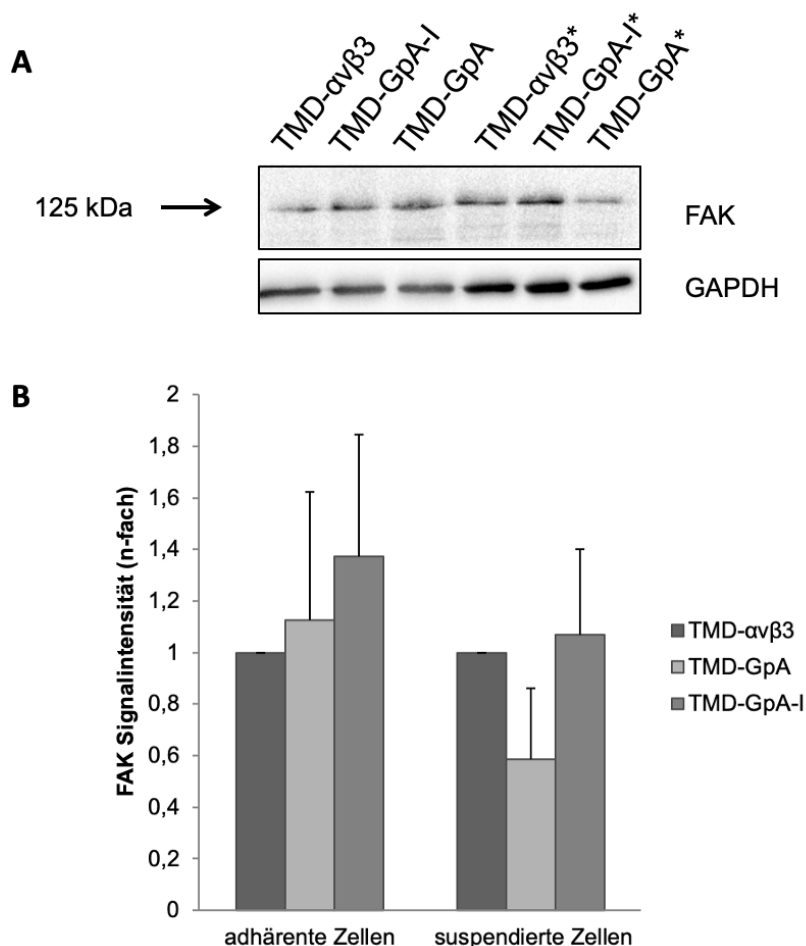


Abbildung 21: Nachweis der *FAK*-Expression in Abhängigkeit der zellulären Expression von Integrin $\alpha\beta 3$ in verschiedenen TMD-konformationellen Aktivierungszuständen mittels Westernblot-Analyse

A) *FAK*-Detektion mittels Westernblot-Analyse. Die Präparation der Zelllysate von adhären sowie suspendiert (*) kultivierten OV-MZ-6-Zelltransfektanten und die Westernblot-Analyse wurden wie unter Kap. II.2.2.6. beschrieben durchgeführt. Abgebildet ist ein typisches und repräsentatives Bild eines Westernblots. B) Densitometrische Analyse der *FAK*-Expression der adhären und suspendiert kultivierten Zelltransfektanten. Die Auswertung der Signalintensität der Proteinbanden für *FAK* und GAPDH erfolgte densitometrisch wie beschrieben. Dargestellt sind die an den für GAPDH ermittelten Signalstärken normalisierten Mittelwerte der relativen Signalintensitäten für die *FAK*-Proteinbanden, indem die Signalintensität in den TMD- $\alpha\beta 3$ -Transfektanten auf „1“ gesetzt wurde ($n=2, \pm$ S.D.).

Deutlichere Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltransfektanten zeigten sich hingegen bei der Untersuchung der *FAK*-Aktivierung in adhären und suspendiert kultivierten Zelltransfektanten. Dafür wurden Westernblot-Analysen mit einem Antikörper, der gegen die phosphorylierte und damit aktive Form der *FAK* (*p-FAK*) gerichtet ist, durchgeführt. Hierbei zeigte sich in den suspendiert kultivierten Zelltransfektanten ein ausgeprägter Unterschied zwischen TMD-GpA- und TMD-GpA-I-exprimierenden Zellen. TMD-GpA-Zelltransfektanten wiesen hierbei die niedrigsten Expressionslevel auf. In TMD-GpA-I-Zelltransfektanten war eine ca. 2,5-fach höhere *FAK*-Aktivierung im Vergleich zu TMD-GpA-Zelltransfektanten nachweisbar. Suspendiert kultivierte TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten zeigten im Vergleich zu TMD-GpA-exprimierenden Zellen sehr ähnliche Signalintensitäten für *p-FAK*.

In adhären kultivierten Zelltransfektanten wiesen TMD- $\alpha\beta 3$ -exprimierende Zellen die niedrigste *FAK*-Aktivierung auf. TMD-GpA-exprimierende Zellen zeigten im Vergleich hierzu nur eine ca. 1,3-fach erhöhte *FAK*-Aktivierung, TMD-GpA-I-Zelltransfektanten wiesen hingegen eine ca. 2,3-fach höhere *FAK*-Aktivierung auf. Die normalisierte *p-FAK*-Expressionshöhe der TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten wurde hierbei erneut gleich „1“ gesetzt (Abb. 22).

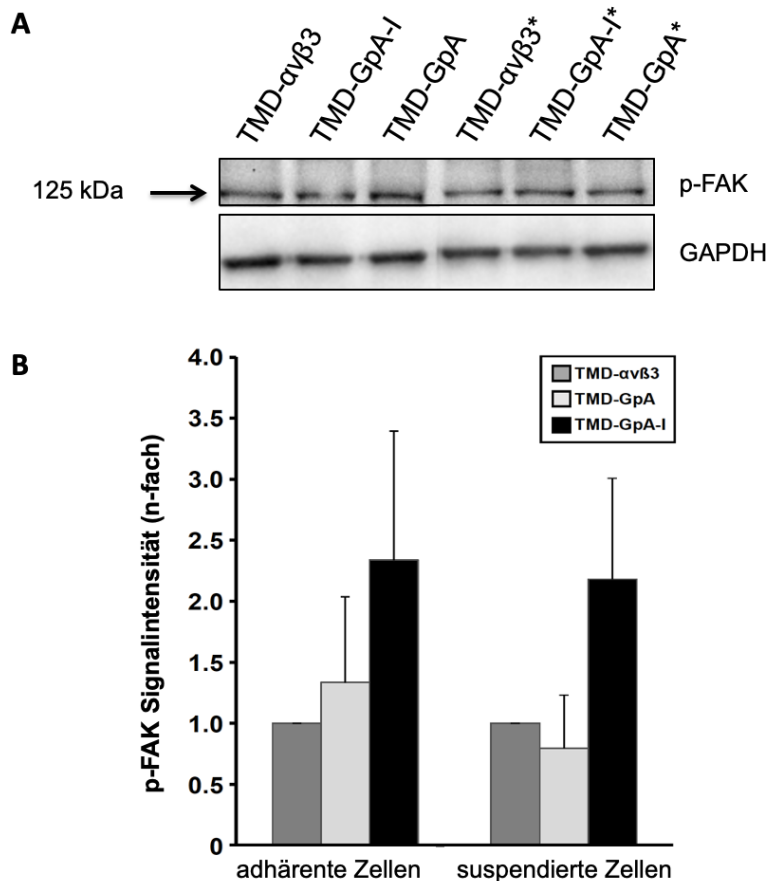


Abbildung 22: Nachweis der *p*-FAK-Expression in Abhängigkeit der zellulären Expression von Integrin α β 3 in verschiedenen TMD-konformationellen Aktivierungszuständen mittels Westernblot-Analyse

A) *p*-FAK-Detektion mittels Westernblot-Analyse. Die Präparation der Zelllysate von adhären und suspendiert (*) kultivierten OV-MZ-6-Zelltransfektanten und die Westernblot-Analyse wurden wie unter Kap. II.2.2.5. beschrieben durchgeführt. Abgebildet ist ein typisches und repräsentatives Bild eines Westernblots. B) Densitometrische Analyse der *p*-FAK-Expression der adhären und suspendiert kultivierten Zelltransfektanten. Die Auswertung der Signalintensität der Proteinbanden für *p*-FAK und GAPDH erfolgte densitometrisch wie beschrieben. Dargestellt sind die an den für GAPDH ermittelten Signalstärken normalisierten Mittelwerte der relativen Signalintensitäten für die *p*-FAK-Proteinbanden, indem die Signalintensität in den TMD- α v β 3-Transfektanten auf „1“ gesetzt wurde (n=10, \pm S.D.).

4.2. Darstellung der *Src*-Kinase-Expression und Aktivierung mittels Westernblot-Analyse

Die Aktivierung der *Src*-Kinase wurde in der Westernblot-Analyse mit einem Antikörper nachgewiesen, der entweder gegen *Src* oder die phosphorylierte aktivierte Form von *Src* gerichtet war. Dazu wurden OVMZ-6-Integrin α β 3-Zelltransfektanten entweder adhären oder in Suspension in DMEM kultiviert und nach 48 h Zelllysate, wie in Kap. II.2.2. beschrieben, gewonnen.

Hierbei zeigten TMD-GpA-I-Zelltransfektanten für *Src* und auch für *p-Src* die höchsten Expressionslevel unabhängig davon, ob sie adhären oder suspendiert kultiviert worden waren. In den in Suspension kultivierten Zellen zeigten TMD-GpA-I-Zelltransfektanten eine 1,7-fach erhöhte *Src*-Kinase-Expression im Vergleich zu TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten und eine ca. 2,8-fach erhöhte *Src*-Kinase-Expression im Vergleich zu TMD-GpA-Zelltransfektanten. In den adhären kultivierten Zellen wiesen TMD-GpA-I-Zelltransfektanten im Vergleich zu Zellen, die TMD-GpA exprimierten, eine ca. 2-fach höhere und im Vergleich zu Zellen, die TMD- $\alpha\beta 3$ exprimierten, eine ca. 6,5-fach höhere *Src*-Kinase-Expression auf. Der Nachweis der *Src*-Expression in adhären kultivierten Zelltransfektanten spiegelt hierbei eine Tendenz wider, ist jedoch aufgrund der hohen Standardabweichungen statistisch nicht auswertbar. Die normalisierte *Src*-Expressionshöhe der TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten wurde hierbei wieder gleich „1“ gesetzt (Abb. 23).

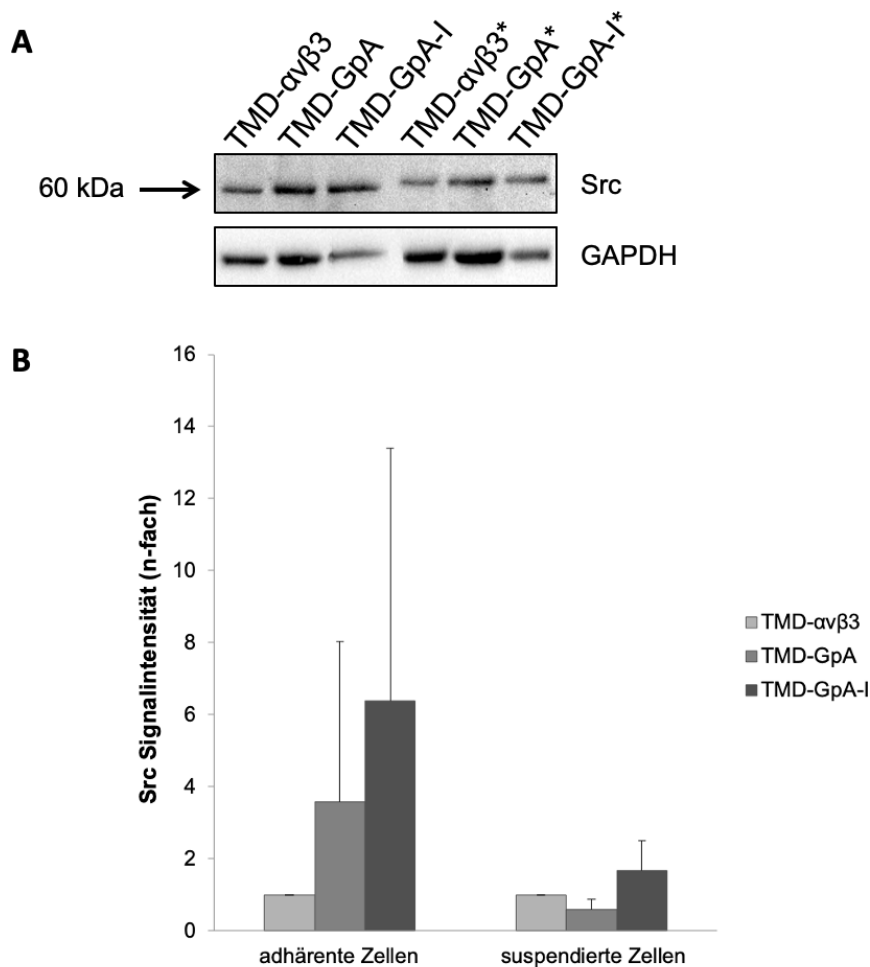


Abbildung 23: Nachweis der Src-Kinase-Expression in Abhängigkeit von der Expression verschieden aktiver Integrin $\alpha\beta3$ TMD-Varianten mittels Westernblot-Analyse

A) *Src*-Detektion mittels Westernblot-Analyse. Die Präparation der Zellysate adhärenter und in Suspension (*) kultivierter Zellen und die Westernblot-Analyse wurden wie beschrieben durchgeführt. Abgebildet ist ein typisches und repräsentatives Bild eines Westernblots. B) Densitometrische Analyse der *Src*-Expression der adhärent und suspendiert kultivierten Zellen. Die Auswertung der Signalintensität der Proteinbanden für *Src* und GAPDH erfolgte densitometrisch wie beschrieben. Dargestellt sind die an GAPDH normalisierten Mittelwerte der relativen Signalintensitäten für die *Src*-Proteinbanden, indem die Signalintensität in den TMD- $\alpha\beta3$ -Zelltransfektanten auf „1“ gesetzt wurde ($n=4 \pm$ S.D.).

Auch der Nachweis der *Src*-Kinase-Aktivierung ergab sowohl für adhärenent als auch für suspendiert kultivierte Zellen, die TMD-GpA-I exprimierten, die höchsten Expressionslevel. In den suspendiert kultivierten Zellen konnte für TMD-GpA-I-Zelltransfektanten eine 1,4-fach höhere *p*-*Src*-Expression als für TMD- $\alpha\beta3$ -Zelltransfektanten nachgewiesen werden. Im Vergleich zu TMD-GpA-Zelltransfektanten zeigten Zellen, die TMD-GpA-I exprimierten, eine ca. 2-fach höhere *Src*-Kinase-Aktivierung. In den adhärenent kultivierten Zellen zeigten TMD-GpA-I-Zelltransfektanten eine 2-fach höhere *p*-*Src*-Expression als Zellen, die TMD-GpA exprimierten und eine 3,4-fach höhere *p*-*Src*-Expression als TMD- $\alpha\beta3$ -Zelltransfektanten. Auch der Nachweis der *Src*-Aktivierung in adhärenent kultivierten Zelltransfektanten weist auf eine Tendenz hin, ist jedoch aufgrund der hohen Standardabweichungen statistisch ebenfalls nicht auswertbar. Die normalisierte *p*-*Src*-Expressionshöhe der TMD- $\alpha\beta3$ -Zelltransfektanten wurde hierbei erneut gleich „1“ gesetzt (Abb. 24).

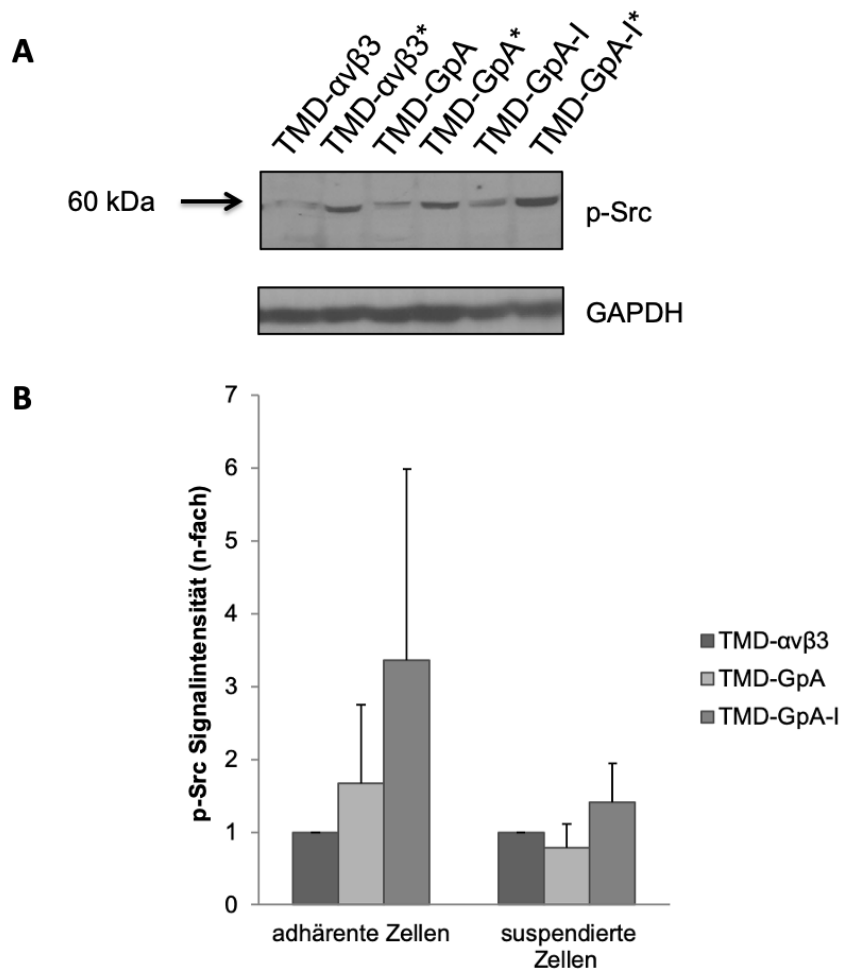


Abbildung 24: Nachweis der *p*-Src-Kinase-Expression in Abhängigkeit von der Expression verschieden aktiver Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Varianten mittels Westernblot-Analyse

A) *p*-Src-Detektion mittels Westernblot-Analyse. Die Präparation der Zelllysate von adhären und suspendiert (*) kultivierten OV-MZ-6-Zelltransfektanten und die Westernblot-Analyse wurden wie unter Kap. II.2.2.3. beschrieben durchgeführt. Abgebildet ist ein typisches und repräsentatives Bild eines Westernblots. B) Densitometrische Analyse der *p*-Src-Expression der adhären und suspendiert kultivierten Zelltransfektanten. Die Auswertung der Signalintensität der Proteinbanden für *p*-Src und GAPDH erfolgte densitometrisch wie beschrieben. Dargestellt sind die an den für GAPDH ermittelten Signalstärken normalisierten Mittelwerte der relativen Signalintensitäten für die *p*-Src-Proteinbanden, indem die Signalintensität in den TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten auf „1“ gesetzt wurde ($n=5$, \pm S.D.).

4.3. Darstellung der PKB/Akt-Kinase-Expression und Aktivierung mittels Westernblot-Analyse

Neben den bereits beschriebenen Untersuchungen zur FAK und Src-Kinase wurde zudem die Expression und Aktivierung der PKB/Akt-Kinase mittels Westernblot-Analyse nachgewiesen. Dies erfolgte mit Hilfe eines

Antikörpers, der entweder gegen *PKB/Akt*-Kinase oder die phosphorylierte aktivierte Form der *PKB/Akt*-Kinase gerichtet war. Dazu wurden, wie bereits in den vorangehenden Kapiteln beschrieben, Zelltransfektanten entweder adhären oder suspendiert in DMEM kultiviert und nach 48 h Zellysate gewonnen.

Hierbei wiesen die suspendiert kultivierten TMD-GpA-I-, TMD-GpA- und TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten keine wesentlichen Unterschiede in der *PKB/Akt*-Expression auf. Im Gegensatz dazu zeigten TMD-GpA-I-Zelltransfektanten die höchsten Expressionslevel für *PKB/Akt*-Kinase in den adhären kultivierten Zellen. Die *PKB/Akt*-Expression der TMD-GpA-I-Zelltransfektanten war hierbei gegenüber TMD-GpA-Zelltransfektanten 1,3-fach und gegenüber TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten ca. 1,8-fach erhöht. Die normalisierte *PKB/Akt*-Expressionshöhe der TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten wurde wie zuvor gleich „1“ gesetzt (Abb. 25).

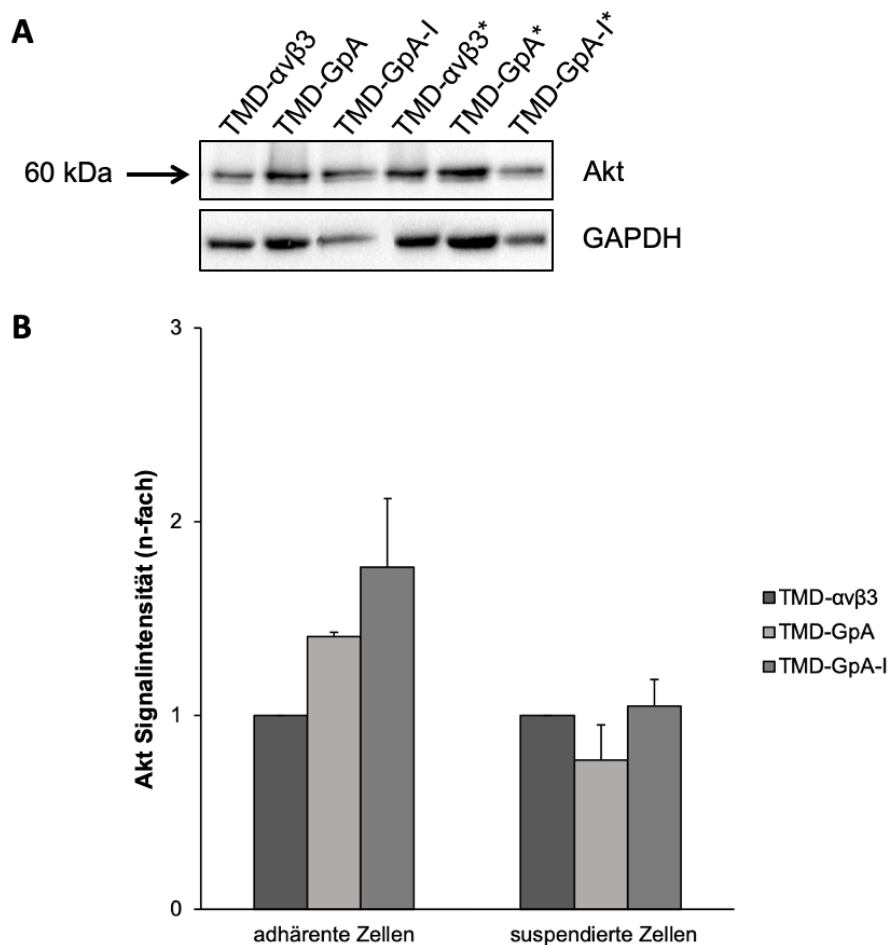


Abbildung 25: Nachweis der *PKB/Akt*-Kinase-Expression in Abhängigkeit von der Expression verschieden aktiver Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Varianten mittels Westernblot-Analyse

A) *PKB/Akt*-Detektion mittels Westernblot-Analyse. Die Präparation der Zellysate von adhären und suspendiert (*) kultivierten OV-MZ-6-Zelltransfektanten und die Westernblot-Analyse wurden wie unter Kap. II.2.2.8. beschrieben durchgeführt. Abgebildet ist ein typisches und repräsentatives Bild eines Westernblots. B) Densitometrische Analyse der *PKB/Akt*-Expression der adhären und suspendiert kultivierten Zellen. Die Auswertung der Signalintensität der Proteinbanden für *PKB/Akt* und GAPDH erfolgte densitometrisch wie beschrieben. Dargestellt sind die an den für GAPDH ermittelten Signalstärken normalisierten Mittelwerte der relativen Signalintensitäten für die *PKB/Akt*-Proteinbanden, indem die Signalintensität in den TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten auf „1“ gesetzt wurde ($n=2, \pm$ S.D.).

Hinsichtlich der *PKB/Akt*-Kinase-Aktivierung wiesen auch in diesem Fall TMD-GpA-I-Zelltransfektanten sowohl nach adhärenter als auch nach suspendierter Kultivierung die höchsten *PKB/Akt*-Aktivierungslevel auf.

Unter den suspendiert kultivierten Zellen wiesen TMD-GpA-I-Zelltransfektanten eine 1,5-fach höhere *PKB/Akt*-Aktivierung als TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten und eine 1,4-fach höhere Aktivierung als TMD-GpA-Zelltransfektanten auf. Adhären kultivierte Zellen, die TMD-GpA-I enthielten, zeigten hierbei 3,7-fach erhöhte Aktivierungslevel für *PKB/Akt*-Kinase als TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten und 2,8-fach erhöhte Aktivierungslevel im Vergleich zu TMD-GpA-Zelltransfektanten. TMD-GpA-Zelltransfektanten wiesen hierbei etwa 1,3-fach höhere Expressionslevel als TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten auf. Die nach Normalisierung an GAPDH erhaltene Signalintensität für *p-Akt* in den TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten wurde wie in den vorhergehenden Untersuchungen gleich „1“ gesetzt (Abb. 26).

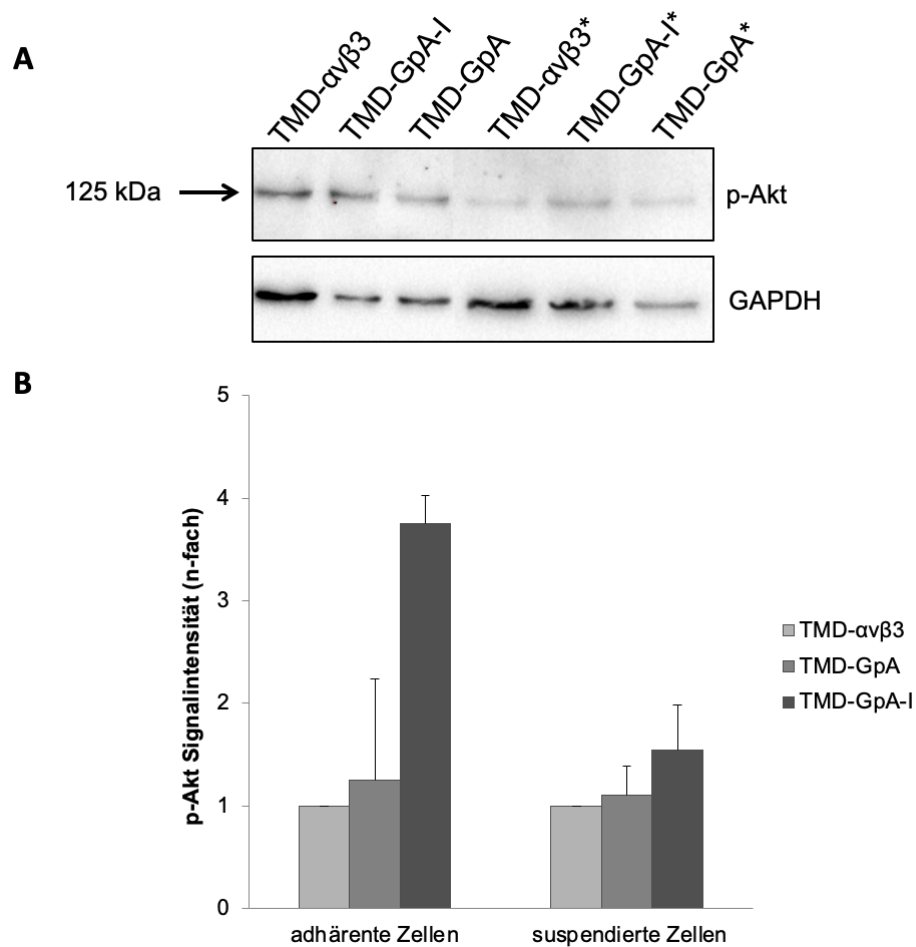


Abbildung 26: Nachweis der *p*-Akt-Kinase-Expression in Abhängigkeit von der Expression verschieden aktiver Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ TMD-Varianten mittels Westernblot-Analyse

A) *p*-Akt-Detektion mittels Westernblot-Analyse. Die Präparation der Zellysate von adhären und suspendiert (*) kultivierten OV-MZ-6-Zelltransfektanten und die Westernblot-Analyse wurden wie unter Kap. II.2.2.7. beschrieben durchgeführt. Abgebildet ist ein typisches und repräsentatives Bild eines Westernblots. B) Densitometrische Analyse der *p*-Akt-Expression der adhären und suspendiert kultivierten Zellen. Die Auswertung der Signalintensität der Proteinbanden für *p*-Akt und GAPDH erfolgte densitometrisch wie beschrieben. Dargestellt sind die an den für GAPDH ermittelten Signalstärken normalisierten Mittelwerte der relativen Signalintensitäten für die *p*-Akt-Proteinbanden, indem die Signalintensität in den TMD- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Zelltransfektanten auf „1“ gesetzt wurde ($n=4 \pm \text{S.D.}$).

IV. DISKUSSION

Das Ovarialkarzinom stellt weltweit die gynäkologische Tumorentität mit der höchsten Mortalität dar (Siegel et al. 2020). Eine der Hauptursachen hierfür ist sicher die hohe Rezidivrate trotz initial gutem Ansprechen auf die verabreichten Chemotherapeutika.

Eine suffiziente Behandlung wird insbesondere auch durch die Art der Metastasierung des Ovarialkarzinoms erschwert, welche sich grundlegend von der anderer epithelialer Tumore unterscheidet. Charakteristisch hierbei ist (insbesondere in frühen Stadien) die lokale intraabdominelle Ausbreitung der Tumorzellen sowie die Invasion der pelvinen und intraabdominellen Organe ohne nennenswerte Beteiligung des Gefäßsystems (Naora und Montell 2005, Shield et al. 2009). Dies geschieht zum einen durch die direkte Ausbreitung auf benachbarte Organe sowie zum anderen durch die Verteilung abgelöster Tumorzellen in der gesamten Peritonealhöhle über die physiologische Peritonealflüssigkeit. In späteren Stadien stellt der Nachweis von Aszites ein Charakteristikum dieser peritonealen „Aussaat“ dar (Naora und Montell 2005).

Die Fähigkeit der Ovarialkarzinomzellen, sich von ihrem Ursprungsort abzulösen, frei flottierend in der Peritonealflüssigkeit und im Aszites zu überleben und an anderer Stelle erneut zu adhären ist die Grundlage dieses Metastasierungsmusters (Shield et al. 2009). Die hierfür notwendigen Zell-Zell- sowie Zell-EZM-Interaktionen werden insbesondere durch Integrine vermittelt. Diese Zelladhäsionsrezeptoren modulieren Proliferation, Überleben, Migration und Invasion aber auch die Angiogenese von Tumorzellen und nehmen eine wichtige Rolle bei der Chemotherapieresistenz ein (Guo und Giancotti 2004, Desgrosellier et al. 2009).

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass Integrin $\alpha\beta 3$ eine verstärkte Expression auf vielen verschiedenen Tumorzellarten aufweist (Kitajiri et al. 2002). Wang et al. untersuchten die Expression dieses Integrins auf humanen Ovarialkarzinomzellen und fanden eine signifikant höhere Expression im Vergleich zu Borderline- oder gutartigen

Ovarialtumorzellen. Zudem zeigten Ovarialkarzinomzellen von Patientinnen mit abdominell metastasierten Tumoren eine signifikant verstärkte Expression der Integrinuntereinheit α_v . Diese Ergebnisse legen nahe, dass Integrin $\alpha_v\beta_3$ eine wichtige Rolle bei der peritonealen Aussaat von Ovarialkarzinomzellen zukommt (Wang et al. 2011).

Integrine sind durch Interaktion mit der EZM in der Lage, das Überleben normaler epithelialer Zellen maßgeblich zu beeinflussen, indem sie durch Konformationsänderungen die intrazelluläre Signaltransduktion aktivieren und Apoptose verhindern (Giancotti 2000). Der Verlust dieser Zelladhäsion an die EZM führt physiologischerweise zu Anoikis. Dieser Mechanismus stellt eine wichtige Sicherheitsfunktion für den Organismus dar, da somit eine Absiedelung abgelöster Zellen an neuen Lokalisationen unterbunden und ein dysplastisches Wachstum verhindert wird. Die physiologische Relevanz von Anoikis wird insbesondere durch die Tatsache unterstrichen, dass Tumorzellen in der Regel resistent gegen Anoikis sind und somit „verankerungsunabhängig“ und ohne Kontakt zur EZM überleben und proliferieren können (Chiarugi und Giannoni 2008).

Eine mögliche Strategie der Anoikisresistenz von Tumorzellen scheint die konstitutive Aktivierung Integrin-abhängiger Signaltransduktionswege zu sein (Dolinschek et al. 2021). Integrin $\alpha_v\beta_3$ stellt deshalb ein interessantes Ziel für weiterführende Untersuchungen in Bezug auf das „verankerungsunabhängige“ Überleben von Ovarialkarzinomzellen dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *in vitro* die Auswirkungen der Expression von Integrin $\alpha_v\beta_3$ und seines Aktivierungsstatus auf humane in Suspensionskultur gehaltene Ovarialkarzinomzellen im Hinblick auf das Tumorzellüberleben durch die Aktivierung pro- und antiapoptotischer Signalwege untersucht.

1. Die Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Aktivierung in humanen Ovarialkarzinomzellen und ihre Auswirkung auf das verankerungsunabhängige Zellüberleben

Die Beobachtungen, dass suspendiert kultivierte TMD-GpA-I-Zelltransfektanten im Vergleich zu TMD-GpA-Zelltransfektanten ein

verstärktes Zellüberleben und ein verzögertes Auftreten von Anoikis aufwiesen, legten nahe, dass Ovarialkarzinomzellen, die konstitutiv aktives Integrin $\alpha\beta3$ exprimieren, nach Verlust ihrer Verankerung an die EZM wie *in vivo* im Zuge der Metastasierung über die Disseminierung der Tumorzellen im Aszites, in der Lage sind zu überleben. Dies bestätigte sich unter anderem durch eine deutlich geringere Caspase-3-Aktivierung der TMD-GpA-I-Zelltransfektanten im Vergleich zu TMD- $\alpha\beta3$ - und insbesondere TMD-GpA-Zelltransfektanten und durch den deutlich höheren Anteil vitaler Zellen der TMD-GpA-I-Zelltransfektanten in den Annexin-Apoptoseassays insbesondere nach Kultivierung in Suspension mit Aszites.

Diese Beobachtungen widersprechen dem bereits in vielen vorherigen Arbeiten beschriebenen Prozess des Integrin-vermittelten Zelltods (IMD), der in verankerungsabhängigen epithelialen Zellen durch unligierte Integrine ausgelöst wird (Reddig und Juliano 2005). Andererseits könnten in transformierten malignen Tumorzellen sowohl eine Vielzahl anderer Onkogene als auch bislang noch nicht vollständig untersuchte Vorgänge, wie somatische Mutationen der Integrin-TMD und der zytoplasmatischen Regionen, eine konstitutive Integrin-Aktivierung bewirken. Dies wiederum wird für verankerungsunabhängiges Zellüberleben, Aktivierung antiapoptotischer Signalkaskaden sowie für Anoikisresistenz, vermittelt durch unligierte Integrine, verantwortlich gemacht (Tadokoro et al. 2003, Shattil et al. 2010, Anthis und Campbell 2011) und spiegelt das von uns beobachtete verlängerte verankerungsunabhängige Zellüberleben der TMD-GpA-I-Zelltransfektante wider.

Auch in anderen Tumorzellarten konnten im Rahmen der Tumorprogression konstitutiv aktive Integrine detektiert werden. Beispielsweise benötigten Brustkrebszellen für die hämatogene Aussaat und die ossäre Metastasierung eine vollständige Integrin $\alpha\beta3$ -Aktivierung (Takayama et al. 2005). Zudem zeigten Prostatakarzinomzellen nach dem Einbringen einer $\beta3$ -Integrin-Mutante, die eine Punktmutation (D723R) enthielt, die wiederum mutmaßlich zu einer Unterbrechung einer Salzbrücke zwischen den zytoplasmatischen Domänen der α - und β -Untereinheit führte, ein konstitutiv aktives Integrin $\alpha\beta3$, das seinerseits zu einer konstitutiven FAK-Aktivierung führte (Hughes et al. 1995). Des Weiteren konnte Integrin $\alpha\beta3$

in Brustkrebszellen in einem inaktivierten, wenig aktivierten und hoch aktivierten Zustand, auch in Abwesenheit eines exogenen EZM Liganden, nachgewiesen werden (Rolli et al. 2003).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben einen deutlich höheren Anteil vitaler Zellen nach Kultivierung in Suspension mit Aszites als in DMEM. Am deutlichsten zeigte sich dies für die TMD-GpA- und TMD- $\alpha\beta 3$ -Zelltransfektanten, die beinahe eine Verdopplung des Anteils vitaler Zellen im Vergleich zur Kultivierung in Suspension mit DMEM aufwiesen. Den höchsten Anteil vitaler Zellen wiesen wie bereits in DMEM auch in Aszites die TMD-GpA-I-Zelltransfektanten auf, den niedrigsten die TMD-GpA-Zelltransfektanten. Zudem fiel auf, dass alle drei Zelltransfektanten eine deutlich niedrigere Apoptoserate in Aszites als in DMEM zeigten.

Dieser deutlich höhere „Überlebensvorteil“ humaner OV-MZ-6 Zellen in Aszites *in vitro* könnte insbesondere durch die einzigartige Zusammensetzung dieser speziellen Flüssigkeit erklärt werden. Die Entstehung von malignem Aszites ist auf ein Zusammenspiel multipler Faktoren zurückzuführen. Zu diesen gehören unter anderem die Obstruktion von Lymphgefäßen, eine erhöhte vaskuläre Permeabilität und die Sekretion von Tumor-, Stroma- und Immunzellen (Tan et al. 2006). Maligner Aszites ist demzufolge eine Zusammensetzung verschiedenster Überlebensfaktoren, unter ihnen Chemokine, Wachstumsfaktoren und Zytokine sowie Fragmente der EZM. Die durch diese Faktoren ausgelösten zellulären Mechanismen tragen einzeln oder gemeinsam zum Wachstum der Tumorzellen bei (Mills et al. 1988, Mills et al. 1990, Ahmed et al. 2003, Ahmed et al. 2005).

In den Annexin-Apoptoseassays zeigte sich jedoch auch eine höhere Nekroserate der in Suspension mit Aszites kultivierten OV-MZ-6-Zellen, wobei TMD-GpA- die höchsten und TMD-GpA-I-Zelltransfektanten die niedrigsten Nekroseraten zeigten. Die generell hohe Nekroserate mag einerseits auf ein methodisches Problem hinweisen. Die deutlich höhere Nekroserate in Aszites als in DMEM (bei dennoch auch deutlich höherem Anteil vitaler Tumorzellen) könnte andererseits auch durch die besondere Zusammensetzung des Aszites erklärbar sein. Im Gegensatz zu einem Zellkulturmedium stellt Aszites ein individuelles Reservoir verschiedenster

immunologischer Faktoren, wie zum Beispiel Zytokine (Matte et al. 2012) oder auch das Komplementsystem (Runyon et al. 1985, Mal et al. 1991, Alexandrakis et al. 2001) dar. Das Komplementsystem fungiert als eine der Hauptkomponenten des angeborenen Immunsystems (Walport 2001, Bjorge et al. 2005). Nach Aktivierung durch proteolytische Spaltung oder Bindung an bereits aktivierte Komponenten kommt es zur Freisetzung chemotaktischer Faktoren, Opsonierung von Antigenen und insbesondere zur Bildung des „Membran-Angriffs-Komplexes“ (MAK) (Walport 2001). Ein hoher Anteil an Komplementfaktoren in dem im vorliegenden Fall verwendeten Aszites könnte somit ebenfalls eine Erklärung für die höhere Nekroserate sein.

Außerdem fiel bei den in Suspension kultivierten Ovarialkarzinomzellen auf, dass sie als Funktion ihres Integrin $\alpha\beta 3$ -Expressions- und Aktivierungsstatus eine unterschiedliche Tendenz zur Ausbildung Sphäroid-ähnlicher Zellcluster aufwiesen.

Entgegen unserer Erwartungen bildeten TMD-GpA-I-Zelltransfektanten die kleinsten und TMD-GpA-Zelltransfektanten die größten Cluster. Dies war insbesondere deshalb überraschend, da wir von einem Überlebensvorteil der Sphäroid-ähnlichen Zellcluster gegenüber Einzelzellen durch Zell-Zell-Kontakte ausgegangen waren, die den Verlust der Zell-EZM-Adhäsion ausgleichen könnten. Möglicherweise überwog hierbei jedoch das Vorhandensein des konstitutiv aktiven Integrin $\alpha\beta 3$ die Notwendigkeit einer verstärkten Zell-Zell-Adhäsion. Im Gegensatz dazu schien in TMD-GpA-Zelltransfektanten die Bildung großer Zellcluster ein wesentlicher Mechanismus zur Verhinderung von Anoikis (Dolinschek et al. 2021).

Kim et al. haben bereits gezeigt, dass das Ausmaß der N-Cadherin-Expression maßgeblich den Grad der Zelladhärenz und -dichte in Sphäroiden einer Fibroblast-Zelllinie beeinflusst (Kim et al. 2005).

Eine weiterführende Untersuchung könnte deshalb sein, die Cadherin-Expression der TMD-GpA- und TMD-GpA-I-Zelltransfektanten zu vergleichen und zu erforschen, ob die verminderte Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivität der TMD-GpA-Zelltransfektanten gegebenenfalls zu einer verstärkten Cadherin-Expression der Zellen führt.

2. Effekte einer konstitutiven Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierung auf das Überleben und die Anoikisresistenz von Ovarialkarzinomzellen als Funktion der Aktivierung intrazellulärer Integrin-Signalwege

Um zu untersuchen, inwieweit die konstitutive Signaltransduktions-Kompetenz von Integrin $\alpha\beta 3$ im hier dargestellten Zellmodell mit dem gesteigerten Zellüberleben unter verankerungsunabhängigen Kultivierungsbedingungen einherging, wurden die Signalmoleküle wie *FAK*, *Src* und *PKB/Akt* im Integrin-vermittelten Signalweg auf ihre Expression und Aktivierung hin untersucht.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben ausschließlich für suspendiert kultivierte TMD-GpA-I-Zelltransfektanten eine deutlich erhöhte Phosphorylierung und somit Aktivierung des Signalmoleküls *FAK*. Eine erhöhte *FAK*-Aktivierung wiederum geht durch die Verhinderung von Anoikis bekanntermaßen mit einer erhöhten Tumoraggressivität einher (Golubovskaya et al. 2002, Beviglia et al. 2003).

Desgrosellier et al. hatten in einer früheren Arbeit bereits gezeigt, dass Integrin $\alpha\beta 3$ „verankerungsunabhängiges“ Wachstum humaner Pankreaskarzinomzellen fördert und somit zur Tumorprogression und Metastasierung beiträgt. Dies erfolgte überraschenderweise durch die Integrin $\alpha\beta 3$ -abhängige direkte Rekrutierung und Aktivierung der *Src*-Kinase, jedoch im Gegensatz zu unseren Daten unabhängig von der *FAK*-Aktivierung (Desgrosellier et al. 2009).

Allerdings wurde von anderen Gruppen bereits gezeigt, dass eine kontinuierliche *Src*-Aktivierung zu einer konstitutiven *FAK*-Aktivierung führt. Dies resultiert in einer Rekrutierung von *PI3K* und fördert sodann die *PKB/Akt*-Aktivierung, was wiederum zu einer Phosphorylierung des proapoptotischen Faktors *Bad*, der Inaktivierung von Caspasen und somit zur Verhinderung von Anoikis führt (Avizienyte und Frame 2005, Bouchard et al. 2007). Analog dazu und passend zu den bereits publizierten Untersuchungen von Desgrosellier et al. zeigten allein die suspendiert kultivierten TMD-GpA-I-Zelltransfektanten ebenfalls eine erhöhte Phosphorylierung und Aktivierung des Signalmoleküls *Src*. *Src* kann über

einen positiven Rückkopplungsmechanismus den EGF-Rezeptor auch in Abwesenheit eines Liganden aktivieren, was wiederum zur Aktivierung des *MAPK*- und *PKB/Akt*-Kinase-Signalwegs führt (Byzova et al. 2000, Windham et al. 2002, Xia et al. 2004, Guidetti et al. 2015, Roskoski 2015). Dass auch der *PKB/Akt*-Kinase bei der Anoikisresistenz eine entscheidende Rolle zukommt, wurde bereits an epithelialen Zellen durch Stimulierung der Bcl-2-Transkription gezeigt (Khwaja et al. 1997, Gauthier et al. 2001, Gauthier et al. 2001). In Analogie hierzu konnte auch im Rahmen unserer Untersuchungen eine verstärkte Aktivierung der *PKB/Akt*-Kinase der in Suspension kultivierten TMD-GpA-I-Zelltransfektanten nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein konstitutiv aktiviertes Integrin $\alpha\beta3$ (im Zellmodell dieser Arbeit repräsentiert durch die TMD-GpA-I-Zelltransfektante) auch im nicht adhärenen Zustand die intrazellulären Signalmoleküle *Src*-Kinase und *PKB/Akt*-Kinase aktiviert und somit Anoikis umgehen kann. Gemäß unserer Untersuchungen wird diese Signalkaskade jedoch nicht, wie bei Desgrosellier et al. beschrieben (Desgrosellier et al. 2009), durch *FAK*-unabhängige Rekrutierung und Aktivierung ausgelöst, da in der beschriebenen Untersuchung auch die Aktivierung von *FAK* zu *p-FAK* deutlich verstärkt war.

Hier könnten weiterführende Untersuchungen, insbesondere immunzytofluoreszenz Darstellungen der Kollokalisierung von *p-Src*, *p-FAK* und Integrin $\alpha\beta3$ Aufschluss geben.

Wie erwartet wurden für die TMD-GpA-Zelltransfektante, die das Integrin $\alpha\beta3$ durch die starke Assoziation der TMD in einem intermediären Aktivierungszustand ohne Signaltransduktions-Kompetenz darstellt (Muller et al. 2013), nur niedrige Expressionslevel für *p-FAK*, *p-Src* und *p-Akt* beobachtet.

Außerdem zeigten sich sowohl nach adhärenter als auch nach suspendierter Kultivierung bereits die Gesamtexpressionen von *FAK*, *Src*-Kinase und *PKB/Akt*-Kinase in den TMD-GpA-I-Zelltransfektanten im Vergleich zu Zellen, die TMD-GpA enthielten, erhöht. Dies ist möglicherweise ebenfalls auf die konstitutive Aktivierung des Integrins $\alpha\beta3$

in den TMD-GpA-I-Zelltransfektanten zurückzuführen. Bekannterweise führt die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade über *FAK* über die Phosphorylierung der *PKB/Akt*-Kinase letztendlich zur Phosphorylierung und Inhibierung von *IκB*, der inhibitorischen Untereinheit von *NFκB* (Romashkova und Makarov 1999). *NFκB* wiederum stellt einen wichtigen Transkriptionsfaktor dar, der die Expression einer Vielzahl von Genen, welche die Immunantwort sowie die Zellproliferation beeinflussen, reguliert (Siebenlist et al. 1994). Dementsprechend führt eine konstitutive Aktivierung von Integrin $\alpha\beta3$ möglicherweise zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und somit zu einer veränderten Genexpression der Zelle, was wiederum die erhöhten Expressionslevel von *FAK*, *Src*-Kinase und *PKB/Akt*-Kinase erklären könnte.

In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass die Aktivierung von *PI3K* und ihrer Effektor-Kinase *Akt*, maßgeblich zur Verhinderung der Apoptose in humanen Ovarialkarzinomzellen beiträgt (Liu et al. 1998). Lane et al. untersuchten daraufhin die Auswirkungen des *PI3K/Akt*-Signalwegs auf die überlebensfördernde Eigenschaft von Aszites auf humane Ovarialkarzinomzellen. Hierbei führte die Inkubation von CaOV3-Zellen mit malignem COV2 Aszites zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung und somit Aktivierung von *Akt* (Lane et al. 2007). Dies könnte ebenfalls eine mögliche Erklärung für den höheren Anteil vitaler Zellen nach Kultivierung in Suspension mit Aszites im Vergleich zu DMEM in den Versuchen der hier vorliegenden Arbeit sein. Da die TMD-GpA-I-Zelltransfektante zudem bereits nach Kultivierung in Suspension mit DMEM deutlich erhöhte Expressionslevel für *p-Akt* zeigte, könnte ein konstitutiv aktives Integrin $\alpha\beta3$ synergistisch mit der Auswirkung von Aszites auf die Tumorzellen zu einer noch ausgeprägteren Phosphorylierung von *Akt* führen, was den deutlichen Überlebensvorteil von TMD-GpA-I- im Vergleich zur TMD-GpA-Zelltransfektante erklären könnte.

3. Integrin $\alpha\beta3$ als therapeutische Zielstruktur

Integrin $\alpha\beta3$ stellt als einer der Hauptmodulatoren der Angiogenese und Marker für die Tumorprogression bei vielen Tumorarten (Brooks et al. 1994) eine wichtige Zielstruktur für die Antitumor-Therapie dar. Vorangehende

Studien haben gezeigt, dass beim Ovarialkarzinom die α -Untereinheit auf 100% (von 30 untersuchten Proben) der Ovarialtumoren und auf 96% (von 121 untersuchten Proben) der aus Flüssigkeit isolierten Tumorzellen exprimiert wird (Davidson et al. 2003). Integrin $\alpha\beta$ 3 ist zudem für die Adhäsion der Ovarialkarzinomzellen an die EZM (Carreiras et al. 2002) sowie für die Migration der Tumorzellen (Leroy-Dudal et al. 2005) verantwortlich. Die Tatsache, dass Integrin $\alpha\beta$ 3 auf normalem Gewebe nur in sehr geringem Umfang exprimiert wird, macht es umso mehr zu einem attraktiven medikamentösen Angriffspunkt. Hierzu zählen beispielsweise minimale Expressionslevel auf glatten Muskelzellen des Uterus, der Gefäße und des Intestinaltrakts (Brem et al. 1994). Die Blockierung von Integrin $\alpha\beta$ 3 durch monoklonale Antikörper führte zu einer Hemmung der Adhäsion, Migration und Mobilität von Ovarialkarzinomzellen (Beck et al. 2005, Leroy-Dudal et al. 2005).

David Cheresh und seine Mitarbeiter haben bereits vor vielen Jahren den Antikörper *LM609* entwickelt, wodurch die Charakterisierung von Integrin $\alpha\beta$ 3 als Adhäsionsrezeptor auf Endothel- und Melanomzellen erst ermöglicht wurde (Cheresh 1987). Eine humanisierte Version dieses Antikörpers stellte *Vitaxin (MEDI-523)*, Applied Molecular Evolution, San Diego, CA) dar, welches eine höhere Rezeptoraffinität bei gleichbleibender Epitop-Spezifität und reduzierter Antigenität bot (Rader et al. 1998). *Vitaxin* wurde in klinischen Phase I- und Phase II-Studien fortgeschrittener, therapierefraktärer solider Tumoren getestet (Patel et al. 2001, Posey et al. 2001). Hierbei zeigten sich jedoch keine objektivierbaren Ansprechraten, was am ehesten auf eine zu niedrige Affinität und Stabilität des Antikörpers *in vivo* zurückzuführen war (Millard et al. 2011). Um diesem Problem zu begegnen wurde daraufhin der humanisierte monoklonale Antikörper *Abegrin (Etaracizumab)*, MEDI-522, MedImmune, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA) entwickelt (Cai et al. 2006), welcher die Integrin $\alpha\beta$ 3-vermittelte Bindung an VN und Fibrinogen 7,2-fach stärker verhinderte als die Vorgänger *LM609* und *Vitaxin* (Millard et al. 2011). Mit *Abegrin* als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapeutika zur Behandlung verschiedenster Tumore, rheumatoider Arthritis und Psoriasis wurden bereits klinische Studien der Phase I und II abgeschlossen. Diese zeigten

eine gute Verträglichkeit des Antikörpers, jedoch keine Auswirkungen auf die Angiogenese oder die Immunmodulation (Hersey et al. 2010, Moschos et al. 2010, Millard et al. 2011, Alday-Parejo et al. 2019).

Weitere Antikörper wie *Intetumumab (CNT095)* oder *Abituzumab (EMD 525797/DI17E6)*, die gegen die α v-Untereinheit des Integrins gerichtet sind, erreichten ebenfalls klinische Phase I- und II-Studien, sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Chemotherapeutika oder anderen zielgerichteten Therapien (Alday-Parejo et al. 2019). Diese Studien untersuchten die Wirksamkeit der Antikörper in einer Vielzahl solider Tumoren wie Prostatakarzinom, kolorektales Karzinom, malignes Melanom und Sarkom (O'Day et al. 2012, Wirth et al. 2014).

Ein weiterer therapeutischer Ansatz war die Entwicklung Peptid-basierter Integrin α v β 3-Antagonisten. Wie bereits beschrieben, bindet Integrin α v β 3 endogene Liganden der EZM, die das RGD-Motiv enthalten, wie beispielsweise VN oder Fibronektin (Eliceiri und Cheresch 1999). Besondere Aufmerksamkeit kam daher speziell dem zyklischen Pentapeptid *Cilengitide (EMD 121974, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)* zu, welches die RGD-Sequenz enthält und einen potenten Inhibitor von Integrin α v β 3 und Integrin α v β 5 darstellt (Nisato et al. 2003). *Cilengitide* führte *in vitro* unter anderem an Gliom-, Mammakarzinom- und Melanomzellen zu einer deutlichen Reduzierung des Tumorwachstums und des Überlebens von Tumorzellen, indem es die Interaktion von Integrin α v β 3 mit der EZM verhinderte (Millard et al. 2011). Der Wirkmechanismus von *Cilengitide* beruht hierbei am ehesten auf einer Hemmung des *FAK-Src-PKB/Akt*- und des *Erk*-Signalwegs sowie auf einer Verminderung der VEGF-Stimulation in Tumorzellen (Oliveira-Ferrer et al. 2008). Bedauerlicherweise konnten klinische Phase III-Studien, die die Wirkung von *Cilengitide* in Kombination mit Chemotherapie, anderen zielgerichteten Therapien und Strahlentherapie zur Behandlung einer Vielzahl von Karzinomen, insbesondere zur Behandlung des Glioblastoms, untersuchten, diese präklinische, *in vitro* nachgewiesene antitumorale Aktivität nicht bestätigen und zeigten keinen klinischen Vorteil dieser Therapie (Chinot 2014, Stupp et al. 2014, Su et al. 2016, Weller et al. 2016, Wick et al. 2016).

Diese unbefriedigenden Ergebnisse werfen die Frage auf, was die Ursache

für den ausbleibenden Therapiebenefit der oben beschriebenen Medikamente sein könnte. Alday-Parejo et al. gaben zu bedenken, dass die bislang entwickelten Integrin-Inhibitoren ausschließlich auf die Blockierung der extrazellulären Integrindomänen abzielten, sei es durch eine hochaffine, kompetitive Blockade der Ligandenbindungsstelle (wie z. Bsp. durch *Cilengitide*) oder durch eine sterische Hinderung der Ligandenbindung (wie z. Bsp. durch Antikörper) (Tucker 2002, Kapp et al. 2013, Alday-Parejo et al. 2019). Integrine haben in ihrer Funktion als bidirektionale Signaltransduktionsmoleküle jedoch komplexe Eigenschaften. Diese sind zum Beispiel die Interaktion mit anderen Zelloberflächenrezeptoren, die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe und die Interaktion ihrer zytoplasmatischen Domäne mit Signalmolekülen zur Initiierung Integrin-vermittelter Signaltransduktionskaskaden (Tolomelli et al. 2017). Ein Problem könnte daher die Induzierung einer hochaktiven Konformation des Integrins durch hochaffine Integrin-Inhibitoren sein, also eine agonistische anstelle der angestrebten antagonistischen Wirkungsweise (Legler et al. 2001, Alghisi et al. 2009, Reynolds et al. 2009). Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese These, da Tumorzellen, welche konstitutiv aktives Integrin $\alpha\beta3$ exprimierten (TMD-GpA-I) selbst in Suspension und ohne Bindung an den endogenen Liganden VN eine deutlich erniedrigte Apoptoserate sowie eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege des Zellüberlebens zeigten, so dass eine Blockierung dieses Integrins mittels Antikörpern oder RGD-ähnlichen Peptiden, die lediglich gegen die RGD-Bindungsstelle gerichtet sind, im Falle von Anoikisresistenz durch die Expression konstitutiv aktiver Integrine keinen durchgreifenden Effekt erzielen kann. In diesem Zusammenhang wird über Ansätze zur Entwicklung allosterischer Integrin-Antagonisten nachgedacht, die in der Lage wären, das Integrin in einer inaktiven Konformation zu halten, z. Bsp. durch eine Interaktion mit den zytoplasmatischen Integrin-Domänen (Travis et al. 2003, Alday-Parejo et al. 2019).

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit liefern weitere Hinweise zur Erklärung der unerwartet schlechten Ansprechrate auf zielgerichtete Integrin-Inhibitoren. Wie bereits beschrieben, zeigten in Aszites suspendierte Ovarialkarzinomzellen deutlich höhere Raten vitaler Zellen als solche, die

in Suspension mit DMEM kultiviert wurden. Zudem lagen Ovarialkarzinomzellen, die in Aszites flottierten, deutlich häufiger in Zellaggregaten als in Einzelzellen vor. Die größte Tendenz zur Zellaggregation wiesen hierbei die TMD-GpA-Zelltransfektanten auf. Frühere Studien mit *in vitro* generierten Sphäroiden haben bereits gezeigt, dass diese einzigartige Zellformation, die keine Vaskularisierung aufweist, einen Dichtegradient für Metaboliten errichten kann, was dazu führt, dass Chemotherapeutika nicht die inneren Zellschichten erreichen können (Sutherland et al. 1970, Sutherland et al. 1971, Sutherland und Durand 1976, Kobayashi et al. 1993, Mueller-Klieser 1997, L'Esperance et al. 2008). Dies führt zu einem Schutz der Sphäroide vor Apoptose durch allgemein angewendete Standardchemotherapeutika wie z. Bsp. Paclitaxel (Makhija et al. 1999), was ebenfalls eine weitere Erklärung für die schlechte Wirksamkeit der Integrin $\alpha\beta 3$ -Inhibitoren sein könnte.

Um diesem Problem zu begegnen, wurden bereits Versuche mit intraperitonealen Therapieregimes initiiert. Diese Applikationsform führt zu höheren lokoregionären Wirkstoffkonzentrationen mit niedrigeren systemischen Nebenwirkungen und ist unabhängig von der Tumolvaskularisation. Jedoch kam es hierbei zu einer hohen Rate an Infektionen, die durch den Katheter, der zur Medikamentenapplikation benötigt wurde, hervorgerufen wurden (de Bree et al. 2006).

Zuletzt stellt maligner Aszites ein einzigartiges Reservoir an Wachstumsfaktoren (Mills et al. 1988, Mills et al. 1990), Zytokinen (Abdollahi et al. 2003) und EZM-Faktoren (Ahmed et al. 2005) dar. Lane et al. haben gezeigt, dass die Inkubation mit malignem Aszites signifikant die TRAIL-induzierte Apoptose humaner Ovarialkarzinomzellen *in vitro* unterbinden kann (Lane et al. 2007). Diese „überlebensfördernde“ Eigenschaft von Aszites könnte auch den Effekt einer selektiven Integrin $\alpha\beta 3$ -Inhibition reduzieren. Eine Tumormikroumgebung, die EZM-Faktoren (Ahmed et al. 2005) enthält und so gegebenenfalls die Ligandierung von Integrin $\alpha\beta 3$ mit endogenen Liganden fördert, würde dadurch auch drastisch die Wirksamkeit der RGD-basierten Antagonisten vermindern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben somit einmal mehr verdeutlicht, wie wichtig eine noch genauere Erforschung der multifaktoriellen Integrin-

vermittelten Auswirkungen auf humane Ovarialkarzinomzellen ist. Nur durch bessere Einsicht in die komplexen Zusammenhänge zwischen Integrin-Aktivierung und Signaltransduktion sowie die Identifizierung zusätzlicher Faktoren, die diese Aktivierung beeinflussen, kann es gelingen, neue Angriffspunkte zu erkennen und wirksame Medikamente zur Bekämpfung dieser fatalen Erkrankung zu entwickeln.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Integrine sind heterodimere Zelloberflächenrezeptoren, die sich aus nicht-kovalent verbundenen α - und β -Untereinheiten zusammensetzen. Über die Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix vermitteln sie die Zelladhäsion und initiieren nach Anbindung spezifischer zytoplasmatischer Signalmoleküle bidirektionale Signaltransduktionen („outside-in“ und „inside-out“).

Im Rahmen der Integrinaktivierung kommt es hierbei zu Konformationsänderungen der Integrin-Transmembrandomänen und der zytoplasmatischen Domänen, was die Ligandenbindungsaffinität sowie die Fähigkeit zur Signaltransduktion maßgeblich beeinflusst. Im inaktivierten Zustand liegen die Extrazellulärdomänen des Integrins in einer zur Zellmembran hin gebogenen Konformation mit niedriger Ligandenbindungsaffinität vor. Die Transmembrandomänen-Konformation weist hierbei eine große Ähnlichkeit zu der des auf Erythrozyten vorkommenden Proteins Glycophorin A auf, welches das Dimerisierungsmotiv GxxxG enthält. Diese Glycophorin A-ähnliche Konformation führt zu einem niedrigaffinen, inaktiven Integrin, was nahelegt, dass die Integrin-Transmembrandomänen-Heterodimerisierung auf eine Glycophorin A-ähnliche Weise vermittelt wird. Durch Bindung intrazellulärer Proteine wie Talin an die zytoplasmatischen Domänen des Integrins kommt es zur Aufrichtung der Extrazellulärdomänen und zur Dissoziation der Transmembrandomänen und der zytoplasmatischen Domänen. Dies führt zu einem aktivierten Konformationszustand mit hoher Ligandenbindungsaffinität und Fähigkeit zur Signaltransduktion.

Über ihre Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix tragen Integrine auch maßgeblich zum Überleben epithelialer verankerungsabhängiger Zellen bei. Dies geschieht über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden und involviert die intrazellulären Signaltransduktionsmoleküle *FAK*, *ILK*, *Src*, *PI3K/Akt* und *ERK/MAPK*. Verlieren normale epitheliale Zellen diesen Kontakt zur extrazellulären Matrix, wird eine spezielle Form der Apoptose, Anoikis genannt, eingeleitet,

ein Mechanismus, der die Anhaftung abgelöster epithelialer Zellen an inadäquate extrazelluläre Matrices verhindert. Im Gegensatz dazu sind Tumorzellen meist resistent gegen Anoikis. Dies stellt eine der wichtigsten Eigenschaften metastatischer Tumorzellen dar, da so erst ein verankerungsunabhängiges Wachstum dieser Zellen ermöglicht wird.

Bei der Progression des Ovarialkarzinoms kommt der Anoikis-Resistenz eine fundamentale Rolle zu. Vom Primärtumor abgelöste Zellen werden durch die physiologische Bewegung der Peritonealflüssigkeit in der Abdominalhöhle verteilt, um an anderer Stelle erneut an das Peritoneum zu adhären und dieses zu infiltrieren, ein Prozess, der insbesondere auch durch die Bildung von Aszites gekennzeichnet ist.

Eines der am besten untersuchten Integrine ist das Integrin $\alpha\beta3$. Es wird unter anderem im Zuge der Angiogenese auf Endothelzellen exprimiert und stellt einen wichtigen Angiogenesemarker dar. Das Integrin $\alpha\beta3$ wird im Zuge der Progression des Ovarialkarzinoms verstärkt exprimiert, was mit einer peritonealen Metastasierung einhergeht.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Apoptoseverhalten von in Zellkulturmedium oder Aszites suspendiert kultivierten humanen Ovarialkarzinomzellen (OV-MZ-6) als Funktion der Integrin $\alpha\beta3$ -Aktivierung und der daraus resultierenden Signaltransduktion untersucht werden.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass konstitutiv aktives Integrin $\alpha\beta3$, welches dissoziierte Transmembrandomänen enthält, im Vergleich zu Integrin $\alpha\beta3$ mit dimerisierten Transmembrandomänen und ohne Fähigkeit zur Signaltransduktion Anoikis verhindert, indem es die überlebensfördernden Signaltransduktionsmoleküle *FAK*, *Src*-Kinase und *PKB/Akt*-Kinase aktiviert und somit die Apoptose-Induktion durch Caspase-3 supprimiert. Zudem führte die Inkubation mit Aszites ebenfalls zu einer deutlichen Anoikisresistenz von Zelltransfektanten, die dieses konstitutiv aktive Integrin $\alpha\beta3$ exprimierten.

VI. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1: Metastasierung des Ovarialkarzinoms.....	10
Abbildung 2: Modell der Tumorprogression des Ovarialkarzinoms	13
Abbildung 3: Übersicht über die zellulären Auswirkungen der Integrin-vermittelten Zell-Matrix-Adhäsion und Signaltransduktion.....	15
Abbildung 4: Struktureller Aufbau der Integrin-Domänen	18
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Integrin-Konformationsänderungen im Zuge der Integrinaktivierung als Voraussetzung für eine Integrin-vermittelte bidirektionale Signaltransduktion	20
Abbildung 6: Struktur der TMD und zytoplasmatischen Domäne von Integrin $\alpha\beta 3$	21
Abbildung 7: Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von Integrin $\alpha\beta 3$	22
Abbildung 8: Vereinfachte schematische Darstellung der durch Integrinaktivierung vermittelten Initiierung intrazellulärer überlebensfördernder Signalkaskaden	25
Abbildung 9: Extrinsischer und intrinsischer Apoptose-Signalweg.....	28
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Metastasierung durch Anoikis-resistente Tumorzellen.....	31
Abbildung 11: Übersicht über die TMD-Dimerisierungsmotive der Integrin $\alpha\beta 3$ /GpA-Chimären	34
Abbildung 12: Darstellung der Integrin $\alpha\beta 3$ -Expression in transfizierten OV-MZ-6 Zellen mittels konfokaler Lasermikroskopie	35
Abbildung 13: Darstellung der Zellviabilität im Durchflusszytometer mittels Annexin V-Fluorescein-Färbung.....	54
Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der Quadrantenanalyse zur Ermittlung der vitalen, apoptotischen und nekrotischen Fraktionen der verschiedenen in Aszites suspendiert kultivierten Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Zelltransfektanten nach durchflusszytometrischer Bestimmung der Annexin- und PI-Färbung.....	57
Abbildung 15: Darstellung früher Apoptose-Merkmale als Funktion der Integrinaktivierung in Aszites suspendiert kultivierter Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Zelltransfektanten	59

Abbildung 16: Darstellung früher Apoptose-Merkmale als Funktion der Integrinaktivierung in DMEM suspendiert kultivierter Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Zelltransfektanten	60
Abbildung 17: Darstellung früher Apoptose-Merkmale mittels in der CLSM detektierbarer Fluoreszenzsignalintensitäten als Funktion der Integrinaktivierung in DMEM suspendiert kultivierter Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Zelltransfektanten	61
Abbildung 18: Nachweis aktivierter Caspase-3 in Abhängigkeit der zellulären Expression von Integrin $\alpha\beta 3$ in verschiedenen TMD-konformationellen Aktivierungszuständen mittels Westernblot-Analyse...	63
Abbildung 19: Nachweis aktivierter Caspase-3 in suspendiert kultivierten Ovarialkarzinomzellen in Abhängigkeit vom Integrin $\alpha\beta 3$ -Aktivierungszustand mittels immunzytochemischer Färbung und Auswertung am CLSM.....	64
Abbildung 20: Darstellung der Clusterbildung in Suspensionszellen in Abhängigkeit der verschiedenen Integrin $\alpha\beta 3$ TMD mittels CLSM	65
Abbildung 21: Nachweis der FAK-Expression in Abhängigkeit der zellulären Expression von Integrin $\alpha\beta 3$ in verschiedenen TMD-konformationellen Aktivierungszuständen mittels Westernblot-Analyse...	67
Abbildung 22: Nachweis der p-FAK-Expression in Abhängigkeit der zellulären Expression von Integrin $\alpha\beta 3$ in verschiedenen TMD-konformationellen Aktivierungszuständen mittels Westernblot-Analyse...	69
Abbildung 23: Nachweis der Src-Kinase-Expression in Abhängigkeit von der Expression verschieden aktiver Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Varianten mittels Westernblot-Analyse.....	71
Abbildung 24: Nachweis der p-Src-Kinase-Expression in Abhängigkeit von der Expression verschieden aktiver Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Varianten mittels Westernblot-Analyse	72
Abbildung 25: Nachweis der PKB/Akt-Kinase-Expression in Abhängigkeit von der Expression verschieden aktiver Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Varianten mittels Westernblot-Analyse	74
Abbildung 26: Nachweis der p-Akt-Kinase-Expression in Abhängigkeit von der Expression verschieden aktiver Integrin $\alpha\beta 3$ TMD-Varianten mittels Westernblot-Analyse	75

Tabelle 1: Reagenzien für die Zellkultur	36
Tabelle 2: Erstantikörper für die Westernblot-Analyse.....	38
Tabelle 3: Zweitantikörper für die Westernblot-Analyse	38
Tabelle 4: Erstantikörper für die Immunzytochemie.....	38
Tabelle 5: Zweitantikörper für die Immunzytochemie	38
Tabelle 6: Chemikalien	40
Tabelle 7: Lösungen und Puffer.....	41
Tabelle 8: Verwendete gebrauchsfertige Lösungen	41
Tabelle 9: Labormaterialien	42
Tabelle 10: Laborgeräte.....	43

VII. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ute Reuning für die Überlassung des Promotionsthemas, die intensive und fachkundige Betreuung meiner Arbeit, die stete Gesprächsbereitschaft, die geduldige Unterstützung über den gesamten Zeitraum meiner Arbeit sowie für die Korrektur meiner Dissertationsschrift.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt (†) für die Ermöglichung meiner Arbeit in der Klinischen Forschergruppe der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde der TU München.

Frau Anke Bengé möchte ich ganz herzlich für die unkomplizierte und kompetente praktische Einarbeitung im Labor danken, für die vielen gemeinsam verbrachten kurzweiligen Stunden an der Zellbank, für die guten Gespräche und die produktive Zusammenarbeit, für das viele gemeinsame Lachen und für ihre stetige Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. rer. nat. Martina Müller danke ich für die Überlassung der Integrin-Zelltransfektanten, die die Grundlage dieser Arbeit bildeten.

Allen Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik möchte ich für die stets freundliche kollegiale Atmosphäre, die immerwährende Hilfsbereitschaft und für die gute Zusammenarbeit danken. Mein besonderer Dank hierbei geht an Dr. Julia Miller, Dr. Susanne Sölch, Dr. Claudia Windmüller, Tom Schulze und Dr. Anne Karge für die freundschaftliche Unterstützung und Motivation auch über die Zeit im Labor hinaus, die immer gute Laune und für viele unvergessliche Momente.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, Gerda und Eduard Hingerl, bedanken, die mir meine gesamte Ausbildung ermöglicht haben. Ich danke ihnen für ihre endlose Geduld, ihr Verständnis und die fortwährende Unterstützung und Motivation.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Zeitschriftenartikel

Abdollahi, T., N. M. Robertson, A. Abdollahi and G. Litwack (2003). "Identification of interleukin 8 as an inhibitor of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in the ovarian carcinoma cell line OVCAR3." Cancer Res **63**(15): 4521-4526.

Adams, P. D., D. M. Engelman and A. T. Brunger (1996). "Improved prediction for the structure of the dimeric transmembrane domain of glycoporphin A obtained through global searching." Proteins **26**(3): 257-261.

Agarwal, R. and S. B. Kaye (2003). "Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy." Nat Rev Cancer **3**(7): 502-516.

Ahmed, N., C. Riley, K. Oliva, G. Rice and M. Quinn (2005). "Ascites induces modulation of alpha6beta1 integrin and urokinase plasminogen activator receptor expression and associated functions in ovarian carcinoma." Br J Cancer **92**(8): 1475-1485.

Ahmed, N., C. Riley, K. Oliva, E. Stutt, G. E. Rice and M. A. Quinn (2003). "Integrin-linked kinase expression increases with ovarian tumour grade and is sustained by peritoneal tumour fluid." J Pathol **201**(2): 229-237.

Ahmed, N. and K. L. Stenvers (2013). "Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research." Front Oncol **3**: 256.

Albelda, S. M., S. A. Mente, D. E. Elder, R. Stewart, L. Damjanovich, M. Herlyn and C. A. Buck (1990). "Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression." Cancer Res **50**(20): 6757-6764.

Alday-Parejo, B., R. Stupp and C. Rugg (2019). "Are Integrins Still Practicable Targets for Anti-Cancer Therapy?" Cancers (Basel) **11**(7).

Alexandrakis, M. G., D. Kyriakou, I. E. Koutroubakis, R. Alexandraki, I. G. Vlachonikolis and G. D. Eliopoulos (2001). "Assaying of tumor necrosis factor alpha, complement factors, and alpha-1-antitrypsin in the diagnosis of malignant serous effusions." Am J Clin Oncol **24**(6): 562-565.

Alghisi, G. C., L. Ponsonnet and C. Rugg (2009). "The integrin antagonist cilengitide activates alphaVbeta3, disrupts VE-cadherin localization at cell junctions and enhances permeability in endothelial cells." PLoS One **4**(2): e4449.

Allen, H. J., C. Porter, M. Gamarra, M. S. Piver and E. A. Johnson (1987). "Isolation and morphologic characterization of human ovarian carcinoma cell clusters present in effusions." Exp Cell Biol **55**(4): 194-208.

Anthis, N. J. and I. D. Campbell (2011). "The tail of integrin activation." Trends Biochem Sci **36**(4): 191-198.

Arias-Salgado, E. G., S. Lizano, S. Sarkar, J. S. Brugge, M. H. Ginsberg and S. J. Shattil (2003). "Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13298-13302.

Askari, J. A., P. A. Buckley, A. P. Mould and M. J. Humphries (2009). "Linking integrin conformation to function." J Cell Sci **122**(Pt 2): 165-170.

Avizienyte, E. and M. C. Frame (2005). "Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition." Curr Opin Cell Biol **17**(5): 542-547.

Avraamides, C. J., B. Garmy-Susini and J. A. Varner (2008). "Integrins in

angiogenesis and lymphangiogenesis." Nat Rev Cancer **8**(8): 604-617.

Beck, V., H. Herold, A. Benge, B. Lubber, P. Hutzler, H. Tschesche, H. Kessler, M. Schmitt, H. G. Geppert and U. Reuning (2005). "ADAM15 decreases integrin α v β 3/vitronectin-mediated ovarian cancer cell adhesion and motility in an RGD-dependent fashion." Int J Biochem Cell Biol **37**(3): 590-603.

Berrier, A. L. and K. M. Yamada (2007). "Cell-matrix adhesion." J Cell Physiol **213**(3): 565-573.

Beviglia, L., V. Golubovskaya, L. Xu, X. Yang, R. J. Craven and W. G. Cance (2003). "Focal adhesion kinase N-terminus in breast carcinoma cells induces rounding, detachment and apoptosis." Biochem J **373**(Pt 1): 201-210.

Bjorge, L., J. Hakulinen, O. K. Vintermyr, H. Jarva, T. S. Jensen, O. E. Iversen and S. Meri (2005). "Ascitic complement system in ovarian cancer." Br J Cancer **92**(5): 895-905.

Bouchard, V., M. J. Demers, S. Thibodeau, V. Laquerre, N. Fujita, T. Tsuruo, J. F. Beaulieu, R. Gauthier, A. Vezina, L. Villeneuve and P. H. Vachon (2007). "Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-specific uncoupling with the PI3-K/Akt-1 and MEK/Erk pathways." J Cell Physiol **212**(3): 717-728.

Bouillet, P., D. Metcalf, D. C. Huang, D. M. Tarlinton, T. W. Kay, F. Kontgen, J. M. Adams and A. Strasser (1999). "Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity." Science **286**(5445): 1735-1738.

Bouillet, P., J. F. Purton, D. I. Godfrey, L. C. Zhang, L. Coultas, H. Puthalakath, M. Pellegrini, S. Cory, J. M. Adams and A. Strasser (2002). "BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive

thymocytes." Nature **415**(6874): 922-926.

Brassard, D. L., E. Maxwell, M. Malkowski, T. L. Nagabhushan, C. C. Kumar and L. Armstrong (1999). "Integrin alpha(v)beta(3)-mediated activation of apoptosis." Exp Cell Res **251**(1): 33-45.

Brem, R. B., S. G. Robbins, D. J. Wilson, L. M. O'Rourke, R. N. Mixon, J. E. Robertson, S. R. Planck and J. T. Rosenbaum (1994). "Immunolocalization of integrins in the human retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(9): 3466-3474.

Brooks, P. C., R. A. Clark and D. A. Cheresh (1994). "Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis." Science **264**(5158): 569-571.

Brumatti, G., M. Salmanidis and P. G. Ekert (2010). "Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals." Cell Mol Life Sci **67**(10): 1619-1630.

Bu, Z. and D. M. Engelman (1999). "A method for determining transmembrane helix association and orientation in detergent micelles using small angle x-ray scattering." Biophys J **77**(2): 1064-1073.

Burleson, K. M., L. K. Hansen and A. P. Skubitz (2004). "Ovarian carcinoma spheroids disaggregate on type I collagen and invade live human mesothelial cell monolayers." Clin Exp Metastasis **21**(8): 685-697.

Burnier, J. V., N. Wang, R. P. Michel, M. Hassanain, S. Li, Y. Lu, P. Metrakos, E. Anteck, M. N. Burnier, A. Ponton, S. Gallinger and P. Brodt (2011). "Type IV collagen-initiated signals provide survival and growth cues required for liver metastasis." Oncogene **30**(35): 3766-3783.

Byzova, T. V., C. K. Goldman, N. Pampori, K. A. Thomas, A. Bett, S. J.

Shattil and E. F. Plow (2000). "A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins." Mol Cell **6**(4): 851-860.

Cai, W., Y. Wu, K. Chen, Q. Cao, D. A. Tice and X. Chen (2006). "In vitro and in vivo characterization of ⁶⁴Cu-labeled Abegrin, a humanized monoclonal antibody against integrin alpha v beta 3." Cancer Res **66**(19): 9673-9681.

Calalb, M. B., T. R. Polte and S. K. Hanks (1995). "Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases." Mol Cell Biol **15**(2): 954-963.

Calderwood, D. A. (2004). "Integrin activation." J Cell Sci **117**(Pt 5): 657-666.

Calderwood, D. A., R. Zent, R. Grant, D. J. Rees, R. O. Hynes and M. H. Ginsberg (1999). "The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation." J Biol Chem **274**(40): 28071-28074.

Campbell, I. D. and M. J. Humphries (2011). "Integrin structure, activation, and interactions." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(3).

Cannistra, S. A. (2004). "Cancer of the ovary." N Engl J Med **351**(24): 2519-2529.

Carduner, L., R. Agniel, S. Kellouche, C. R. Picot, C. Blanc-Fournier, J. Leroy-Dudal and F. Carreiras (2013). "Ovarian cancer ascites-derived vitronectin and fibronectin: combined purification, molecular features and effects on cell response." Biochim Biophys Acta **1830**(10): 4885-4897.

Carduner, L., J. Leroy-Dudal, C. R. Picot, O. Gallet, F. Carreiras and S. Kellouche (2014). "Ascites-induced shift along epithelial-mesenchymal

spectrum in ovarian cancer cells: enhancement of their invasive behavior partly dependant on alphav integrins." Clin Exp Metastasis **31**(6): 675-688.

Carduner, L., C. R. Picot, J. Leroy-Dudal, L. Blay, S. Kellouche and F. Carreiras (2014). "Cell cycle arrest or survival signaling through alphav integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids." Exp Cell Res **320**(2): 329-342.

Carioli, G., P. Bertuccio, P. Boffetta, F. Levi, C. La Vecchia, E. Negri and M. Malvezzi (2020). "European cancer mortality predictions for the year 2020 with a focus on prostate cancer." Ann Oncol **31**(5): 650-658.

Carreiras, F., S. Cruet, C. Staedel, F. Sichel and P. Gauduchon (1999). "Human ovarian adenocarcinoma cells synthesize vitronectin and use it to organize their adhesion." Gynecol Oncol **72**(3): 312-322.

Carreiras, F., B. Thiebot, J. Leroy-Dudal, S. Maubant, M. F. Breton and H. Darbeida (2002). "Involvement of alphavbeta 3 integrin and disruption of endothelial fibronectin network during the adhesion of the human ovarian adenocarcinoma cell line IGROV1 on the human umbilical vein cell extracellular matrix." Int J Cancer **99**(6): 800-808.

Chambers, A. F., A. C. Groom and I. C. MacDonald (2002). "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." Nat Rev Cancer **2**(8): 563-572.

Cheah, M. and M. R. Andrews (2018). "Integrin Activation: Implications for Axon Regeneration." Cells **7**(3).

Chen, H. C., P. A. Appeddu, H. Isoda and J. L. Guan (1996). "Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem **271**(42): 26329-26334.

Chen, H. C., M. Kanai, A. Inoue-Yamauchi, H. C. Tu, Y. Huang, D. Ren, H. Kim, S. Takeda, D. E. Reyna, P. M. Chan, Y. T. Ganesan, C. P. Liao, E. Gavathiotis, J. J. Hsieh and E. H. Cheng (2015). "An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family." Nat Cell Biol **17**(10): 1270-1281.

Cheresh, D. A. (1987). "Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(18): 6471-6475.

Cheresh, D. A. and D. G. Stupack (2008). "Regulation of angiogenesis: apoptotic cues from the ECM." Oncogene **27**(48): 6285-6298.

Chiarugi, P. and E. Giannoni (2008). "Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells." Biochem Pharmacol **76**(11): 1352-1364.

Chien, J. R., G. Aletti, D. A. Bell, G. L. Keeney, V. Shridhar and L. C. Hartmann (2007). "Molecular pathogenesis and therapeutic targets in epithelial ovarian cancer." J Cell Biochem **102**(5): 1117-1129.

Chinot, O. L. (2014). "Cilengitide in glioblastoma: when did it fail?" Lancet Oncol **15**(10): 1044-1045.

Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." Biochem J **326** (Pt 1): 1-16.

Colombo, N., T. Van Gorp, G. Parma, F. Amant, G. Gatta, C. Sessa and I. Vergote (2006). "Ovarian cancer." Crit Rev Oncol Hematol **60**(2): 159-179.

Critchley, D. R. (2004). "Cytoskeletal proteins talin and vinculin in integrin-mediated adhesion." Biochem Soc Trans **32**(Pt 5): 831-836.

Czabotar, P. E., G. Lessene, A. Strasser and J. M. Adams (2014). "Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(1): 49-63.

Dai, H., A. Smith, X. W. Meng, P. A. Schneider, Y. P. Pang and S. H. Kaufmann (2011). "Transient binding of an activator BH3 domain to the Bak BH3-binding groove initiates Bak oligomerization." J Cell Biol **194**(1): 39-48.

Danhier, F., A. Le Breton and V. Preat (2012). "RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis." Mol Pharm **9**(11): 2961-2973.

Davidson, B., I. Goldberg, R. Reich, L. Tell, H. P. Dong, C. G. Trope, B. Risberg and J. Kopolovic (2003). "AlphaV- and beta1-integrin subunits are commonly expressed in malignant effusions from ovarian carcinoma patients." Gynecol Oncol **90**(2): 248-257.

de Bree, E., P. A. Theodoropoulos, H. Rosing, J. Michalakis, J. Romanos, J. H. Beijnen and D. D. Tsiftsis (2006). "Treatment of ovarian cancer using intraperitoneal chemotherapy with taxanes: from laboratory bench to bedside." Cancer Treat Rev **32**(6): 471-482.

Desgrosellier, J. S., L. A. Barnes, D. J. Shields, M. Huang, S. K. Lau, N. Prevost, D. Tarin, S. J. Shattil and D. A. Cheresh (2009). "An integrin alpha(v)beta(3)-c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression." Nat Med **15**(10): 1163-1169.

Desgrosellier, J. S. and D. A. Cheresh (2010). "Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities." Nat Rev Cancer **10**(1): 9-22.

Dolinschek, R., J. Hingerl, A. Benge, C. Zafiu, E. Schuren, E. K. Ehmoser, D. Lossner and U. Reuning (2021). "Constitutive activation of integrin alphavbeta3 contributes to anoikis resistance of ovarian cancer cells." Mol

Oncol **15**(2): 503-522.

Eliceiri, B. P. and D. A. Cheresh (1999). "The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development." J Clin Invest **103**(9): 1227-1230.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.

Felding-Habermann, B. (2003). "Integrin adhesion receptors in tumor metastasis." Clin Exp Metastasis **20**(3): 203-213.

Fiandalo, M. V. and N. Kyprianou (2012). "Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis." Exp Oncol **34**(3): 165-175.

Fisher, L. E., D. M. Engelman and J. N. Sturgis (1999). "Detergents modulate dimerization, but not helicity, of the glycoporphin A transmembrane domain." J Mol Biol **293**(3): 639-651.

Fisher, L. E., D. M. Engelman and J. N. Sturgis (2003). "Effect of detergents on the association of the glycoporphin a transmembrane helix." Biophys J **85**(5): 3097-3105.

Fleming, K. G., A. L. Ackerman and D. M. Engelman (1997). "The effect of point mutations on the free energy of transmembrane alpha-helix dimerization." J Mol Biol **272**(2): 266-275.

Fleming, K. G., C. C. Ren, A. K. Doura, M. E. Eisley, F. J. Kobus and A. M. Stanley (2004). "Thermodynamics of glycoporphin A transmembrane helix dimerization in C14 betaine micelles." Biophys Chem **108**(1-3): 43-49.

Fresno Vara, J. A., E. Casado, J. de Castro, P. Cejas, C. Belda-Iniesta and M. Gonzalez-Baron (2004). "PI3K/Akt signalling pathway and cancer."

Cancer Treat Rev **30**(2): 193-204.

Frisch, S. M. and H. Francis (1994). "Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis." J Cell Biol **124**(4): 619-626.

Frisch, S. M. and R. A. Screaton (2001). "Anoikis mechanisms." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 555-562.

Galluzzi, L., J. M. Bravo-San Pedro and G. Kroemer (2014). "Organelle-specific initiation of cell death." Nat Cell Biol **16**(8): 728-736.

Galluzzi, L., O. Kepp and G. Kroemer (2016). "Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control." Microb Cell **3**(3): 101-108.

Galluzzi, L., I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E. S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D. W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, A. V. Antonov, E. Arama, E. H. Baehrecke, N. A. Barlev, N. G. Bazan, F. Bernassola, M. J. M. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, P. Boya, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, D. Carmona-Gutierrez, F. Cecconi, F. K. Chan, N. S. Chandel, E. H. Cheng, J. E. Chipuk, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, M. Conrad, J. R. Cubillos-Ruiz, P. E. Czabotar, V. D'Angiolella, T. M. Dawson, V. L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K. M. Debatin, R. J. DeBerardinis, M. Deshmukh, N. Di Daniele, F. Di Virgilio, V. M. Dixit, S. J. Dixon, C. S. Duckett, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, J. W. Elrod, G. M. Fimia, S. Fulda, A. J. Garcia-Saez, A. D. Garg, C. Garrido, E. Gavathiotis, P. Golstein, E. Gottlieb, D. R. Green, L. A. Greene, H. Gronemeyer, A. Gross, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, I. S. Harris, M. O. Hengartner, C. Hetz, H. Ichijo, M. Jaattela, B. Joseph, P. J. Jost, P. P. Juin, W. J. Kaiser, M. Karin, T. Kaufmann, O. Kepp, A. Kimchi, R. N. Kitsis, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kumar, S. W. Lee, J. J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S. A. Lipton, R. A. Lockshin, C. Lopez-Otin, S. W. Lowe, T. Luedde, E. Lugli, M. MacFarlane, F. Madeo, M. Malewicz, W. Malorni, G. Manic, J. C. Marine, S. J. Martin, J. C. Martinou, J. P. Medema, P. Mehlen, P. Meier, S. Melino, E.

A. Miao, J. D. Molkentin, U. M. Moll, C. Munoz-Pinedo, S. Nagata, G. Nunez, A. Oberst, M. Oren, M. Overholtzer, M. Pagano, T. Panaretakis, M. Pasparakis, J. M. Penninger, D. M. Pereira, S. Pervaiz, M. E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J. H. M. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, M. Rehm, R. Rizzuto, C. M. P. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, K. M. Ryan, E. Sayan, L. Scorrano, F. Shao, Y. Shi, J. Silke, H. U. Simon, A. Sistigu, B. R. Stockwell, A. Strasser, G. Szabadkai, S. W. G. Tait, D. Tang, N. Tavernarakis, A. Thorburn, Y. Tsujimoto, B. Turk, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, M. G. Vander Heiden, A. Villunger, H. W. Virgin, K. H. Vousden, D. Vucic, E. F. Wagner, H. Walczak, D. Wallach, Y. Wang, J. A. Wells, W. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, L. Zitvogel, G. Melino and G. Kroemer (2018). "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." Cell Death Differ **25**(3): 486-541.

Gauthier, R., C. Harnois, J. F. Drolet, J. C. Reed, A. Vezina and P. H. Vachon (2001). "Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms." Am J Physiol Cell Physiol **280**(6): C1540-1554.

Gauthier, R., P. Laprise, E. Cardin, C. Harnois, A. Plourde, J. C. Reed, A. Vezina and P. H. Vachon (2001). "Differential sensitivity to apoptosis between the human small and large intestinal mucosae: linkage with segment-specific regulation of BCL-2 homologs and involvement of signaling pathways." J Cell Biochem **82**(2): 339-355.

Gavathiotis, E., D. E. Reyna, M. L. Davis, G. H. Bird and L. D. Walensky (2010). "BH3-triggered structural reorganization drives the activation of proapoptotic BAX." Mol Cell **40**(3): 481-492.

Gavathiotis, E., M. Suzuki, M. L. Davis, K. Pitter, G. H. Bird, S. G. Katz, H. C. Tu, H. Kim, E. H. Cheng, N. Tjandra and L. D. Walensky (2008). "BAX activation is initiated at a novel interaction site." Nature **455**(7216): 1076-1081.

Giancotti, F. G. (2000). "Complexity and specificity of integrin signalling." Nat Cell Biol **2**(1): E13-14.

Gilmore, A. P. (2005). "Anoikis." Cell Death Differ **12 Suppl 2**: 1473-1477.

Golubovskaya, V., L. Beviglia, L. H. Xu, H. S. Earp, 3rd, R. Craven and W. Cance (2002). "Dual inhibition of focal adhesion kinase and epidermal growth factor receptor pathways cooperatively induces death receptor-mediated apoptosis in human breast cancer cells." J Biol Chem **277**(41): 38978-38987.

Gottschalk, K. E. (2005). "A coiled-coil structure of the alphaIIb beta3 integrin transmembrane and cytoplasmic domains in its resting state." Structure **13**(5): 703-712.

Gottschalk, K. E., P. D. Adams, A. T. Brunger and H. Kessler (2002). "Transmembrane signal transduction of the alpha(IIb)beta(3) integrin." Protein Sci **11**(7): 1800-1812.

Grossmann, J. (2002). "Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis"." Apoptosis **7**(3): 247-260.

Guidetti, G. F., I. Canobbio and M. Torti (2015). "PI3K/Akt in platelet integrin signaling and implications in thrombosis." Adv Biol Regul **59**: 36-52.

Guo, W. and F. G. Giancotti (2004). "Integrin signalling during tumour progression." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 816-826.

Hacker, G. (2000). "The morphology of apoptosis." Cell Tissue Res **301**(1): 5-17.

Hanks, S. K., L. Ryzhova, N. Y. Shin and J. Brabek (2003). "Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival

and motility." Front Biosci **8**: d982-996.

Hapke, S., H. Kessler, B. Lubber, A. Benge, P. Hutzler, H. Hofler, M. Schmitt and U. Reuning (2003). "Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha(v)beta3/Vitronectin interaction." Biol Chem **384**(7): 1073-1083.

Harburger, D. S. and D. A. Calderwood (2009). "Integrin signalling at a glance." J Cell Sci **122**(Pt 2): 159-163.

Hemminki, A., N. Belousova, K. R. Zinn, B. Liu, M. Wang, T. R. Chaudhuri, B. E. Rogers, D. J. Buchsbaum, G. P. Siegal, M. N. Barnes, J. Gomez-Navarro, D. T. Curiel and R. D. Alvarez (2001). "An adenovirus with enhanced infectivity mediates molecular chemotherapy of ovarian cancer cells and allows imaging of gene expression." Mol Ther **4**(3): 223-231.

Hersey, P., J. Sosman, S. O'Day, J. Richards, A. Bedikian, R. Gonzalez, W. Sharfman, R. Weber, T. Logan, M. Buzoianu, L. Hammershaimb, J. M. Kirkwood and G. Etaracizumab Melanoma Study (2010). "A randomized phase 2 study of etaracizumab, a monoclonal antibody against integrin alpha(v)beta(3), + or - dacarbazine in patients with stage IV metastatic melanoma." Cancer **116**(6): 1526-1534.

Hervy, M., L. Hoffman and M. C. Beckerle (2006). "From the membrane to the nucleus and back again: bifunctional focal adhesion proteins." Curr Opin Cell Biol **18**(5): 524-532.

Hoefling, M., H. Kessler and K. E. Gottschalk (2009). "The transmembrane structure of integrin alpha11bbeta3: significance for signal transduction." Angew Chem Int Ed Engl **48**(36): 6590-6593.

Homburg, C. H., M. de Haas, A. E. von dem Borne, A. J. Verhoeven, C. P. Reutelingsperger and D. Roos (1995). "Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during

apoptosis in vitro." Blood **85**(2): 532-540.

Horton, E. R., A. Byron, J. A. Askari, D. H. J. Ng, A. Millon-Fremillon, J. Robertson, E. J. Koper, N. R. Paul, S. Warwood, D. Knight, J. D. Humphries and M. J. Humphries (2015). "Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly." Nat Cell Biol **17**(12): 1577-1587.

Horton, M. A. (1997). "The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor"." Int J Biochem Cell Biol **29**(5): 721-725.

Horwitz, A., K. Duggan, C. Buck, M. C. Beckerle and K. Burridge (1986). "Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage." Nature **320**(6062): 531-533.

Hughes, P. E., T. E. O'Toole, J. Ylanne, S. J. Shattil and M. H. Ginsberg (1995). "The conserved membrane-proximal region of an integrin cytoplasmic domain specifies ligand binding affinity." J Biol Chem **270**(21): 12411-12417.

Humphries, M. J. (2002). "Insights into integrin-ligand binding and activation from the first crystal structure." Arthritis Res **4 Suppl 3**: S69-78.

Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-687.

Ilic, D., E. A. Almeida, D. D. Schlaepfer, P. Dazin, S. Aizawa and C. H. Damsky (1998). "Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis." J Cell Biol **143**(2): 547-560.

Iwasaki, K., K. Mitsuoka, Y. Fujiyoshi, Y. Fujisawa, M. Kikuchi, K. Sekiguchi and T. Yamada (2005). "Electron tomography reveals diverse

conformations of integrin α 5 β 3 in the active state." J Struct Biol **150**(3): 259-267.

Jemal, A., R. C. Tiwari, T. Murray, A. Ghafoor, A. Samuels, E. Ward, E. J. Feuer, M. J. Thun and S. American Cancer (2004). "Cancer statistics, 2004." CA Cancer J Clin **54**(1): 8-29.

Julien, O. and J. A. Wells (2017). "Caspases and their substrates." Cell Death Differ **24**(8): 1380-1389.

Kapp, T. G., F. Rechenmacher, T. R. Sobahi and H. Kessler (2013). "Integrin modulators: a patent review." Expert Opin Ther Pat **23**(10): 1273-1295.

Karst, A. M. and R. Drapkin (2010). "Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution." J Oncol **2010**: 932371.

Kellouche, S., J. Fernandes, J. Leroy-Dudal, O. Gallet, S. Dutoit, L. Poulain and F. Carreiras (2010). "Initial formation of IGROV1 ovarian cancer multicellular aggregates involves vitronectin." Tumour Biol **31**(2): 129-139.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.

Khwaja, A., P. Rodriguez-Viciano, S. Wennstrom, P. H. Warne and J. Downward (1997). "Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway." EMBO J **16**(10): 2783-2793.

Kim, C., F. Ye and M. H. Ginsberg (2011). "Regulation of integrin activation." Annu Rev Cell Dev Biol **27**: 321-345.

Kim, H., M. Rafiuddin-Shah, H. C. Tu, J. R. Jeffers, G. P. Zambetti, J. J. Hsieh and E. H. Cheng (2006). "Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies." Nat Cell Biol **8**(12): 1348-1358.

Kim, H., H. C. Tu, D. Ren, O. Takeuchi, J. R. Jeffers, G. P. Zambetti, J. J. Hsieh and E. H. Cheng (2009). "Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis." Mol Cell **36**(3): 487-499.

Kim, Y. J., C. Sauer, K. Testa, J. K. Wahl, R. A. Svoboda, K. R. Johnson, M. J. Wheelock and K. A. Knudsen (2005). "Modulating the strength of cadherin adhesion: evidence for a novel adhesion complex." J Cell Sci **118**(Pt 17): 3883-3894.

Kitajiri, S., N. Hosaka, H. Hiraumi, T. Hirose and S. Ikehara (2002). "Increased expression of integrin beta-4 in papillary thyroid carcinoma with gross lymph node metastasis." Pathol Int **52**(7): 438-441.

Kobayashi, H., S. Man, C. H. Graham, S. J. Kapitan, B. A. Teicher and R. S. Kerbel (1993). "Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3294-3298.

Koopman, G., C. P. Reutelingsperger, G. A. Kuijten, R. M. Keehnen, S. T. Pals and M. H. van Oers (1994). "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis." Blood **84**(5): 1415-1420.

L'Esperance, S., M. Bachvarova, B. Tetu, A. M. Mes-Masson and D. Bachvarov (2008). "Global gene expression analysis of early response to chemotherapy treatment in ovarian cancer spheroids." BMC Genomics **9**: 99.

Lane, D., N. Goncharenko-Khaider, C. Rancourt and A. Piche (2010). "Ovarian cancer ascites protects from TRAIL-induced cell death through

alphavbeta5 integrin-mediated focal adhesion kinase and Akt activation." Oncogene **29**(24): 3519-3531.

Lane, D., V. Robert, R. Grondin, C. Rancourt and A. Piche (2007). "Malignant ascites protect against TRAIL-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt pathway in human ovarian carcinoma cells." Int J Cancer **121**(6): 1227-1237.

Lau, T. L., V. Dua and T. S. Ulmer (2008). "Structure of the integrin alphaIIb transmembrane segment." J Biol Chem **283**(23): 16162-16168.

Lau, T. L., C. Kim, M. H. Ginsberg and T. S. Ulmer (2009). "The structure of the integrin alphaIIbbeta3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling." EMBO J **28**(9): 1351-1361.

Lau, T. L., A. W. Partridge, M. H. Ginsberg and T. S. Ulmer (2008). "Structure of the integrin beta3 transmembrane segment in phospholipid bicelles and detergent micelles." Biochemistry **47**(13): 4008-4016.

Lee, S., S. Christakos and M. B. Small (1993). "Apoptosis and signal transduction: clues to a molecular mechanism." Curr Opin Cell Biol **5**(2): 286-291.

Legler, D. F., G. Wiedle, F. P. Ross and B. A. Imhof (2001). "Superactivation of integrin alphavbeta3 by low antagonist concentrations." J Cell Sci **114**(Pt 8): 1545-1553.

Lemmon, M. A., J. M. Flanagan, J. F. Hunt, B. D. Adair, B. J. Bormann, C. E. Dempsey and D. M. Engelman (1992). "Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices." J Biol Chem **267**(11): 7683-7689.

Leroy-Dudal, J., C. Demeilliers, O. Gallet, E. Pauthe, S. Dutoit, R. Agniel,

P. Gauduchon and F. Carreiras (2005). "Transmigration of human ovarian adenocarcinoma cells through endothelial extracellular matrix involves alphav integrins and the participation of MMP2." Int J Cancer **114**(4): 531-543.

Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri and X. Wang (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-489.

Li, R., C. R. Babu, J. D. Lear, A. J. Wand, J. S. Bennett and W. F. DeGrado (2001). "Oligomerization of the integrin alpha11beta3: roles of the transmembrane and cytoplasmic domains." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12462-12467.

Li, S., J. L. Guan and S. Chien (2005). "Biochemistry and biomechanics of cell motility." Annu Rev Biomed Eng **7**: 105-150.

Li, W., D. G. Metcalf, R. Gorelik, R. Li, N. Mitra, V. Nanda, P. B. Law, J. D. Lear, W. F. Degrado and J. S. Bennett (2005). "A push-pull mechanism for regulating integrin function." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1424-1429.

Liapis, H., L. M. Adler, M. R. Wick and J. S. Rader (1997). "Expression of alpha(v)beta3 integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas." Hum Pathol **28**(4): 443-449.

Lietha, D., X. Cai, D. F. Ceccarelli, Y. Li, M. D. Schaller and M. J. Eck (2007). "Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase." Cell **129**(6): 1177-1187.

Liu, A. X., J. R. Testa, T. C. Hamilton, R. Jove, S. V. Nicosia and J. Q. Cheng (1998). "AKT2, a member of the protein kinase B family, is activated by growth factors, v-Ha-ras, and v-src through phosphatidylinositol 3-kinase

in human ovarian epithelial cancer cells." Cancer Res **58**(14): 2973-2977.

Liu, S., D. A. Calderwood and M. H. Ginsberg (2000). "Integrin cytoplasmic domain-binding proteins." J Cell Sci **113 (Pt 20)**: 3563-3571.

Lo, S. H. (2006). "Focal adhesions: what's new inside." Dev Biol **294**(2): 280-291.

Ludwig, B. S., H. Kessler, S. Kossatz and U. Reuning (2021). "RGD-Binding Integrins Revisited: How Recently Discovered Functions and Novel Synthetic Ligands (Re-)Shape an Ever-Evolving Field." Cancers (Basel) **13**(7).

Luo, B. H., C. V. Carman and T. A. Springer (2007). "Structural basis of integrin regulation and signaling." Annu Rev Immunol **25**: 619-647.

Luo, B. H., T. A. Springer and J. Takagi (2004). "A specific interface between integrin transmembrane helices and affinity for ligand." PLoS Biol **2**(6): e153.

Makhija, S., D. D. Taylor, R. K. Gibb and C. Gercel-Taylor (1999). "Taxol-induced bcl-2 phosphorylation in ovarian cancer cell monolayer and spheroids." Int J Oncol **14**(3): 515-521.

Mal, F., T. P. Huu, M. Bendahou, J. C. Trinchet, M. Garnier, J. Hakim and M. Beaugrand (1991). "Chemoattractant and opsonic activity in ascitic fluid. A study in 47 patients with cirrhosis or malignant peritonitis." J Hepatol **12**(1): 45-49.

Matte, I., D. Lane, C. Laplante, C. Rancourt and A. Piche (2012). "Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites." Am J Cancer Res **2**(5): 566-580.

Melchiori, A., R. Mortarini, S. Carlone, P. C. Marchisio, A. Anichini, D. M. Noonan and A. Albini (1995). "The alpha 3 beta 1 integrin is involved in melanoma cell migration and invasion." Exp Cell Res **219**(1): 233-242.

Millard, M., S. Odde and N. Neamati (2011). "Integrin targeted therapeutics." Theranostics **1**: 154-188.

Mills, G. B., C. May, M. Hill, S. Campbell, P. Shaw and A. Marks (1990). "Ascitic fluid from human ovarian cancer patients contains growth factors necessary for intraperitoneal growth of human ovarian adenocarcinoma cells." J Clin Invest **86**(3): 851-855.

Mills, G. B., C. May, M. McGill, C. M. Roifman and A. Mellors (1988). "A putative new growth factor in ascitic fluid from ovarian cancer patients: identification, characterization, and mechanism of action." Cancer Res **48**(5): 1066-1071.

Miranti, C. K. and J. S. Brugge (2002). "Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction." Nat Cell Biol **4**(4): E83-90.

Mitra, S. K., D. A. Hanson and D. D. Schlaepfer (2005). "Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 56-68.

Mobus, V., C. D. Gerharz, U. Press, R. Moll, T. Beck, W. Mellin, K. Pollow, P. G. Knapstein and R. Kreienberg (1992). "Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines." Int J Cancer **52**(1): 76-84.

Moschos, S. J., C. A. Sander, W. Wang, S. L. Reppert, L. M. Drogowski, D. M. Jukic, U. N. Rao, C. Athanassiou, M. Buzoianu, M. Mandic, L. Richman, L. McKinney, J. Leininger, D. A. Tice, L. Hammershaimb and J. M. Kirkwood (2010). "Pharmacodynamic (phase 0) study using etaracizumab in

advanced melanoma." J Immunother **33**(3): 316-325.

Mould, A. P., S. J. Barton, J. A. Askari, P. A. McEwan, P. A. Buckley, S. E. Craig and M. J. Humphries (2003). "Conformational changes in the integrin beta A domain provide a mechanism for signal transduction via hybrid domain movement." J Biol Chem **278**(19): 17028-17035.

Mueller-Klieser, W. (1997). "Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications." Am J Physiol **273**(4): C1109-1123.

Muller, M. A., J. Opfer, L. Brunie, L. A. Volkhardt, E. K. Sinner, D. Boettiger, A. Bochen, H. Kessler, K. E. Gottschalk and U. Reuning (2013). "The glycoporphin A transmembrane sequence within integrin alphavbeta3 creates a non-signaling integrin with low basal affinity that is strongly adhesive under force." J Mol Biol **425**(16): 2988-3006.

Naora, H. and D. J. Montell (2005). "Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms." Nat Rev Cancer **5**(5): 355-366.

Natali, P. G., M. R. Nicotra, A. Bartolazzi, R. Cavaliere and A. Bigotti (1993). "Integrin expression in cutaneous malignant melanoma: association of the alpha 3/beta 1 heterodimer with tumor progression." Int J Cancer **54**(1): 68-72.

Nayal, A., D. J. Webb and A. F. Horwitz (2004). "Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics." Curr Opin Cell Biol **16**(1): 94-98.

Nemeth, J. A., M. T. Nakada, M. Trikha, Z. Lang, M. S. Gordon, G. C. Jayson, R. Corringham, U. Prabhakar, H. M. Davis and R. A. Beckman (2007). "Alpha-v integrins as therapeutic targets in oncology." Cancer Invest **25**(7): 632-646.

Nieberler, M., U. Reuning, F. Reichart, J. Notni, H. J. Wester, M. Schwaiger,

M. Weinmuller, A. Rader, K. Steiger and H. Kessler (2017). "Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer." Cancers (Basel) **9**(9).

Nisato, R. E., J. C. Tille, A. Jonczyk, S. L. Goodman and M. S. Pepper (2003). "alpha v beta 3 and alpha v beta 5 integrin antagonists inhibit angiogenesis in vitro." Angiogenesis **6**(2): 105-119.

Nishida, N., C. Xie, M. Shimaoka, Y. Cheng, T. Walz and T. A. Springer (2006). "Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to extended conformations." Immunity **25**(4): 583-594.

Nunez, G., L. London, D. Hockenbery, M. Alexander, J. P. McKearn and S. J. Korsmeyer (1990). "Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines." J Immunol **144**(9): 3602-3610.

O'Brien, V., S. M. Frisch and R. L. Juliano (1996). "Expression of the integrin alpha 5 subunit in HT29 colon carcinoma cells suppresses apoptosis triggered by serum deprivation." Exp Cell Res **224**(1): 208-213.

O'Day, S. J., A. C. Pavlick, M. R. Albertini, O. Hamid, H. Schalch, Z. Lang, J. Ling, M. Mata, M. Reddy and B. Foster (2012). "Clinical and pharmacologic evaluation of two dose levels of intetumumab (CNTO 95) in patients with melanoma or angiosarcoma." Invest New Drugs **30**(3): 1074-1081.

Oliveira-Ferrer, L., J. Hauschild, W. Fiedler, C. Bokemeyer, J. Nippgen, I. Celik and G. Schuch (2008). "Cilengitide induces cellular detachment and apoptosis in endothelial and glioma cells mediated by inhibition of FAK/src/AKT pathway." J Exp Clin Cancer Res **27**: 86.

Pantel, K. and R. H. Brakenhoff (2004). "Dissecting the metastatic cascade." Nat Rev Cancer **4**(6): 448-456.

Paoli, P., E. Giannoni and P. Chiarugi (2013). "Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression." Biochim Biophys Acta **1833**(12): 3481-3498.

Parsons, S. J. and J. T. Parsons (2004). "Src family kinases, key regulators of signal transduction." Oncogene **23**(48): 7906-7909.

Partridge, A. W., S. Liu, S. Kim, J. U. Bowie and M. H. Ginsberg (2005). "Transmembrane domain helix packing stabilizes integrin alpha11bbeta3 in the low affinity state." J Biol Chem **280**(8): 7294-7300.

Patel, S. R., J. Jenkins, N. Papadopolous, M. A. Burgess, C. Plager, J. Gutterman and R. S. Benjamin (2001). "Pilot study of vitaxin--an angiogenesis inhibitor-in patients with advanced leiomyosarcomas." Cancer **92**(5): 1347-1348.

Patil, S., A. Jedsadayamata, J. D. Wencel-Drake, W. Wang, I. Knezevic and S. C. Lam (1999). "Identification of a talin-binding site in the integrin beta(3) subunit distinct from the NPLY regulatory motif of post-ligand binding functions. The talin n-terminal head domain interacts with the membrane-proximal region of the beta(3) cytoplasmic tail." J Biol Chem **274**(40): 28575-28583.

Petrache, H. I., A. Grossfield, K. R. MacKenzie, D. M. Engelman and T. B. Woolf (2000). "Modulation of glycoprotein A transmembrane helix interactions by lipid bilayers: molecular dynamics calculations." J Mol Biol **302**(3): 727-746.

Pihan, P., A. Carreras-Sureda and C. Hetz (2017). "BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise." Cell Death Differ **24**(9): 1478-1487.

Posey, J. A., M. B. Khazaeli, A. DelGrosso, M. N. Saleh, C. Y. Lin, W. Huse and A. F. LoBuglio (2001). "A pilot trial of Vitaxin, a humanized anti-

vitronectin receptor (anti alpha v beta 3) antibody in patients with metastatic cancer." Cancer Biother Radiopharm **16**(2): 125-132.

Psachoulia, E., D. P. Marshall and M. S. Sansom (2010). "Molecular dynamics simulations of the dimerization of transmembrane alpha-helices." Acc Chem Res **43**(3): 388-396.

Puiffe, M. L., C. Le Page, A. Filali-Mouhim, M. Zietarska, V. Ouellet, P. N. Tonin, M. Chevrette, D. M. Provencher and A. M. Mes-Masson (2007). "Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer." Neoplasia **9**(10): 820-829.

Rader, C., D. A. Cheresch and C. F. Barbas, 3rd (1998). "A phage display approach for rapid antibody humanization: designed combinatorial V gene libraries." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8910-8915.

Raff, M. C. (1992). "Social controls on cell survival and cell death." Nature **356**(6368): 397-400.

Reddig, P. J. and R. L. Juliano (2005). "Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival." Cancer Metastasis Rev **24**(3): 425-439.

Rees, D. J., S. E. Ades, S. J. Singer and R. O. Hynes (1990). "Sequence and domain structure of talin." Nature **347**(6294): 685-689.

Reynolds, A. R., I. R. Hart, A. R. Watson, J. C. Welti, R. G. Silva, S. D. Robinson, G. Da Violante, M. Gourlaouen, M. Salih, M. C. Jones, D. T. Jones, G. Saunders, V. Kostourou, F. Perron-Sierra, J. C. Norman, G. C. Tucker and K. M. Hodivala-Dilke (2009). "Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors." Nat Med **15**(4): 392-400.

Rolli, M., E. Fransvea, J. Pilch, A. Saven and B. Felding-Habermann (2003). "Activated integrin α v β 3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9482-9487.

Romashkova, J. A. and S. S. Makarov (1999). "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling." Nature **401**(6748): 86-90.

Roos, W. P., A. D. Thomas and B. Kaina (2016). "DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology." Nat Rev Cancer **16**(1): 20-33.

Roskoski, R., Jr. (2015). "Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors." Pharmacol Res **94**: 9-25.

Runyon, B. A., R. L. Morrissey, J. C. Hoefs and F. A. Wyle (1985). "Opsonic activity of human ascitic fluid: a potentially important protective mechanism against spontaneous bacterial peritonitis." Hepatology **5**(4): 634-637.

Schiller, H. B., C. C. Friedel, C. Boulegue and R. Fassler (2011). "Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins." EMBO Rep **12**(3): 259-266.

Schwartz, M. A., M. D. Schaller and M. H. Ginsberg (1995). "Integrins: emerging paradigms of signal transduction." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 549-599.

Shalini, S., L. Dorstyn, S. Dawar and S. Kumar (2015). "Old, new and emerging functions of caspases." Cell Death Differ **22**(4): 526-539.

Shamas-Din, A., J. Kale, B. Leber and D. W. Andrews (2013). "Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(4): a008714.

Shattil, S. J. and M. H. Ginsberg (1997). "Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Integrin signaling in vascular biology." J Clin Invest **100**(1): 1-5.

Shattil, S. J., C. Kim and M. H. Ginsberg (2010). "The final steps of integrin activation: the end game." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(4): 288-300.

Shepherd, J. H. (1989). "Revised FIGO staging for gynaecological cancer." Br J Obstet Gynaecol **96**(8): 889-892.

Shield, K., M. L. Ackland, N. Ahmed and G. E. Rice (2009). "Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology." Gynecol Oncol **113**(1): 143-148.

Shield, K., C. Riley, M. A. Quinn, G. E. Rice, M. L. Ackland and N. Ahmed (2007). "Alpha2beta1 integrin affects metastatic potential of ovarian carcinoma spheroids by supporting disaggregation and proteolysis." J Carcinog **6**: 11.

Shimizu, S., M. Narita and Y. Tsujimoto (1999). "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC." Nature **399**(6735): 483-487.

Siebenlist, U., G. Franzoso and K. Brown (1994). "Structure, regulation and function of NF-kappa B." Annu Rev Cell Biol **10**: 405-455.

Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2020). "Cancer statistics, 2020." CA Cancer J Clin **70**(1): 7-30.

Sodek, K. L., K. J. Murphy, T. J. Brown and M. J. Ringuette (2012). "Cell-cell and cell-matrix dynamics in intraperitoneal cancer metastasis." Cancer Metastasis Rev **31**(1-2): 397-414.

Springer, T. A. (1997). "Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(1): 65-72.

Springer, T. A. and M. L. Dustin (2012). "Integrin inside-out signaling and the immunological synapse." Curr Opin Cell Biol **24**(1): 107-115.

Stupp, R., M. E. Hegi, T. Gorlia, S. C. Erridge, J. Perry, Y. K. Hong, K. D. Aldape, B. Lhermitte, T. Pietsch, D. Grujicic, J. P. Steinbach, W. Wick, R. Tarnawski, D. H. Nam, P. Hau, A. Weyerbrock, M. J. Taphoorn, C. C. Shen, N. Rao, L. Thurzo, U. Herrlinger, T. Gupta, R. D. Kortmann, K. Adamska, C. McBain, A. A. Brandes, J. C. Tonn, O. Schnell, T. Wiegel, C. Y. Kim, L. B. Nabors, D. A. Reardon, M. J. van den Bent, C. Hicking, A. Markivskyy, M. Picard, M. Weller, R. European Organisation for, C. Treatment of, C. Canadian Brain Tumor and C. s. team (2014). "Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial." Lancet Oncol **15**(10): 1100-1108.

Su, J., M. Cai, W. Li, B. Hou, H. He, C. Ling, T. Huang, H. Liu and Y. Guo (2016). "Molecularly Targeted Drugs Plus Radiotherapy and Temozolomide Treatment for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Meta-Analysis and Systematic Review." Oncol Res **24**(2): 117-128.

Sulzmaier, F. J., C. Jean and D. D. Schlaepfer (2014). "FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications." Nat Rev Cancer **14**(9): 598-610.

Sutherland, R. M. and R. E. Durand (1976). "Radiation response of multicell spheroids--an in vitro tumour model." Curr Top Radiat Res Q **11**(1): 87-139.

Sutherland, R. M., W. R. Inch, J. A. McCredie and J. Kruuv (1970). "A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model." Int J

Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **18**(5): 491-495.

Sutherland, R. M., J. A. McCredie and W. R. Inch (1971). "Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas." J Natl Cancer Inst **46**(1): 113-120.

Taddei, M. L., E. Giannoni, T. Fiaschi and P. Chiarugi (2012). "Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases." J Pathol **226**(2): 380-393.

Tadokoro, S., S. J. Shattil, K. Eto, V. Tai, R. C. Liddington, J. M. de Pereda, M. H. Ginsberg and D. A. Calderwood (2003). "Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation." Science **302**(5642): 103-106.

Tait, S. W. and D. R. Green (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(9): 621-632.

Takagi, J., B. M. Petre, T. Walz and T. A. Springer (2002). "Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling." Cell **110**(5): 599-511.

Takagi, J., K. Strokovich, T. A. Springer and T. Walz (2003). "Structure of integrin alpha5beta1 in complex with fibronectin." EMBO J **22**(18): 4607-4615.

Takayama, S., S. Ishii, T. Ikeda, S. Masamura, M. Doi and M. Kitajima (2005). "The relationship between bone metastasis from human breast cancer and integrin alpha(v)beta3 expression." Anticancer Res **25**(1A): 79-83.

Tan, D. S., R. Agarwal and S. B. Kaye (2006). "Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer." Lancet Oncol **7**(11): 925-934.

Tapial Martinez, P., P. Lopez Navajas and D. Lietha (2020). "FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions." Biomolecules **10**(2).

Taylor, R. C., S. P. Cullen and S. J. Martin (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(3): 231-241.

Thornberry, N. A. (1998). "Caspases: key mediators of apoptosis." Chem Biol **5**(5): R97-103.

Tolomelli, A., P. Galletti, M. Baiula and D. Giacomini (2017). "Can Integrin Agonists Have Cards to Play against Cancer? A Literature Survey of Small Molecules Integrin Activators." Cancers (Basel) **9**(7).

Torre, L. A., B. Trabert, C. E. DeSantis, K. D. Miller, G. Samimi, C. D. Runowicz, M. M. Gaudet, A. Jemal and R. L. Siegel (2018). "Ovarian cancer statistics, 2018." CA Cancer J Clin.

Travis, M. A., J. D. Humphries and M. J. Humphries (2003). "An unraveling tale of how integrins are activated from within." Trends Pharmacol Sci **24**(4): 192-197.

Treutlein, H. R., M. A. Lemmon, D. M. Engelman and A. T. Brunger (1992). "The glycoporphin A transmembrane domain dimer: sequence-specific propensity for a right-handed supercoil of helices." Biochemistry **31**(51): 12726-12732.

Tucker, G. C. (2002). "Inhibitors of integrins." Curr Opin Pharmacol **2**(4): 394-402.

Valentijn, A. J. and A. P. Gilmore (2004). "Translocation of full-length Bid to mitochondria during anoikis." J Biol Chem **279**(31): 32848-32857.

van der Flier, A. and A. Sonnenberg (2001). "Structural and functional aspects of filamins." Biochim Biophys Acta **1538**(2-3): 99-117.

van Engeland, M., L. J. Nieland, F. C. Ramaekers, B. Schutte and C. P. Reutelingsperger (1998). "Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure." Cytometry **31**(1): 1-9.

Verhoven, B., R. A. Schlegel and P. Williamson (1995). "Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes." J Exp Med **182**(5): 1597-1601.

Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken and C. Reutelingsperger (1995). "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." J Immunol Methods **184**(1): 39-51.

Villunger, A., E. M. Michalak, L. Coultas, F. Mullauer, G. Bock, M. J. Ausserlechner, J. M. Adams and A. Strasser (2003). "p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa." Science **302**(5647): 1036-1038.

Vinogradova, O., A. Velyvis, A. Velyviene, B. Hu, T. Haas, E. Plow and J. Qin (2002). "A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face." Cell **110**(5): 587-597.

Vitale, I., G. Manic, R. De Maria, G. Kroemer and L. Galluzzi (2017). "DNA Damage in Stem Cells." Mol Cell **66**(3): 306-319.

Wajant, H. (2002). "The Fas signaling pathway: more than a paradigm." Science **296**(5573): 1635-1636.

Waleh, N. S., J. Gallo, T. D. Grant, B. J. Murphy, R. H. Kramer and R. M.

Sutherland (1994). "Selective down-regulation of integrin receptors in spheroids of squamous cell carcinoma." Cancer Res **54**(3): 838-843.

Walport, M. J. (2001). "Complement. First of two parts." N Engl J Med **344**(14): 1058-1066.

Wang, Y., J. Liu, B. Lin, C. Wang, Q. Li, S. Liu, L. Yan, S. Zhang and M. Iwamori (2011). "Study on the expression and clinical significances of lewis y antigen and integrin alphav, beta3 in epithelial ovarian tumors." Int J Mol Sci **12**(6): 3409-3421.

Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**(5517): 727-730.

Weller, M., L. B. Nabors, T. Gorlia, H. Leske, E. Rushing, P. Bady, C. Hicking, J. Perry, Y. K. Hong, P. Roth, W. Wick, S. L. Goodman, M. E. Hegi, M. Picard, H. Moch, J. Straub and R. Stupp (2016). "Cilengitide in newly diagnosed glioblastoma: biomarker expression and outcome." Oncotarget **7**(12): 15018-15032.

Wick, W., M. Platten, A. Wick, A. Hertenstein, A. Radbruch, M. Bendszus and F. Winkler (2016). "Current status and future directions of anti-angiogenic therapy for gliomas." Neuro Oncol **18**(3): 315-328.

Windham, T. C., N. U. Parikh, D. R. Siwak, J. M. Summy, D. J. McConkey, A. J. Kraker and G. E. Gallick (2002). "Src activation regulates anoikis in human colon tumor cell lines." Oncogene **21**(51): 7797-7807.

Wirth, M., A. Heidenreich, J. E. Gschwend, T. Gil, S. Zastrow, M. Laniado, J. Gerloff, M. Zuhlsdorf, G. Mordenti, W. Uhl and H. Lannert (2014). "A multicenter phase 1 study of EMD 525797 (DI17E6), a novel humanized monoclonal antibody targeting alphav integrins, in progressive castration-

resistant prostate cancer with bone metastases after chemotherapy." Eur Urol **65**(5): 897-904.

Xia, H., R. S. Nho, J. Kahm, J. Kleidon and C. A. Henke (2004). "Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway." J Biol Chem **279**(31): 33024-33034.

Xiao, T., J. Takagi, B. S. Coller, J. H. Wang and T. A. Springer (2004). "Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics." Nature **432**(7013): 59-67.

Xiong, J. P., T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman and M. A. Arnaout (2001). "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3." Science **294**(5541): 339-345.

Xiong, J. P., T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman and M. A. Arnaout (2002). "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand." Science **296**(5565): 151-155.

Yan, B., D. A. Calderwood, B. Yaspan and M. H. Ginsberg (2001). "Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain." J Biol Chem **276**(30): 28164-28170.

Zaidel-Bar, R., S. Itzkovitz, A. Ma'ayan, R. Iyengar and B. Geiger (2007). "Functional atlas of the integrin adhesome." Nat Cell Biol **9**(8): 858-867.

Zhang, Z., K. Vuori, J. C. Reed and E. Ruoslahti (1995). "The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(13): 6161-6165.

Zou, H., W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg and X. Wang (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." Cell **90**(3): 405-413.

2. Internetquelle

Holschbach, M. Was ist Durchflusszytometrie (FACS)?
(www.antikoerper-online.de/resources/17/1247/was-ist-durchflusszytometrie-facs/). Stand 07.10.2021.