

**„Pharmakologische Hemmung strahleninduzierter
Tumorzell-Endothelzell-Interaktionen *in vitro* und
Metastasierungsprozesse *in vivo*“**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Melanie Herzog

geb. am 05.02.1976 in Darmstadt

Mainz, 2013

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit entstand von 2006 bis 2010 am Institut für Toxikologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Mai 2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Strahlentherapie.....	1
1.1.1 Physikalische Grundlagen der Strahlentherapie.....	1
1.1.2 Regionale Bestrahlung und Ganzkörperbestrahlung.....	2
1.1.3 Wirkung von ionisierender Strahlung auf Normalgewebe (Tumorbestrahlung und Metastasierung).....	3
1.2 Transkriptionsfaktor NF- κ B	4
1.3 Metastatische Kaskade/Hämatogene Metastasierung	6
1.4 Immunglobulin-Superfamilie	9
1.5 Integrine	9
1.6 Cadherine	10
1.7 Selektine.....	11
1.7.1 E-Selektin	12
1.7.2 L-Selektin	13
1.7.3 P-Selektin	13
1.8 Selektinliganden und Counterrezeptoren bei der hämatogenen Metastasierung	14
1.9 Inhibitoren - Sialyl Lewis X-Mimetika - Glycyrrhizin	16
1.10 Kleine GTP-bindende Proteine	17
1.11 Statine	20
1.12 Zielsetzung.....	22
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Material	23
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmittel	23
2.1.2 Spezielle Chemikalien, Enzyme und Kits.....	24
2.1.3 Medien und Komponenten für die Bakterien- und Zellkultur	26
2.1.3.1 Bakterienkultur	26

Inhaltsverzeichnis

2.1.3.2 Zellkultur	26
2.1.3.2.1 Zellkulturmedien und Medienzusätze	26
2.1.3.2.2 Plastikware	26
2.1.4 Puffer- und Stammlösungen	27
2.1.5 Antikörper	30
2.1.6 Expressionsvektoren	30
2.1.7 Primer	30
2.1.8 Zellsysteme	31
2.1.8.1 Bakterienstämme	31
2.1.8.2 Säugerzelllinien	31
2.1.9 Software	32
2.2 Methoden	32
2.2.1 Bakterienkultur	32
2.2.1.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	32
2.2.1.2 Transformation von Plasmid-DNA	32
2.2.2 Zellkultur	33
2.2.2.1 Stabile Transfektion von DNA in Säugerzellen	33
2.2.2.2 Analyse der Tumorzelladhäsion	34
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	34
2.2.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten	34
2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.2.3.3 Western blot-Transfer	35
2.2.3.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Antikörper	35
2.2.3.5 Beta-Glo [®] -Assay	36
2.2.4 Molekularbiologische Methoden	37
2.2.4.1 Präparation von Nukleinsäuren	37
2.2.4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Midi-Präp)	37
2.2.4.2 Synthese von cDNA	37
2.2.4.3 Primer-Design	37
2.2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.2.4.4.1. Quantitative RT-PCR	38
2.2.4.5 DNA-Gelelektrophorese	38
2.2.5 Tierexperimentelle Arbeiten	39
2.2.5.1 Mausmodell und -haltung	39
2.2.5.2 Experimentelle Lungenmetastasierung	39
2.2.5.3 Histologie und Quantifizierung	39

2.2.6	Statistische Auswertung	40
3.	Ergebnisse	41
3.1	Steigerung der Tumorzelladhäsion an Endothelzellen durch Vorbehandlung mit inflammatorischen Zytokinen <i>in vitro</i>	41
3.2.	Einfluss von ionisierender Strahlung (IR) auf die Tumorzelladhäsion <i>in vitro</i>	42
3.2.1	Vorbehandlung von Endothelzellen mit TNF α und ionisierender Strahlung führen zu einer pro-adhäsiven Endothel- und Tumorzellantwort.....	42
3.2.2	Bestrahlung von Endothelzellen und Tumorzellen steigert die EZ-TZ- Interaktion <i>in vitro</i>	44
3.2.3	Inhibierung der EZ-TZ-Adhäsion nach Strahlenexposition durch den HMG-CoA-Reduktase- Inhibitor Lovastatin	45
3.2.4	Hyaluronsäure fördert den pro-adhäsiven Strahleneffekt <i>in vitro</i>	49
3.3	Einfluss von Ganzkörperbestrahlung auf die Extravasation von Tumorzellen sowie die Lungenmetastasierung <i>in vivo</i>	50
3.3.1	Ganzkörperbestrahlung induziert Metastasenformation in der Lunge im <i>in vivo</i> BALB/c Rag ^{2-/-} - Mausmodell	50
3.3.2	Lovastatin wirkt einer strahleninduzierten Metastasenformation <i>in vivo</i> entgegen	56
3.3.3	Ionisierende Strahlung beeinflusst auch die Metastasenbildung im Scid CB-17-Mausmodell.	60
3.3.4	Rac1 ist in die IR-induzierbare Endothelzell-Tumorzell-Adhäsion involviert <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	62
4.	Diskussion.....	65
4.1	Pharmakologische Modifikation von zytokin- und strahleninduzierter Adhäsion zwischen Endothel- und Tumorzellen <i>in vitro</i>	66
4.2	Tumorzellextravasation und Metastasierung kann <i>in vivo</i> durch ionisierende Strahlung induziert werden	67
4.3	Lovastatin wirkt als potentieller Inhibitor strahleninduzierter Metastasenbildung <i>in vivo</i>	68
4.4	Modulation von Zelladhäsionsmolekülen zur Verminderung strahleninduzierter Nebeneffekte	69
5.	Zusammenfassung	72
	Literaturverzeichnis	74
	Veröffentlichungen.....	85
	Eidesstattliche Erklärung	87

Inhaltsverzeichnis

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Amp	Ampicillin
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celcius
ca.	circa
CAM	Cellular adhesion molecules
CHO	Chinese hamster ovary
d	day
Da	Dalton
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunecleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
ECL	“enhanced chemiluminiscence”
EDTA	Ethylen-Diaminoethylether-Tetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunabsorbent assay
ERK	Extracellular signal-related kinase
E-Selektin	endotheliales Selektin
EZ	Endothelzellen
FCS/FKS	Fetale calf serum/ Fötales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosin 5'-Phosphat
Gy	Gray
h	Stunde
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HUVEC	Humane umbilikale venöse Endothelzellen
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IR	Ionisierende Strahlung
I κ B- α	Inhibitor of NF- κ B
J	Joule
K	Kontrolle
kDa	Kilo Dalton
Konz.	Konzentration
L	Liter
M	Molar
mA	Milli Ampere
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
min	Minute
mRNA	messenger RNA
NF- κ B	nuclear factor kappa B
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)

Abkürzungsverzeichnis

Rho	Ras homolog
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natrium(Sodium)dodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
TZ	Tumorzellen
U	Unit
ü. N./üN	über Nacht
V	Volt
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1

1. Einleitung

1.1 Strahlentherapie

Die Radiotherapie, deren Geburtsstunde die Entdeckung der „Röntgenstrahlung“ durch Konrad Röntgen im Jahr 1895 war, blickt auf eine mehr als 100-jährige Geschichte zurück. Während in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts die vielfältigen Möglichkeiten der Strahlentherapie nur unter begrenzten technischen Ressourcen genutzt werden konnten, sind aufgrund der massiven Weiterentwicklung in Therapieplanung und/oder Beschleunigertechnologie (Computertechnologie) entscheidende Entwicklungen in der Radioonkologie eingeleitet worden. Vor allem die Therapie mit Protonen bzw. Schwerionen hat in den letzten Jahren durch die höhere physikalische und biologische Selektivität bedeutend zugenommen. Die Strahlentherapie nimmt bei onkologischen Therapien als lokoregionäre Behandlung eine zentrale Stellung zwischen operativ-chirurgischer und systemisch-medikamentöser Therapie ein. Sie bietet die Möglichkeit einer lokalisierten Behandlung, als auch einer großvolumigen regionären Behandlungsmethode. Der Erfolg einer Strahlentherapie wird durch epidemiologische Daten belegt, die zeigen, dass mehr als 50 % aller erwachsenen Tumorpatienten geheilt werden können, wovon die Hälfte entweder nur eine Bestrahlung erhielt bzw. simultane Strahlenbehandlung mit medikamentöser Therapie (= Radio-Chemotherapie). Ebenfalls eingesetzt wird die Strahlentherapie im Bereich der palliativen Behandlung zur Linderung der Symptomatik und Steigerung der Lebensqualität und bei der adjuvanten Behandlung, um das Ergebnis einer vorausgegangenen Operation zu sichern und mikroskopische Tumornester zu vernichten bzw., um aufgrund ihrer Größe, zunächst inoperable Tumore zu verkleinern (Pötter und Georg, 2010).

1.1.1 Physikalische Grundlagen der Strahlentherapie

Energiereiche Strahlen ab einer Energie von 10 eV nennt man auch ionisierende Strahlen, da sie bei der Wechselwirkung mit Materie deren Atome bzw. Moleküle ionisieren. Es entsteht ein Elektron und ein positiv geladenes Restatom bzw. Molekül. Das freigesetzte Elektron verliert längs seiner Bahn kinetische Energie und gibt diese an das absorbierende Medium ab. Die durch Strahlung im Absorber lokal absorbierte Energie

repräsentiert die Energiedosis und ist die zentrale Messgröße in der Dosimetrie ionisierender Strahlung. Die Energiedosis D ist definiert als die mittlere übertragene Energie, die durch ionisierende Strahlung auf das Material in einem Massenelement übertragen wird:

$$D = d\hat{E}/dm$$

(D = Energiedosis; $d\hat{E}$ = mittlere übertragene Energie; dm = Massenelement).

Die Einheit der Energiedosis ist das Gray (Gy), wobei 1 Gy einer Energie von einem Joule pro Kilogramm entsprechen (1 Gy = 1 J/kg) (Kahn, 2003; van Dyk, 1999).

1.1.2 Regionale Bestrahlung und Ganzkörperbestrahlung

In der Regel erfolgt die Bestrahlung von Tumoren lokal, d. h. die Deposition der Strahlenenergie erfolgt möglichst gezielt im Tumor. Hierbei wird das umliegende Normalgewebe nur relativ geringen Strahlendosen (Outside-field Exposition) ausgesetzt. Unter bestimmten Umständen ist jedoch auch eine Ganzkörperbestrahlung (engl.: total body irradiation, TBI) notwendig. TBI ist eine gleichmäßige, äußere Bestrahlung des ganzen Körpers mit ionisierender Strahlung. Sie wird v. a. in Kombination mit intensiver Chemotherapie bei Leukämien (Blutkrebs) und Lymphomen (Tumoren, die aus lymphatischem Gewebe entstehen) vor Knochenmark- und Blutstammzell-Transplantationen eingesetzt. Zielvolumen ist der ganze Körper, einschließlich Haut und den inneren besonders strahlenempfindlichen Risikoorganen wie z. B. der Lunge, da alle Tumorzellen und das gesamte zelluläre Immunsystem die Zielzellen der Bestrahlung sind. Beim Einsatz von Photonen muss der Aufbaueffekt berücksichtigt werden. Aufbauplatten, zwischen Patient und Strahlenquelle positioniert, werden verwendet, um eine Unterdosierung der Haut zu vermeiden. Durch den Aufbaueffekt wird das Dosismaximum zur Aufbauplatte hin verschoben und die Haut mit der notwendigen Dosis bestrahlt. Besondere Beachtung muss auch der Lunge geschenkt werden, da durch den hohen Luftanteil die Dichte im Vergleich zum restlichen Gewebe gering ist. Dadurch wird in ihr – und in Bestrahlungsrichtung auch nach ihr – eine höhere Dosis deponiert als in normalem Gewebe (Diermeier, 2005; Podogorsak, 2005; Quast, 1996).

1.1.3 Wirkung von ionisierender Strahlung auf Normalgewebe (Tumorbestrahlung und Metastasierung)

Neben der erwünschten zytotoxischen Wirkung auf Tumorzellen, führt die Exposition mit IR jedoch auch zu akuten und/oder chronischen Schädigungen des Normalgewebes (z. B. Mukositis oder Fibrose) (Zhao, 2009). Die pro-inflammatorischen Strahleneffekte sind vor allem auf eine gesteigerte NF- κ B-regulierte Expression von inflammatorischen Zytokinen (u. a. TNF α oder Interleukine) und Zelladhäsionsmolekülen (z. B. E-Selektin) zurückzuführen (Wang, 2002; Baichwal, 1997). Eine Vielzahl von *in vitro*-Experimenten aber auch *in vivo*-Untersuchungen zeigten, dass IR die Expression von Faktoren induziert, welche einen direkten Einfluss auf Prozesse der Metastasierung haben. So konnte u. a. eine Stimulation pro-angiogenetischer Faktoren (z. B. VEGF), Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), relevanter Zelladhäsionsmoleküle (Selektine) und des Weiteren eine Erhöhung der Tumorzell-Motilität beobachtet werden (Park, 2006; Jung, 2007; de la Monte, 1988). Diese Hinweise auf eine mögliche tumorfördernde Wirkung wurden zwar überwiegend *in vitro* beobachtet, deuten jedoch auch auf eine mögliche Relevanz im *in vivo*-System hin. Entsprechend konnte auch bereits in Mausmodellen eine pro-metastatische Wirkung ionisierender Strahlung gezeigt werden (Nakayama, 2007; Madani, 2008).

Inwieweit diese präklinischen *in vitro* und *in vivo* Befunde auf das humane System übertragen werden können, ist jedoch sehr umstritten. Prinzipiell lassen sich für die Radiotherapie zwei pro-metastatische Szenarien unterscheiden: (A) eine Zunahme von Metastasen nach lokaler Tumorbestrahlung und (B) ein Anstieg von Metastasen in zuvor bestrahltem Normalgewebe. Eine Förderung der Metastasierung wurde beispielsweise nach Bestrahlung von Karzinomen der Wangenschleimhaut (Kaplan, 1949), bei Mammakarzinomen (Fisher, 1969), Kopf-Hals-Tumoren und bei kleinzelligen Lungentumoren (Merino, 1977; de la Monte, 1988) beobachtet. Für diese Effekte sind möglicherweise eine strahleninduzierte Expression von Matrix-Metalloproteinasen und motilitätsfördernden Mechanismen verantwortlich. Es ist naheliegend zu vermuten, dass dem Auftreten von Metastasen in zuvor bestrahltem Normalgewebe andere molekulare Mechanismen zu Grunde liegen. Vorstellbar ist beispielsweise, dass vermittelt durch IR-induzierte Stressreaktionen des vaskulären Systems (z. B. Inflammation) widerstandsfähige zirkulierende Tumorzellen dazu in der Lage sind in das Normalgewebe zu extravasieren. Diese Annahme unterstützen Berichte, nach denen das bestrahlte Gewebe noch nicht von Tumorzellen infiltriert war und bei denen der Primärtumor entfernt

vom bestrahlten Normalgewebe lag. Dennoch wies das Normalgewebe nachfolgend Metastasen auf (z. B. Lymphom) (Ohno, 1980; Madani, 2008).

1.2 Transkriptionsfaktor NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist für pro-inflammatorische adverse Strahlenreaktionen bedeutsam, da er die Expression pro-inflammatorischer Zytokine, u. a. von IL6, reguliert. Innerhalb der NF- κ B/Rel-Familie existieren 5 verschiedene Mitglieder: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) und p52/p100 (NF- κ B2) (Ghosh, 2002). Die strukturelle Verwandtschaft beinhaltet die sogenannte „Rel homology domain“ (RHD), eine 300 Aminosäuren lange Domäne am N-terminalen Ende. Diese umfasst eine I κ B-Bindungsregion, eine nukleäre Lokalisationssequenz, eine Dimerisierungsregion, sowie die sog. „ κ B-sites“, Bindestellen für spezifische DNA-Sequenzen (Hayden, 2004; Baldwin, 1996; Dixit, 2002). NF- κ B wurde im Jahr 1986 zuerst als Transkriptionsfaktor an einer charakteristischen DNA-Region in reifen B-Lymphozyten der Maus, dem Immunglobulin κ -Ketten-Enhancer, beschrieben (Sen und Baltimore, 1986). In weiteren Untersuchungen wurde herausgefunden, dass NF- κ B als pluripotenter Aktivierungsfaktor auf die unterschiedlichsten Stimuli reagiert. Diese beinhalten zelluläre Botenstoffe, wie pro-inflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1), infektiöse Agentien, Hormone und Wachstumsfaktoren, sowie physikalischen (UV-Licht, ionisierende Strahlung) oder chemischen Stress, wie aktive Sauerstoffspezies (Bowie, 1997; Brach, 1991; Li, 1998; Hayden, 2004; Sethi, 2008). NF- κ B liegt in zwei verschiedenen Aktivitätszuständen vor: einer inaktiven zytoplasmatischen und einer aktiven Form, welche in der Lage ist, in den Nukleus zu translozieren und dort die Expression von Zielgenen zu aktivieren oder zu reprimieren. Die zytoplasmatische inaktive Form ist durch eine Bindung an eines der Inhibitorproteine I κ B bedingt. In der aktiven Form kann NF- κ B sowohl als Homo- als auch als Heterodimer vorliegen (May, 1997). Nach Bindung eines spezifischen Liganden an einen membranären Rezeptor, wie z. B. TNF-Rezeptor oder IL-1-Rezeptor oder aber auch nach Exposition von Zellen mit ionisierender Strahlung, wird der I κ B-Komplex (IKK) aktiviert. Dieser besteht aus drei verschiedenen Komponenten: die zwei katalytischen Komponenten (a) Ser/Thr Kinase I κ B-Kinase α (IKK α) und (b) I κ B-Kinase β (IKK β), sowie eine regulatorische Komponente (c) IKK γ (NF- κ B essential modifier – NEMO) (Bonizzi, 2004; Stancovski, 1997). Durch die Aktivierung von IKK kommt es zur Phosphorylierung des Inhibitor Komplexes I κ B an Ser32 und Ser36 bei I κ B- α , sowie Ser19 und Ser23 bei

I κ B- β . Dies führt zu einer Poly-Ubiquitinierung dessen und anschließender Proteolyse durch das 26S-Proteasom (Beg, 1993; Courtois, 2000). Infolgedessen kann das NF- κ B Dimer in den Nukleus translozieren und, nach Bindung an spezifische Promotor-DNA-Sequenzen, bestimmte Zielgene aktivieren. In Folge einer gleichzeitigen Induktion der I κ B- α Expression, welcher in den Nukleus wandert, dort aktiviertes NF- κ B von seiner DNA-Bindung löst und in das Zytoplasma rücktransportiert, wird die Aktivität von NF- κ B zeitlich begrenzt und durch diesen negativen Feedback-Mechanismus reguliert (Sun, 1993).

Die Aktivierung von NF- κ B als Zellantwort nach ionisierender Strahlung oder Inflammation ist gut dokumentiert (Baichwal, 1997; Baeuerle, 1996). Als Folge der Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors wird u. a. die Expression von Zelladhäsionsmolekülen, wie z. B. VCAM-1 oder E-Selektin induziert, welche die Adhäsion und Transmigration von Granulozyten, Monozyten und T-Lymphozyten an das Endothel erleichtern. Eine verstärkte Anheftung an das Endothel konnte auch bei malignen Zellen beobachtet werden. Bei dieser Tumor-Metastasierung ist NF- κ B ebenfalls involviert (Huang, 2004). Abbildung 1 zeigt schematisch die an der Aktivierung von NF- κ B beteiligten Mechanismen.

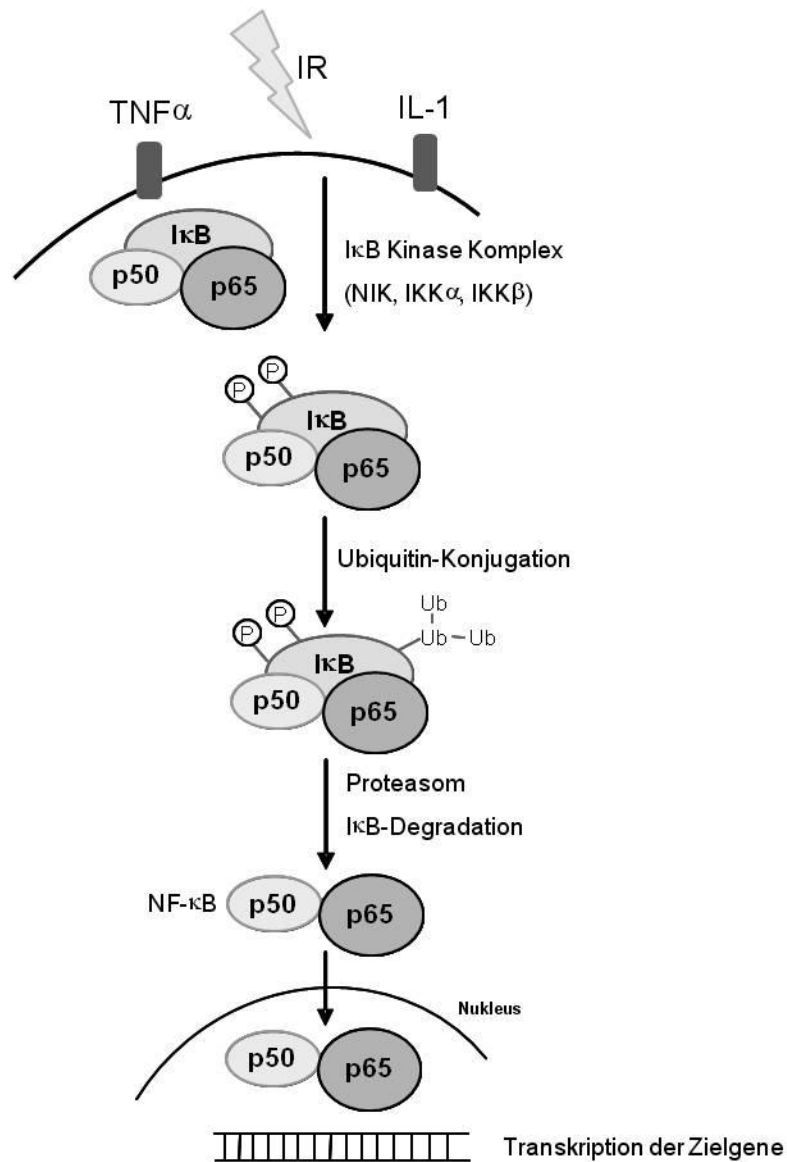


Abb. 1: *NF-κB* Signaltransduktionsweg, modifiziert nach Thanos, 1995

1.3 Metastatische Kaskade/Hämatogene Metastasierung

Der französische Chirurg Joseph de Récamier benutzte den Terminus „Metastasierung“ im Jahr 1829, um das Wachstum von sekundären Tumoren zu beschreiben, die sich nicht in der direkten Nachbarschaft eines Primärtumors befinden (Recamier, 1829). Im Jahr 1865 folgte die Beobachtung einer hohen Inzidenz von oberflächlichen Venenentzündungen bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren (Trousseau, 1865). Diese Kenntnis wurde durch Theodor Billroth's Theorie im Jahre 1878 unterstützt, nach

welcher Tumorzellen in Gerinnungsthromben des Primärtumors überleben können und nach Abscheidung in den Blutkreislauf als Emboli im Lumen kleinerer Gefäße steckenbleiben (Billroth, 1878). Nach heutigen Kenntnissen versteht man unter dem Begriff Metastasierung eine Ausbreitung von Tumorzellen eines Primärtumors im Körper, die nachfolgende Besiedlung von sekundären Geweben oder Organen und das Wachstum in diesen (Liotta, 1992; Abati 1996). Die Bildung von Metastasen beruht auf einer komplexen, miteinander interagierenden Kaskade von Einzelschritten, welche jeweils notwendig sind und gleichzeitig limitierend wirken (Fidler, 2002; Fidler, 2008; Talmadge 2010). Die Mehrzahl an Tumorzellen besitzt jedoch nicht die Fähigkeit als Einzelzelle zu überleben oder jeden für die Metastasierung notwendigen Einzelschritt erfolgreich zu absolvieren, was zu einer hohen metastatischen Ineffizienz führt (Wong, 2001; Kim, 2004). Offensichtlich benötigen metastasierende Tumorzellen zusätzliche Faktoren, um jeden Einzelschritt erfolgreich zu absolvieren (Hynes, 2003). Nur 0,01 % aller Tumorzellen, welche die Zirkulation erreichen, können letztendlich Metastasen ausbilden (Liotta, 1974). Der Prozess der Metastasierung beginnt zunächst mit der Migration von einzelnen Tumorzellen mit erhöhter Motilität oder ganzen Zellgruppen des Primärtumors in das umgebende gesunde Stroma (Invasion), ausgelöst durch gesteigerte proteolytische Degradation von extrazellulären Komponenten (Pantel, 2004; Cavallaro and Christoferi, 2004). Die malignen Zellen können nun aktiv in Blut- oder Lymphgefäße einwandern. Sind die Tumorzellen in das hämatogene System gelangt (Intravasation), werden die Tumorembolien vom Blutstrom abtransportiert (Dissemination) und müssen in der Lage sein, die Immunverteidigung des erkrankten Individuums sowie die Turbulenzen im Kreislaufsystem zu überleben (Fidler, 2002; Chambers, 2002). Einzelne Tumorzellen oder Embolien setzen sich in dem Kapillarbett eines entfernt liegenden Organs fest (Arretierung) und haften sich an das Gefäßendothel (Adhäsion) (Al-Mehdi, 2000). Der anschließende Schritt der Extravasation beinhaltet wiederum die Transmigration der malignen Zellen durch das Endothel, sowie Abbau und Überwindung der Basalmembran, um dann abschließend im Organparenchym durch Proliferation eine Mikrometastase zu etablieren. Damit diese mikroskopisch kleinen Tumorkläsionen in dem Wirtsorgan Makrometastasen ausbilden können, benötigen sie wiederum eine Versorgung mit Nährstoffen durch neu zu entwickelnde Gefäße (Angiogenese). Ferner müssen sie einen Weg finden, sich permanent den Verteidigungssystemen des neuen Wirts zu entziehen. Wird nur einer dieser beschriebenen Schritte nicht komplett vollzogen, führt dies zur Elimination der Tumorzelle(n). Die komplexen Vorgänge bei Metastasierungsprozessen sind in Abb. 2 schematisch dargestellt.

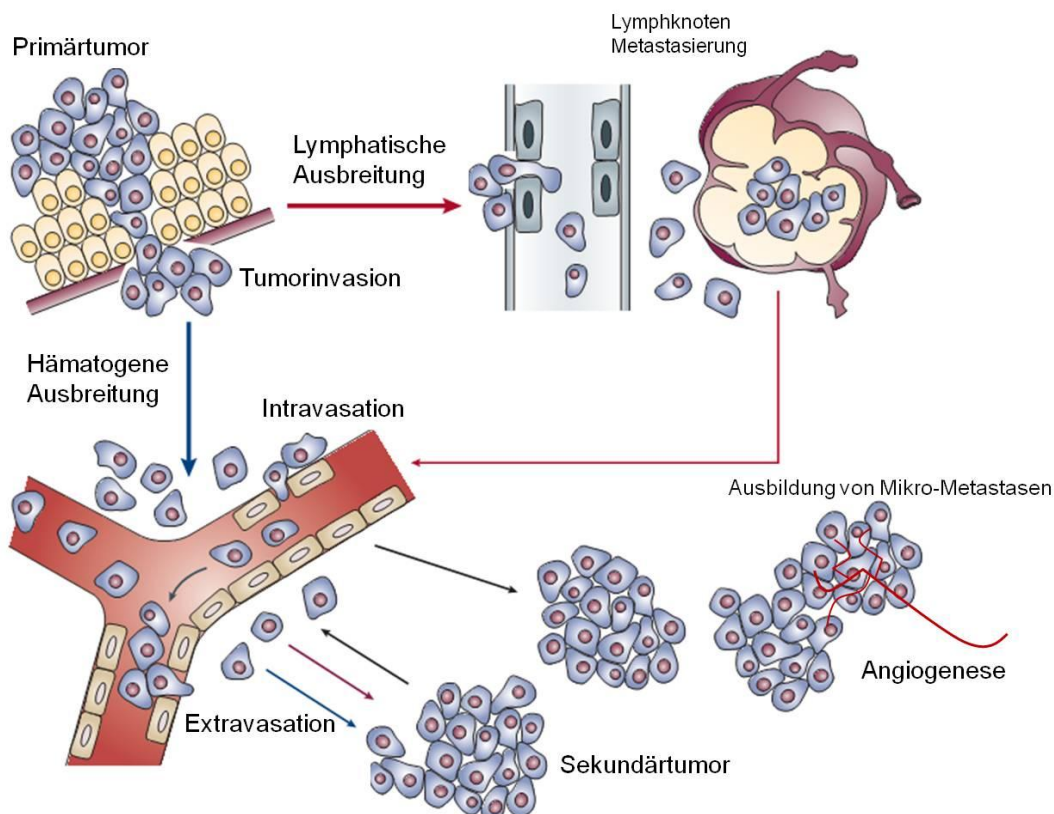


Abb. 2: Schematische Darstellung der hämatogenen und lymphatischen Metastasierung.

Die Abbildung stellt den Ablauf der metastatischen Kaskade mit folgenden Einzelschritten dar: Lymphatische Ausbreitung mit Bildung von Lymphknoten-Metastasen, sowie Ausbreitung über das hämatogene System über Tumorinvasion nach Ablösen von einzelnen Zellen vom Primärtumor; Überwindung der Basalmembran und Intravasation in das Blutsystem; Transport durch den Organismus; mechanischer Arrest oder Arrest durch Wechselwirkung mit dem Gefäßendothel; Extravasation; Ausbildung von Mikrometastasen und Angiogenese zum Anschluss an die Blutversorgung. (Abbildung modifiziert nach Pantel, 2004.)

Besonders der Schritt der Extravasation und die anschließende Transmigration der Tumorzellen bedürfen einer festen Adhäsion ans Endothel. Diese Aufgabe wird durch verschiedene Mitglieder aus der Gruppe der Adhäsionsmoleküle übernommen. Diese können basierend auf ihren biochemischen Strukturen in vier Gruppen eingeteilt werden: Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie, Integrine, Cadherine und die Selektine.

1.4 Immunglobulin-Superfamilie

Die endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie. Sie sind durch charakteristische Ig-Domänen von 70-120 Aminosäuren Länge und eine typische räumliche Struktur charakterisiert. ICAM-1 (CD54) wird neben Endothelzellen auch auf anderen Zellen (z. B. Epithelzellen, Fibroblasten) und Leukozyten nachgewiesen (Hubbard, 2000). Wie E-Selektin (siehe unten) ist ICAM-1 auf ruhenden Zellen gering exprimiert und wird nach pro-inflammatorischer Stimulation der Endothelzellen transkriptional hochreguliert. Die in wesentlichen Anteilen NF- κ B-abhängige Expressionssteigerung erreicht in Abhängigkeit des Stimulus nach ca. 18-24 h ihr Maximum (Ledebur, 1995). Die extrazelluläre Domäne des einkettigen Glykoproteins besteht aus 5 Ig-ähnlichen Domänen. Die Bildung von ICAM-1 führt zur Aktivierung zahlreicher, u. a. Tyrosin- und MAP-Kinasen umfassenden, Signaltransduktionswegen in Endothelzellen (Hubbard, 2000). VCAM-1 (CD106) wird von pro-inflammatorisch aktivierten Endothelzellen (Moore, 1992) und u. a. Epithelzellen (Bloemen, 1993) exprimiert. Endothelzellen zeigen keine konstitutive Expression von VCAM-1; eine Steigerung der transkriptionell regulierten Expression ist ca. 2-4 h nach Stimulation detektierbar. Das Maximum an VCAM-1-Protein kann nach ca. 16-24 h auf der endothelialen Oberfläche nachgewiesen werden. VCAM-1 ist neben der Vermittlung des Rollens und Adhärenzens von PMN (Polymorphonukleären Neutrophilen Granulozyten) an Endothelzellen ebenfalls in der Lage Mono- und Lymphozyten, sowie verschiedene Tumorzellen zu binden (Elices, 1990).

1.5 Integrine

Die Integrine bilden eine Familie von membranständigen Glykoproteinen und agieren als Zelloberflächenrezeptoren, die spezifisch an Elemente der Basalmembran und der Extrazellulären Matrix binden, wie z. B. Laminin, Tenascin, Fibronectin und/oder Kollagen (Koretz, 1991; Ruoslahti, 1991; Parise und Phillips, 1986). Ihr charakteristischer Aufbau besteht aus einer größeren α - und einer kleineren β -Kette, die nicht kovalent miteinander assoziiert sind und deren flexible Kombination zur Spezifität ihrer Liganden führt (Humphries, 2000; Eble, 2001). Bisher konnten 18 verschiedene α - und 8 verschiedene β -Untereinheiten identifiziert werden (Albelda, 2001; Seftor, 1999). So wurde auch herausgefunden, dass an der Oberfläche von humanen Kolonkarzinomzellen viele unterschiedliche Integrine exprimiert werden (Koretz, 1991). Durch die ständig sich

verändernden Gewebeumgebungen sind metastasierende Krebszellen jeweils neuen Matrixkomponenten ausgesetzt. Folglich benötigt eine erfolgreiche Bildung von Sekundärtumoren am Zielorgan die Anpassung der möglichen α - oder β -Integrin-Untereinheiten mit unterschiedlichen Substratpräferenzen an die umgebende Matrix. Tatsächlich konnte in Krebszellen ein Wechsel in der Integrinexpression beobachtet werden. Integrine, die bevorzugt an die Extrazelluläre Matrix von normalen Epithelien binden, wurden durch Integrine ersetzt, die vorzugsweise an die degradierten, stromalen Komponenten eines befallenen Organs binden, und somit eine nachfolgende Invasion ermöglichen (Lukashev und Werb, 1998). Das invasive Verhalten der Zellen konnte durch experimentell erzwungene Überexpression von verschiedenen Integrinuntereinheiten in kultivierten Zellen induziert oder gehemmt werden (Varner und Cheresch, 1996). Nachdem die Tumorzellen sich an die Extrazelluläre Matrix und Basalmembran angeheftet und Matrix-degradierende Substanzen (z. B. Matrixmetalloproteinasen) produziert haben, ist eine erneute Ablösung erforderlich, um in das darunterliegende Stroma migrieren zu können. Diese Assoziation von graduelltem Abfall der Integrinexpression mit der Tumorprogression konnte von Pignatelli (1990, 1994) gezeigt werden.

1.6 Cadherine

Die Superfamilie der Cadherine besteht aus transmembranösen, Calcium-bindenden Glykoproteinen, die in 5 verschiedene Untergruppen eingeteilt werden. Aus der Superfamilie sind mehr als 100 verschiedene Cadherine identifiziert worden: (1) die klassischen Cadherine (Typ 1), wie E-, P-, N- und R-Cadherine; (2) klassische Cadherine (Typ 2), wie VE- oder K-Cadherin; (3) Desmosomale Cadherine (Desmoglein, Desmocollin); (4) Protocadherine und (5) Cadherin-verwandte Proteine, wie z. B. Flamingo (Peinado, 2004; Suzuki, 1996; Aberle, 1996). Alle Mitglieder weisen mindestens eine charakteristische extrazelluläre Cadherin (EC)-Domäne in ihrer extrazellulären Domäne auf, die aus mindestens 100 AS besteht (Takeichi, 1991). Ein Beispiel für die komplexen Zell-Zell-Interaktionen stellt der E-Cadherin/Catenin-Zell-Zell-Adhäsionskomplex dar. E-Cadherin gehört zu den klassischen Cadherinen Typ 1 und ist essentiell für die Ausbildung funktionsfähiger Zell-Zell-Kontakte in epithelalem Gewebe (Kemler, 1993). Damit diese Funktionsfähigkeit gewährleistet ist, ist eine Assoziation mit dem Zytoskelett über eine Verbindung mit Proteinen der Catenin-Familie notwendig. Die Verknüpfung von Zellen über E-Cadherin-Brücken resultiert in einer Ausschüttung von

negativen Proliferationssignalen durch zytoplasmatischen Kontakt mit β -Catenin (Christofori und Semb, 1999). E-Cadherin agiert somit als ein Antagonist des invasiven und metastasierenden Potentials von epithelialen Krebsformen. Allerdings sind dessen antimetastatische Funktionen durch unterschiedliche Mechanismen in der Mehrzahl von epithelialen Krebsarten verlorengegangen. Ein Verlust von E-Cadherin-haltigen interzellulären Kontakten stellt einen sehr frühen Schritt in der metastatischen Dissemination von malignen Zellen dar und wird mit der Progression epithelialer Tumore assoziiert (Birchmeier und Behrens, 1994).

1.7 Selektine

Die Selektine sind C-Typ-Lektine, die Ca^{2+} -abhängig Kohlenhydratstrukturen binden und erst in den 1980-er Jahren entdeckt und charakterisiert wurden (Bevilacqua, 1989; Bevilacqua 1991, Bevilacqua 1993). Sie binden Glykane, die Lactosaminoeinheiten mit α 2,3-verknüpfter Sialinsäure und α 1,3- oder α 1,4-verknüpfter Fucose enthalten. Die Familie der Selektine besteht aus drei Mitgliedern, die untereinander einen hohen Verwandtschaftsgrad aufweisen: P-Selektin (CD62P, PADGEM), L-Selektin (CD62L, LECAM-1) und E-Selektin (CD62E, ELAM-1). Im Laufe der Säugerentwicklung sind die drei Selektine hochkonserviert und unterscheiden sich in ihrer Lektindomäne von murinem, bovinem oder humanem Selektin kaum (Tedder, 1995). Die Buchstaben P, L und E stehen für die zelluläre Lokalisation der verschiedenen Selektine. So findet man P-Selektin auf Blutplättchen (engl. Platelets) und Endothelzellen, L-Selektin auf Leukozyten und E-Selektin auf Endothelzellen. Alle drei Selektine haben homologe Strukturen, die in fünf Domänen und eine membran-nahe Spaltungsregion eingeteilt werden. Die extrazelluläre Domäne jedes Selektins besteht aus drei unterschiedlichen Sub-Domänen: einer C-Typ Lektin-Domäne am N-Terminus, einer EGF-Typ Domäne (aufgrund der Ähnlichkeit mit dem epidermalen Wachstumsfaktor) und einer kurzen Konsensus-Wiederholung (ungefähr 60 Aminosäuren), der sog. SCR-Typ Domäne (Tedder, 1995; Chou, 1995). Die Anzahl dieser SCR-Wiederholungen ist die Hauptstruktur, die jedes Selektin unterscheidet. Verankert werden die Selektine durch eine einfache helikale Transmembran-Domäne, gefolgt durch eine kurze zytoplasmatische Region. P-, L- und E-Selektin weisen im Bereich der Lektin-Domäne eine Sequenzhomologie von 60 % auf. Ein Unterschied besteht in der Anzahl der SCR. Während L-Selektin nur 2 SCR besitzt, verleihen sechs SCR beim E-Selektin und neun SCR bei P-Selektin diesen Vertretern

eine gewisse räumliche Reichweite, die für die Präsentation der Lektin-Domäne bei Bindungsprozessen von Vorteil ist (Vestweber und Blanks, 1999). Abbildung 3 zeigt schematisch den Aufbau von Selektinen.

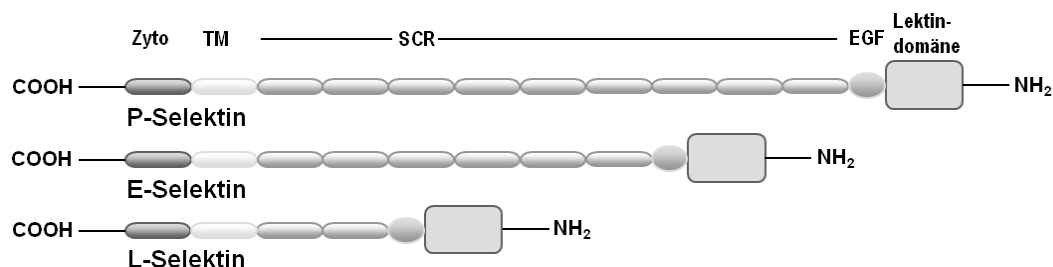


Abb. 3: Schematische Abbildung über den Aufbau von Selektinen.

Die drei Vertreter der Selektinfamilie P-, E- und L-Selektin in schematischer Darstellung (nach Hanley, 2004). Am C-terminalen Ende befindet sich die zytosolische Domäne (Zyto). Auf die transmembranäre Domäne (TM) folgen die Short-Consensus-Repeats (SCR), an die sich die EGF-Domäne (EGF) anschließt, gefolgt von der Lektin-Domäne am N-terminalen Ende.

Unter physiologischen Bedingungen sind Selektine für die Rekrutierung von Leukozyten im Zuge von Entzündungsprozessen verantwortlich. Dabei übernehmen Selektine durch eine Calcium-abhängige Bindung ihrer Liganden die Funktion der initialen Kontaktaufnahme zwischen Endothelzellen und Leukozyten (Ley, 2003). Zunächst kommt es dabei zu sprunghaften Bewegungen der Leukozyten, die später in eine charakteristische Rollbewegung entlang des Endothels übergeht. Diese beiden Vorgänge werden als „tethering“ und „rolling“ bezeichnet. Dadurch kommt es zu einer Abbremsung der Leukozytenbewegung, die mit einer vermehrten Präsentation von Selektinen und weiteren Zelladhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche einhergeht und letztendlich zu einer Transmigration der Leukozyten in das entzündete Gewebe führt (Springer, 1995).

1.7.1 E-Selektin

E-Selektin wurde 1987 erstmals als zytokininduzierbarer Adhäsionsrezeptor von Myeloblasten auf humanen umbilikalen Venenendothelzellen (HUVEC) beschrieben (Bevilaqua, 1987). Heute ist bekannt, dass dieses Selektin auf Endothelzellen exprimiert werden kann. Diese Zellen präsentieren unaktiviert kein E-Selektin und die Stimulierung der endothelialen Zellen erfolgt durch Mediatoren wie TNF- α oder IL-1 auf

transkriptioneller Ebene. Die Genexpression wird durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B gesteuert, für den es drei Bindungsstellen auf dem E-Selektin-kodierenden Gen gibt (Schindler und Baichwal, 1994; Yao, 1999). E-Selektin wird aufgrund seiner verzögerten Expressionskinetik erst einige Stunden später auf der Endothelzelloberfläche präsentiert, mit einem Maximum von 4 h bis 8 h nach Stimulation. Das neu synthetisierte SelektinGrundgerüst gelangt in das endoplasmatische Retikulum, in dem sich reichlich Mannose-N-verknüpfte Oligosaccharide befinden. Die Selektine werden posttranslational im Golgi-Apparat glykosyliert und danach in dieser Form an der Zelloberfläche präsentiert (Bevilaqua, 1989). E-Selektin besitzt zudem eine relativ geringe Halbwertszeit von wenigen Stunden, da es wesentlich schneller als die meisten anderen Membranproteine internalisiert wird, über Endosomen in Lysosomen gelangt und dort abgebaut wird (Asmuth, 1992; Kuijpers, 1994). Nach 16-24 Stunden verringert sich die Proteinsynthese, und es werden - selbst in Gegenwart der genannten Zytokine - wieder die niedrigen Ausgangswerte erreicht (Bevilaqua, 1989).

1.7.2 L-Selektin

L-Selektin wird konstitutiv auf Leukozyten, hier vor allem auf T-Zellen, exprimiert und wurde erstmals 1983 als Antigen für zelladhäsionsblockierende Antikörper beschrieben. Es ist verantwortlich für das sog. „homing“ von Leukozyten in sekundärem lymphoidalem Gewebe (Stoolman, 1983) und für die Bindung von Neutrophilen an Endothelzellen. Es wurde gefunden, dass der monoklonale Antikörper (MAb) MEL14 in den Lymphknoten von Mäusen die Bindung von Lymphozyten an endotheliale Venolen (HEV) blockiert (Gallatin, 1983). Schließlich konnten Affinitäten der dabei beteiligten Phosphatmannose (Yednock, 1987) und dem MEL14-Antigen nachgewiesen werden, welches daraufhin Selektin genannt wurde.

1.7.3 P-Selektin

P-Selektin wird ebenfalls konstitutiv synthetisiert und die Speicherung erfolgt in den α -Granula der Thrombozyten und in den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen (de Leeuw, 1999). Nach Stimulation der Zellen mit Mediatoren wie Histamin, Fibrin oder Thrombin gelangt es innerhalb von Minuten an die Zelloberfläche. Außerdem wird P-Selektin nach Zellaktivierung mit Zytokinen oder Lipopolysacchariden (LPS) durch Aktivierung der Transkription neu synthetisiert. Nach Präsentation des P-Selektins an der

Zelloberfläche wird es innerhalb von 30-60 min durch Endozytose (mittels clathrin coated pits) internalisiert und durch komplexe Signalmechanismen entweder in die Speicher zurückgeführt oder im Lysosom abgebaut (Subramanian, 1993).

1.8 Selektinliganden und Counterrezeptoren bei der hämatogenen Metastasierung

Die Extravasation von Tumorzellen durch das Endothel in das umliegende Gewebe wird häufig als ein einzelner Schritt der Metastasierungskaskade angesehen. Genauer betrachtet kann die Extravasation aber in zahlreiche Einzelschritte unterteilt werden, in denen Adhäsionsmoleküle unterschiedliche Rollen spielen. Die Wechselwirkung von Tumorzellen mit Endothelzellen legt eine Beteiligung von Selektin-Ligand-Wechselwirkungen als Komponente dieser Interaktion nahe und soll im Folgenden näher betrachtet werden. Die Selektinliganden umfassen eine heterogene Gruppe von transmembranären Glykoproteinen und Glykolipiden, die den Selektinen bestimmte Kohlenhydratstrukturen präsentieren. Fast alle Zelladhäsionsmoleküle im lebenden Organismus binden auf der Basis von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Deshalb erscheint es ungewöhnlich, dass die Selektine an Strukturen binden, die aus einem Proteingerüst oder einem Lipidträgermolekül bestehen, welche mit bestimmten Kohlenhydratverbindungen modifiziert sind. Das Proteingerüst ist dabei alleine nicht in der Lage, für die Selektine als erkennbarer Ligand zu fungieren. Es stellt lediglich eine Grundstruktur dar, die erst durch enzymatische Glykosylierung ihre Lektinaffinität verliehen bekommt. Prinzipiell sind Selektinliganden rutenartige, saure Glykoproteine. Sie sind langgestreckt und tragen an ihren NH₂- bzw. OH-gruppenreichen Seitenketten über Asparagin N-verknüpfte bzw. über Threonin und Serin O-verknüpfte Oligosaccharide. Die O-glykosidreichen Ligandstrukturen werden Mucine genannt. Diese Glykokonjugate stellen die eigentlichen Bindungsepitope dar und werden vom Protein in ihrer Gesamtheit als ein hochaffiner Selektinligand präsentiert. Von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist bekannt, dass sie nur unter einer sehr hohen Spezifität und Selektivität zustande kommen. Bei den Selektinliganden lässt sich dagegen eine solche ausgeprägte Spezifität zu ihren Rezeptoren nicht erkennen. So können selektinbindende Oligosaccharide ihre Bindungsaffinität auf verschiedene Trägermoleküle übertragen (Varki, 1994). Selbst saccharidmodifiziertes BSA ist in der Lage, an Selektine zu binden (Berg, 1991).

Ein weiterer Punkt, in dem sich Kohlenhydrat- von Proteinwechselwirkungen unterscheiden, ist in der schwachen Bindungsstärke von Lektinen und Selektinen zu einzelnen Glykokonjugaten zu finden. Es gibt nur eine geringe Anzahl von Glykoproteinen, die wiederum mit einer begrenzten Anzahl von Oligosacchariden modifiziert sind, die zu den hochaffinen Bindungspartnern der Selektine gezählt werden können. Nur sie werden als die eigentlichen physiologischen Selektinliganden betrachtet. Essentielle Kohlenhydratgrundstrukturen an den bisher gefundenen Selektinliganden sind die Sialinsäure und die Fucose. O-verknüpfte fukosylierte Sialinsäurederivate mit dem Protein werden auch Sialomucine genannt.

Im Jahr 1992 konnten Foxall et al. zeigen, dass alle drei Selektine das sialysierte Lewis^x (sLe^x, NeuNAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4[Fuc α 1 \rightarrow 3]GlcNAc-O-R)² binden (Foxall, 1992). Neben sLe^x (siehe Abbildung 4) bindet auch sein Positionsisomer sLe^a (Neu5Ac α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3[Fuc α 1 \rightarrow 4]GlcNAc-O-R) alle drei Selektine mit gleicher Affinität (Handa, 1991; Berg, 1991).

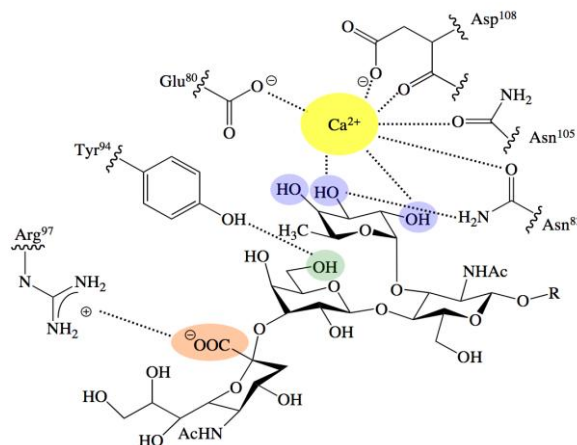


Abb. 4: Molekulare Struktur von Sialyl Lewis X.

Dieses Tetrasaccharid bestehend aus Fucose, Galaktose, N-Acetylglucosamin und Sialinsäure ist das kleinste Bindungsepitop, das von allen drei Selektinen erkannt wird. Hier ist sLe^x in der Bindungstasche von E-Selektin dargestellt. An der Bindung der Lektindomäne der Selektine sind die negative Ladung der Sialinsäure, sowie die 2-, 3- und 4-ständige Hydroxygruppe der Fucose und die 6-ständige Hydroxygruppe der Galaktose beteiligt. Die Bindung wird über Ca²⁺ koordiniert.

Eine Möglichkeit von Tumorzellen am Endothel zu adhären, stellen die Wechselwirkungen von E-Selektin mit tumorzellspezifischen Liganden dar. Verschiedene sLe^x- und sLe^a-tragende Liganden konnten auf Mammakarzinomzellen, Prostatakarzinomzellen oder Kolonkarzinomzellen nachgewiesen werden, ebenso wie die hohe Bindungsfähigkeit dieser Tumorzellen an endotheliales E-Selektin (Rice, 1989; Takada, 1991; Matsuura, 1998).

Eine Expression des E-Selektin-Liganden ESL-1 (E-Selektin Ligand-1) konnte auf Tumorzellen noch nicht zweifelsfrei gezeigt werden, jedoch konnte PSGL-1 (P-Selektin Ligand-1), das neben P-Selektin auch E-Selektin bindet, auf Tumorzellen detektiert werden. Das Gleiche gilt auch für die Isoform des sogenannten Counter-Rezeptors CD44, der neben Hyaluronsäure und anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix auch E-Selektin binden kann (Hanley 2004, Hanley, 2005; Hanley, 2006). Als weitere potentielle Liganden für E-Selektin sind auch β^2 -Integrine und Glykolipide zu nennen (Kotovuori, 1993; Alon, 1995). Der „jüngste“ E-Selektin Ligand ist „death receptor-3“ (DR3), der auf den Kolonkarzinomzelllinien LoVo und HT29 exprimiert wird. Er kann durch E-Selektin aktiviert werden und führt nach Kinaseaktivierung zur endothelialen Transmigration der Tumorzellen (Gout, 2006).

1.9 Inhibitoren - Sialyl Lewis X-Mimetika - Glycyrrhizin

Glycyrrhizin (Synonym: Glycyrrhizinsäure) gehört zur Familie der Saponine oder Triterpenoide, die sich als C30-Verbindungen formal aus 6 Isopreneinheiten aufbauen lassen, und befindet sich bis zu 14 % als Kalium- und Calciumsalz in der Wurzel der in Europa und im vorderen Orient angebauten Süßholzpflanze. Es wird traditionell in der Chinesischen und Indianischen Medizin für die Behandlung von Lungenkrankheiten angewandt und zeigt zudem antispasmodische und vor allem anti-inflammatorische Wirkungen (Baltina, 2003). Der aus der Pflanze gewonnene Glycyrrhizin-haltige Süßholzsafte dient u. a. auch als Rohstoff zur Herstellung von Lakritzwaren, sowie als Süßstoff oder Gewürz (Ahamed, 2001) und beinhaltet verschiedene Subklassen an Flavonoiden, Flavonen und Chalkonen (Asano, 2003; Fu, 2004; Kang, 2005; Somjen, 2004). Glycyrrhizin, das wichtigste bioaktive Triterpensaponin und sein Aglycon 18 α -Glycyrrhetininsäure besitzen eine große pharmakologische Wirkbreite. So konnte nachgewiesen werden, dass Süßholzwurzelkomponenten anti-inflammatorische Effekte aufweisen im Hinblick auf Monozyten-Trafficking am aktivierten Endothel (Hyang-Mi, 2007; Rao 1994). Durch die analoge Struktur zu sLe^x ist Glycyrrhizin (Abb. 5) in der Lage

an Selektine (z. B. E-Selektin) zu binden und somit die Bindung zwischen Leukozyten bzw. Tumorzellen und Endothelzellen zu inhibieren.

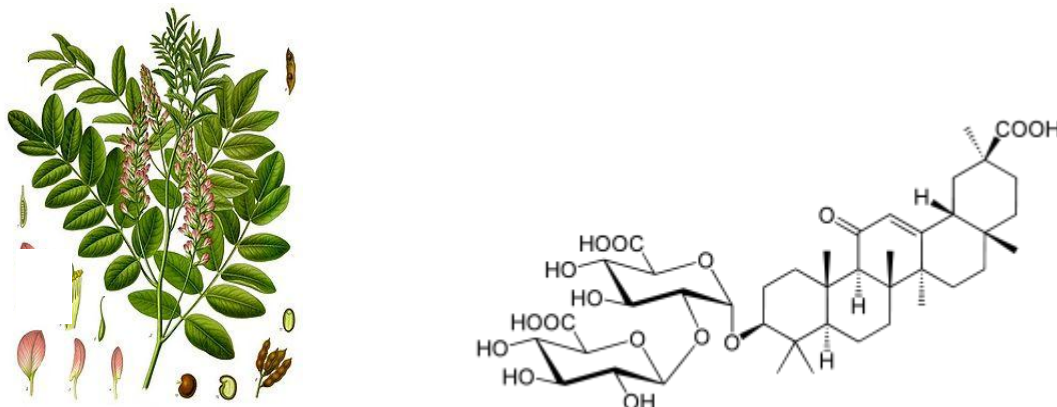


Abb. 5: Süßholzpflanze (*Glycyrrhiza glabra*) und Strukturformel von Glycyrrhizin.

((3 β ,20 β)-20-Carboxy-11-oxo-30-norolean-12-en-3-yl-2-O- β -D-glucopyranuronosyl- α -D-glucopyranosiduronsäure)

1.10 Kleine GTP-bindende Proteine

Die Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine umfasst mehr als 150 Mitglieder, die funktionell und strukturell in fünf Untergruppen eingeteilt werden können: die Ras- (*rat sarcoma*), Rho-, Rab-, Arf/Sar1- („ADP-ribosylation factor“) und die Ran-Familie (Takai, 2001; Bourne, 1990a, Bourne 1990b; Hall, 1990; Takai, 1993; Garcia-Ranea und Valencia, 1998; Lazar, 1997). Während die Untergruppe der Ras-Proteine hauptsächlich an der Regulation der Zellproliferation, der Genexpression und der Zelldifferenzierung beteiligt ist, steuert die Untergruppe der Ran-Proteine vor allem den Transport zwischen Zytoplasma und Nukleus während des Zellzyklusses, sowie die Mikrotubuliorganisation. Der intrazelluläre Vesikeltransport wird über die Mitglieder der Rab- und Arf/Sar1- Familie reguliert. Zur letzten Untergruppe der Ras-Superfamilie gehören die sogenannten monomeren Rho- (*ras homologous*) Proteine, welche in allen eukaryotischen Spezies ubiquitär exprimiert werden und hoch konserviert sind (Wheeler und Ridley, 2004; Boureux, 2007). Im humanen Genom wurden über 20 Gene gefunden, welche für Proteine der Rho-Familie kodieren. Sie haben ein Molekulargewicht von 20-40 kDa und eine Sequenzidentität der GTPase-Domäne von 40 bis 95 % innerhalb der Familie, bzw. 30 % zu Mitgliedern der Ras-Familie. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Sequenzidentität werden die 25 Mitglieder der Rho-Familie in acht verschiedene Unterfamilien eingeteilt:

Rac, Cdc42, Rho, Rnd, RhoBTB, RhoH, RhoU/V und RhoD/F, mit jeweils mehreren Mitgliedern (Boureux, 2007; Wennerberg und Der, 2004). Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit haben die Rho-GTPasen unterschiedliche zelluläre Funktionen. Initial wurden sie als zentrale Regulatoren des Mikrofilamentsystems beschrieben, jedoch zeigten weitergehende Untersuchungen, dass sie als molekulare Schalter auch andere bedeutende Zellfunktionen regulieren. So fungieren sie hauptsächlich als Regulatoren des Aktinzytoskeletts und beeinflussen damit die Zellmorphologie, Zell-Zell-Kontakte, die Endo- und Exozytose, die Zellmigration sowie die Zelladhäsion (Etienne-Manneville, 2002). Zusätzlich sind sie auch an der Transkription, dem Zellzyklus sowie der Zelldifferenzierung beteiligt (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997).

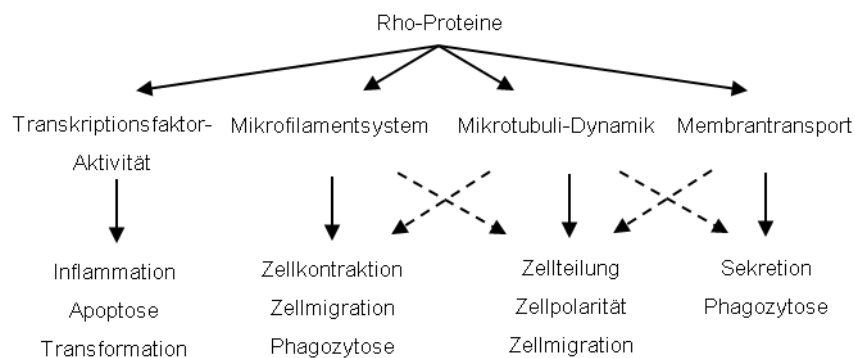


Abb. 6: Funktion von Rho-GTPasen.

Als zentrale Schaltmoleküle beeinflussen Rho-Proteine wichtige Zell- und Gewebefunktionen. Interaktionen zwischen verschiedenen Rho-Proteinen als auch Rho-Protein-abhängiges „signaling“.

Die Familie der kleinen Rho-GTPasen besitzt eine 21 kDa große G-Domäne, die aus 6 β -Faltblättern besteht, die von 5 α -Helices umgeben sind. Die katalytische G-Domäne ist bei allen Mitgliedern der Ras-Superfamilie gleich und stellt die Voraussetzung für die Interaktion mit GDP und GTP dar. Für den Nukleotidaustausch notwendig sind die sog. N-terminalen konservierten Motive, hoch konservierte Bereiche, die für die Bindung von Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*, GDIs), von Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors*), von GTPase-aktivierenden Proteinen (*GTPase activating proteins*, GAPs) und von Effektorproteinen notwendig sind. Sie überlappen mit den sog. *switch I*- und *switch II*-Bereichen (Dvorsky und Ahmadian, 2004), mit denen kleine Rho-GTPasen ihre katalytische Funktion ausüben (Milburn, 1990). Rho-Proteine sind Guanin-Nukleotid

bindende Proteine, die als intrazelluläre Schalterproteine agieren und zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen Konformation und einer aktiven GTP-gebundenen Form wechseln (Hall, 1990). Die Interaktion mit zahlreichen Effektormolekülen findet nur im aktiven GTP-gebundenen Zustand statt und reguliert eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen. Beide Konformationszustände werden durch die Aktivität der drei regulatorischen Faktoren GAP, GEF und GDI bestimmt. Inaktive GDP-gebundene Rho-GTPasen liegen in einem Komplex mit GDI im Zytosol vor. Rho-GDIs verhindern somit die spontane Ablösung von GDP und stabilisieren die inaktive Form, mit gleichzeitiger Inhibierung einer Interaktion mit der Zellmembran, welche für die Aktivierung der Rho-GTPasen (durch GEFs) notwendig ist (1999; Hansen und Nelson, 2001). Die Aktivierung der Rho-GTPasen wird meist durch Stimulation von Oberflächenrezeptoren wie z. B. Zytokinrezeptoren, Rezeptor-Tyrosinkinasen oder Adhäsionsrezeptoren initiiert (Kjoller, 1999). Die Aktivierung erfolgt über Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (Guanine nucleotide exchange factors, GEFs) und einem Transport von GTPasen an die Zellmembran. Die Interaktion der Rho-GTPasen mit GEFs ermöglicht die Freisetzung von GDP und Mg^{2+} , wodurch die GTPase nukleotidfrei vorliegt. Nach Dissoziation der GEFs kann GTP, welches in der Zelle gegenüber GDP im 10-fachen Überschuss vorliegt, an die GTPase binden und diese in den aktiven Zustand überführen. Die daraus resultierende Konformationsänderung ermöglicht nun die hochaffine Interaktion mit verschiedenen Effektoren und dient somit der Signalweiterleitung. Die Weiterleitung des Signals bleibt solange aufrechterhalten, bis es zur Hydrolyse des Rho-GTPase/GTP-Komplexes kommt. Die Hydrolyse wird durch GAP katalysiert und stimuliert die intrinsische GTPase-Aktivität, wodurch die aktive Form in die inaktive Konformation konvertiert.

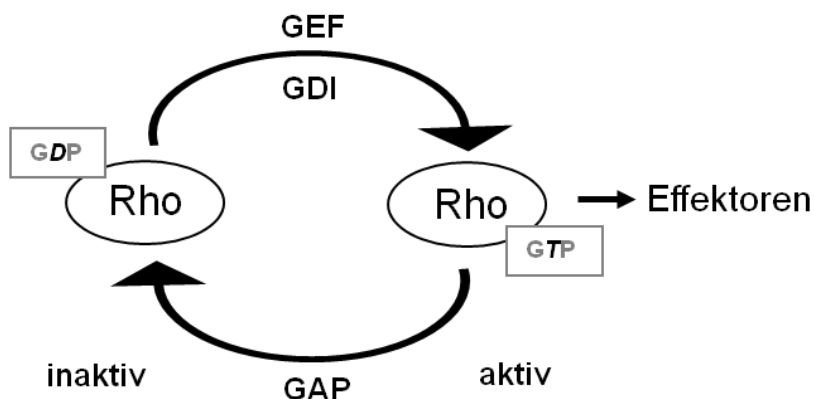


Abb. 7: Regulation kleiner GTP-bindender Proteine und deren regulatorische Proteine.

Kleine GTP-bindende Proteine wechseln zwischen einer GDP-gebundenen, inaktiven und einer GTP-gebundenen, aktiven Konformation. Ihre Aktivität wird durch GDP/GTP-Austauschfaktoren (GEFs, aktivierend), GDP-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs, inaktivierend) und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs, inaktivierend) reguliert.

Auch bei der Extravasation spielen Rho-GTPasen eine bedeutende Rolle. Ein wichtiger Schritt hierbei ist das Durchqueren der Tumorzelle durch das Endothel, um in das umliegende Gewebe zu gelangen. Der molekulare Mechanismus dieser Zell-Diapedese ist noch nicht vollständig geklärt. Zwei mögliche Prozesse werden in Betracht gezogen: zum einen eine parazelluläre (die Migration zwischen den Endothelzellen) und eine transzelluläre (die Migration durch das Endothelium an „nonjunctional locations“) Extravasation (Engelhardt, 2004). Wichtig für diese Prozesse sind Veränderungen im Zytoskelett, in die vor allem Aktin- und Mikrotubulifilamente involviert sind. Die Dynamik dieser Filamente wiederum wird durch die kleinen GTPasen kontrolliert. So konnte gezeigt werden, dass Rho-Signaling durch die Rho-Effektor-Kinase (ROCK) die Spaltung von adhärennten Bindungen fördert, hingegen Rho-Signaling über das Effektorprotein Dia diese stabilisiert und die Zellperipherie aufrecht erhält (Sahai, 2002). Somit sind adhärennte Bindungen wichtig für die Aufrechterhaltung der endothelialen Integrität und der mikrovaskulären Permeabilität.

1.11 Statine

Statine sind HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, die zu den wichtigsten lipidsenkenden Pharmazeutika weltweit gehören. Die ursprünglich aus den Pilzen *Aspergillus terreus* und

Penicillium citrinum isolierten Wirkstoffe hemmen die Synthese von Mevalonat, der Vorstufe von Farnesylpyrophosphat und damit von Cholesterin (Alberts, 1994; Endo, 1988; Endo 1976, Kuroda & Tsujita, 1976). Statine hemmen die Isoprenylierung von GTPasen durch Depletion des zellulären Isopren-Pools und führen somit zu einer Inhibierung der Funktion dieser Signalmoleküle. In den letzten Jahren konnten pleiotrope Statin-Wirkungen auf eine Vielzahl verschiedener Zellen beobachtet werden, u. a. anti-inflammatorische Effekte (Metha, 2003). Durch die Hemmung von Rho-vermittelten Signalwegen nehmen Statine zudem Einfluss auf die zelluläre Sensitivität gegenüber IR-Strahlung (Fritz, 2003; Miller, 1993), schützen Endothelzellen vor strahleninduzierter Apoptose (Nübel, 2006) und führen zu einer NF- κ B-abhängigen Reduzierung von Tumorzell-Endothelzell-Kontakten, sowie zur Hemmung des Tumorwachstums und der Metastasierung (Kusama, 2003; Sebti, Tkalcevic und Jani, 1991).

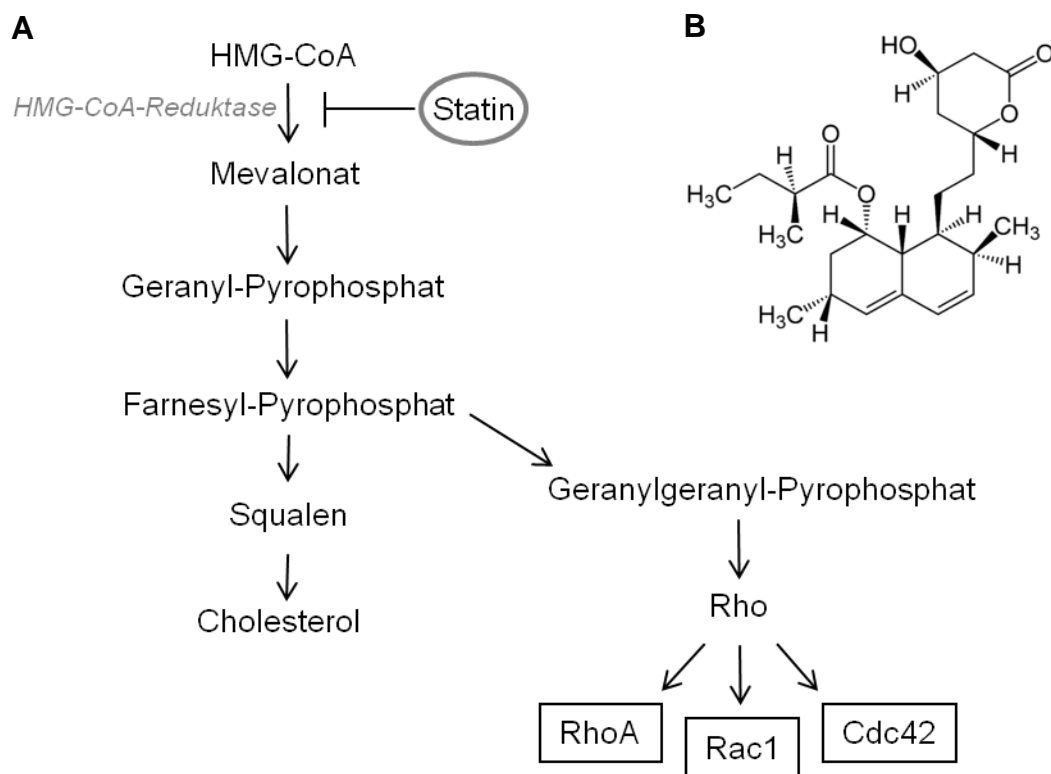


Abb. 8: HMG-CoA abhängige Synthese von Isopreneinheiten, die zur Modifikation von Rho-Proteinen verwendet werden.

- A) Statine hemmen das Schrittmachereinzym (HMG-CoA-Reduktase) dieses Syntheseweges.
 B) Strukturformel von Lovastatin.

1.12 Zielsetzung

In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Expression von Zelladhäsionsmolekülen (z. B. Selektine) auf Endothelzellen nicht nur unter physiologischen Bedingungen nach Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen stattfindet, sondern auch nach Exposition mit ionisierender Strahlung zu beobachten ist. Dies führt zu einer Steigerung von Endothelzell (EZ)-Tumorzell (TZ)-Interaktionen unter *in vitro* Bedingungen (Nübel, 2004).

Ziele der vorliegenden Arbeit sind:

- festzustellen, ob eine Bestrahlung von Tumorzellen zu einer Hochregulation von tumorspezifischen Adhäsionsmolekülen führt und ebenfalls eine Zunahme von EZ-TZ-Kontakten zur Folge hat.
- zu untersuchen, ob Effekte von ionisierender Strahlung auf Endothelzell-Tumorzell-Adhäsion auch unter *in vivo* Bedingungen detektierbar sind, d. h. ob es nach i. v. Injektion tumorigener Zellen zu einer verstärkten Extravasation und dadurch bedingten Zunahme von Lungenmetastasen kommt.
- die Prüfung der Wirkung verschiedener Substanzen (Statine, Glycyrrhizin und NSC23766) auf IR-induzierbare Effekte bezüglich Endothelzell-Tumorzell-Interaktionen *in vitro* und Metastasierungsprozesse *in vivo*.

Hintergrund der Arbeiten ist somit die Beantwortung der Frage, ob ionisierende Strahlung möglicherweise unerwünschte pro-metastatische Effekte hat und inwieweit diese adversen Strahleneffekte, welche die Wirksamkeit von Radiotherapien möglicherweise beeinträchtigen könnten, pharmakologisch inhibiert werden können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmittel

Bakterienbrutschrank	Heraeus, München
Bakterienplatten	Greiner, Frickenhausen
BD Microlance™ 3, 30 G x ½“	BD Biosciences, Heidelberg
Bio-Rad iCycler™ IQ Thermocycler	Bio-Rad, München
Bio-Rad iCycler™ My IQ Single Color RT-PCR	Bio-Rad, München
Blot-Kammer, Trans Blot Cell	Bio-Rad, München
Blot-Kammer, Mini Trans Blot Cell	Bio-Rad, München
Braun-Injekt-F, 1 ml	Braun, Melsungen
Brutschrank, NUAIRE (NU-4500E)	Zapf, Sarsted
Brutschrank, B5060 EK/CO2	Heraeus, München
[137 Cs]-Quelle Gammacell 2000	Molsgaard Medical, Dänemark
Digitalkamera Canon Powershot SX110IS	Canon, Krefeld
ECL-Filme	Amersham, Braunschweig
Elektrophoreseapparaturen	Bio-Rad, München
Feinwaage	Satorius, Göttingen
Fluoreszenzeinrichtung BX-FLA	Olympus, Hamburg
Geldokumentation GelDoc1000	Bio-Rad, München
Geltrockner	Bio-Rad, München
Lumineszenzphotometer	Berthold, Pforzheim
Microplatten Reader Sunrise RC	Tecan, Crailsheim
Mikroskop Axiovert 35	Zeiss, Jena
Mikroskop Telaval 31	Zeiss, Jena
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Nitrozellulosemembran (Protran)	Schleicher & Schuell, Dassel
Röntgenfilme (Hyperfilm MP)	Kodak, USA
Schüttelinkubator	Braun Biotech. Int., Melsungen
Spannungsquelle Power Pac 300/3000/HC	Bio-Rad, München
Spektralphotometer Titertek Multiscan Plus	Labsystems, Finnland
Sterilbank, CLASSII A/B3, NUAIR	Zapf, Sarstedt

Tischzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Turboblotter™ Downward Transfer Systems	Schleicher & Schuell, Dassel
Ultraschallstab 250	Branson, Danbury, USA
Ultra Turrax T25 basic	IKA®-Werke, Staufen
Unitwist RT	VWR, Darmstadt
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich
Wasserbad	Köttermann, Uetze-Hänigsen
Whatman 3 MM Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zentrifuge Megafuge 1.0, Rotor 3360	Heraeus, München
Zentrifuge Labofuge 400 R	Heraeus, München
Zentrifuge Fresco 21	Heraeus, München
Zentrifuge Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Discovery M120Se, Rotor S100AT6	Sorvall, Schwerte

2.1.2 Spezielle Chemikalien, Enzyme und Kits

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Gibco Life Tech, Karlsruhe
Albumin	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
APS	Merck, Darmstadt
Beta-Glo®	Promega, Mannheim
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
Calcein AM	Sigma-Aldrich, München
Cerivastatin	Calbiochem, Bad Soden
Coomassie Blue G-250	Bio-Rad, München
DMSO	Roth, Karlsruhe
DNA-Marker pBR322 DNA/AluI	Fermentas, St. Leon-Rot
ECL- und ECL-Plus-Kit	Amersham, Braunschweig
Effectene Transfection Kit	Qiagen, Hilden
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München

E.Z.N.A. Total RNA Kit	Omega Bio-Tek, Norcross, USA
Giemsa	Merck, Darmstadt
G418	Gibco Life Tech, Karlsruhe
Glycyrrhizin-Ammoniumsalz	Sigma-Aldrich, München
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, München
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Low Melting Point Agarose	Gibco Life Tech, Karlsruhe
Lovastatin	Calbiochem, Bad Soden
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Mycoplasma Detection Kit	Boehringer, Mannheim
Nonidet P40	Fluka, Neu Ulm
PBS	Biochrom, Berlin
Polyfect	Qiagen, Hilden
Ponceau S	Sigma-Aldrich, München
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, München
Proteinprobenpuffer RotiLoad 1	Roth, Karlsruhe
peqGold Proteinmarker II, 10-200 kDa	PEQLAB, Erlangen
Prestained Proteinmarker, 19-118 kDa	Fermentas, St. Leon-Rot
QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Rac1-Inhibitor NSC23766	Tocris Biosciences, Bristol, UK
RNAse A	Sigma-Aldrich, München
TNF α	Sigma-Aldrich, München
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, München
Tween-20	Sigma-Aldrich, München

Alle nicht aufgelisteten allgemeinen Laborchemikalien wurden von den Firmen Fluka (Buchs; CH), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), und Sigma-Aldrich (München) in der Qualitätsstufe p. a. bezogen.

2.1.3 Medien und Komponenten für die Bakterien- und Zellkultur

2.1.3.1 Bakterienkultur

LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1000 ml H ₂ O bidest
Agar-Platten	15 g Agar-Agar ad 1000 ml mit LB-Medium
LB-Amp/LB-Kan Platten	15 g Agar-Agar ad 1000 ml mit LB-Medium + Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Kanamycin (50 µg/ml)

2.1.3.2 Zellkultur

2.1.3.2.1 Zellkulturmedien und Medienzusätze

Dulbeccos modified eagle medium (DMEM)	Gibco Life Tech, Karlsruhe
RPMI 1640 plus L-Glutamin	Gibco Life Tech, Karlsruhe
Endothelial Growth Medium 2 (EGM-2)	Lonza, PromoCell
Fötale Rinderserum (FCS)	PAA, Cölbe
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Tech, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	PAA, Cölbe

2.1.3.2.2 Plastikware

96-well Microtiter-Platten	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 75 cm ² , 25 cm ²	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturschalen (Ø 9 cm, Ø 5 cm, Ø 2,5 cm)	Greiner, Frickenhausen
PP-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen

2.1.4 Puffer- und Stammlösungen

Bradford	50 ml Phosphorsäure 85 % 25 ml Ethanol 100 % 0,01 % Brilliant Blue G20 ad 500 ml mit H ₂ O bidest (anschließend filtern)
Coomassie-Färbelösung	1,75 g Serva Blau G 227 ml Methanol 100 % 46 ml Essigsäure konz. ad 500 ml mit H ₂ O bidest
Coomassie-Entfärbelösung	450 ml Methanol 100 % 100 ml Essigsäure konz. ad 1 L mit H ₂ O bidest
PBS (pH 7.4)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 0,7 mM CaCl ₂ 0,6 mM MgCl ₂
Ponceau S-Lösung	0,1 % Ponceau S 3 % CH ₂ COOH
10x Protein-Transfer-Puffer-Towbin (pH 8,3)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol
SDS-Trenngel-Puffer (pH 8,8)	1,5 M Tris 0,4 % SDS ad 1 L H ₂ O bidest

Material und Methoden

SDS-Sammelgel-Puffer (pH 6,7)	500 mM Tris 0,4 % SDS ad 1 L H ₂ O bidest
SDS-Sammelgel (12 %)	2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) 4,4 ml H ₂ O bidest 3 ml 40 %
Acrylamid/Bisacrylamid	100 µl 10 % (w/v) SDS 100 µl 10 % (w/v) APS 10 µl TEMED
SDS-Trenngel (4 %)	1,25 ml 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) 3,2 ml H ₂ O bidest 0,5 ml 40 %
Acrylamid/Bisacrylamid	50 µl 10 % (w/v) SDS 50 µl 10 % (w/v) APS 5 µl TEMED
5x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 1,92 M Glycin 35 mM SDS 8 L H ₂ O bidest
10x TBE (pH 8,2)	900 mM Tris 900 mM Borsäure 20 mM EDTA
10x TBS-Puffer (pH 7,6)	24,2 g Tris-HCl 80 g NaCl ad 1 L H ₂ O bidest
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA

Transformationspuffer TfbI-Puffer	30 mM KAc 50 mM MnCl ₂ 100 mM KCl 15 % (v/v) Glycerin pH 5,8 mit HAc einstellen
Transformationspuffer TfbII-Puffer (pH 7,0)	10 mM MOPS/NaOH 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15 % (v/v) Glycerin Sterilfiltrieren
Ultraschallpuffer	20 mM Tris/HCl pH 8,5 1 mM EDTA 1 mM Mercaptoethanol 5 % Glycerin
X-Gal Färbelösung	18,7 ml PBS 1x 0,09 ml PBS 20x 0,4 ml MgCl ₂ 100 mM 0,2 ml K ₃ Fe(CN) ₆ 500 mM 0,2 ml K ₄ Fe(CN) ₆ 500 mM 0,4 ml NP40 10 % 2 ml NaDesoxycholat 1 % zum gewünschten Volumen in Konz. 1 mg/ml X-Gal [100µ/ml] zugeben
X-Gal Fixierlösung	0,27 ml Formaldehyd 37 % 0,08 ml Glutarylaldehyd 25 % 0,2 ml NP40 10 % 0,5 ml PBS 20x 1 ml NaDesoxycholat 1 % ad 10 ml mit H ₂ O bidest

2.1.5 Antikörper

Anti-phospho-I κ B (Ser32)	Cell signaling, Beverly, MA
Anti-ERK-2	Cell signaling, Beverly, MA
Anti-IgG-Kaninchen-Antikörper (HRP-konjugiert)	Amersham, Braunschweig
Anti-IgG-Maus-Antikörper (HRP-konjugiert)	Amersham, Braunschweig

2.1.6 Expressionsvektoren

pEGFP-C1	Clontech, St. Germain-en-Laye
pcDNA3.1/His/lacZ	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1Neo	Invitrogen, Karlsruhe
pGL2	Promega, Mannheim
pTurboFP635-C	Evrogen, Moskau

2.1.7 Primer

<u>Primer (Größe)</u>	<u>Sequenz</u>
E-Selektin (384 bp)	s: TCTCTCAGCTCTCACTTTG as: TTCTTCTTGCTGCACCTCT
VCAM-1 (466 bp)	s: AATTTATGTGTGTGAAGGAG as: GCATGTCATATTCACAGAA
ICAM-1 (202 bp)	s: GGCTGGAGCTGTTTGAGAAC as: ACTGTGGGGTTCAACCTCTG
LAMP-2 (216 bp)	s: GGTTAATGGCTCCGTTTTCA as: ATGGGCACAAGGAAGTTGTC
CD44 (187 bp)	s: AGAAGGTGTGGGCAGAAGAAAA as: CATTCTGCAGGTTCCCTTGTCT
TIMP (405 bp)	s: ATTCCGACCTCGTGATCAG as: CGTCCACAAGCAATGAGTG
CXCR4 (227 bp)	s: GGTGGTCTATGTTGGCGTCT as: TGGAGTGTGAC AGCTTGGAG
CXCL12 (161 bp)	s: CTTTAGCTTCGGGTCAATGC as: TCAGCCTGAGCTACAGATGC
β_1 -Integrin (294 bp)	s: CGAGGTCATGGTTCATGTTG

β_3 -Integrin (231 bp)	as: CAGTGTGTTGTGGGATTTGCAC s: GACAAGGGCTCTGGAGACAG
GAPDH (313 bp)	as: ACTGGTGAGCTTTCGCATCT s: GAAGATGGTGATGGGATTTTC as: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC

2.1.8 Zellsysteme

2.1.8.1 Bakterienstämme

Dieser Stamm wurde für die Transformation von Plasmid-DNA eingesetzt:

E. coli XL1-Blue *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proABlacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)*]

2.1.8.2 Säugerzelllinien

<u>Name</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Herkunft</u>
HUVEC	Humane umbilikalvenöse Endothelzellen	Lonza
HT29	Humane Kolonkarzinomzellen	ATCC*
DLD1	Humane Kolonkarzinomzellen	ATCC*
MDA-MB231	Humane Brustkarzinomzellen	ATCC*
T47D	Humane Brustkarzinomzellen	ATCC*
BxPC1	Humane Pankreaskarzinomzellen	ATCC*
CCF-RC1	Humane Nierenkarzinomzellen	ATCC*
B16F10	Murine Melanomzellen	ATCC*
CHO-K1	Chinesische Hamster Ovarzellen	ATCC*

(*) Diese Zelllinien waren in der Abteilung "Institut für Toxikologie" verfügbar. Ursprünglich stammten diese Zelllinien von „American Type Culture Collection“ (ATCC).

2.1.9 Software

CellA Olympus, Hamburg

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienkultur

Flüssige Bakterienkulturen wurden in LB-Medium mit oder ohne Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Kanamycin (50 µg/ml) bei 37 °C unter Schütteln (180 U/min) kultiviert. Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte auf Agarplatten (LB + 50-100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin) bei 37 °C. Das Anlegen von Dauerkulturen erfolgte durch abzentrifugieren (5 min, 14 000 U/min, RT) einer Über-Nacht-Kultur, das erhaltene Zellpellet wurde in 500 µl des entsprechenden Mediums resuspendiert und mit 500 µl sterilem Glycerin versetzt. Anschließend wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*

Aus einer Über-Nacht-Kultur von *E. coli* XL1-Blue wurden in 100 ml LB-Medium entsprechend einer Dichte von $OD_{600nm} = 0,05$ angeimpft und die Bakterien bis zu einer Dichte von $OD_{600nm} = 0,5$ bei 37 °C geschüttelt. Nach Abzentrifugieren der Bakterien (10 min, 4000 U/min, 4 °C) wurden die Zellen in TfbI-Puffer (30 mM KAc, 50 mM $MnCl_2$, 100 mM KCl, 15 % Glycerin, pH 5,8 mit HAc) aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Das nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4000 U/min, 10 min, 4 °C) erhaltene Pellet wurde unter leichtem Schütteln in 2 ml TfbII-Puffer (10 mM MOPS/NaOH, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM KCl, 15 % Glycerin, pH 7,0) resuspendiert, in mehrere Eppendorfgefäße aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die erhaltenen kompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2 Transformation von Plasmid-DNA

Die Transformation erfolgte mit 50 µl der aufgetauten, kompetenten Bakteriensuspension und 1 µl Plasmid-DNA. Nach Zugabe der Plasmid-DNA wurden die Zellen 20 min auf Eis inkubiert, danach folgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C und anschließend wieder eine Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 450 µl LB-Medium wurde der Ansatz

60 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend erfolgte die Ausplattierung von je 100 µl der Transformationsansätze auf je eine LB_{amp}-bzw. LB_{kan}-Platte, wonach diese bei 37 °C über Nacht inkubiert wurde. Einzeln gewachsene Bakterienkolonien wurden mit Hilfe sterilisierter Zahnstocher von der Platte in LB-Medium überführt und zur Plasmidisolierung über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (180 U/min) kultiviert.

2.2.2 Zellkultur

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen oder –schalen bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Humane Kolonkarzinomzellen DLD1 wurden in DMEM mit 10 % FCS kultiviert. Alle anderen etablierten Zelllinien wuchsen in RPMI-Medium mit 5 % FCS. Primäre humane umbilikalvenöse Endothelzellen wurden gemäß Angaben des Herstellers (Lonza) in Endothelzellmedium EGM-2, welches 2 % FCS, 0,04 % Hydrocortison, 0,4 % hFGF-B, 0,1 % VEGF, 0,1 % R³-IGF-1, 0,1 % Ascorbinsäure, 0,1 % hEGF, 0,1 % GA-1000 und 0,1 % Heparin beinhaltet, kultiviert und von der dritten bis zur zehnten Passage in Experimenten eingesetzt. Alle Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA für ca. 5 min bei RT inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden dann in frischem Medium aufgenommen, mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt und entsprechen verdünnt ausgesät. Zum Einfrieren wurden exponentiell wachsende Zellen einer Plastik-Kulturschale geerntet, in Medium aufgenommen und bei 1000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in Einfriermedium (Kulturmedium + 10 % DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Nach einer Verweildauer von 5 min auf Eis wurden die Kryoröhrchen in Zellstoff verpackt und in einer Styroporbox bei -80 °C eingefroren. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Kultivieren gelagerter Zellen wurden die Kryoröhrchen bei 37 °C in einem Wasserbad aufgetaut und die aufgetauten Zellen anschließend 1x mit Kulturmedium gewaschen, um das verbleibende DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden danach in 5 ml Medium aufgenommen und in eine kleine Kulturflasche (25 cm²) überführt.

2.2.2.1 Stabile Transfektion von DNA in Säugerzellen

Die Transfektion von DNA in Säugerzellen erfolgte mit Hilfe von Polyfect®-Transfection-Reagent (Qiagen). Es wurden dazu 3x 10⁵ Zellen pro 5 cm-Schale ausgesät und nach

24 h (bei einer Konfluenz von 50-80 %) transfiziert. Hierzu wurden 1-2 µg Plasmid-DNA gemäß Herstellerfirma mit Polyfect-Reagenz versetzt und nach 10 min bei RT mit serumfreiem Medium auf 1 ml Endvolumen aufgefüllt. Nach Spülen des Zellrasens mit PBS wurden dieser mit 4 ml frischem Medium überschichtet und der Transfektions-Ansatz tropfenweise zugegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Nach weiteren 48 h wurde die Zellen 1:5 verdünnt und in Selektions-Medium mit G418 (Neomycin; 0,6-1,5 mg/ml je nach Zelllinie) weiter kultiviert. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen kontrolliert und die ausgewachsenen Kolonien (ca. 50-100 pro Transfektion) ca. 1 Woche später gepoolt (= stabil transfizierte Massenpopulation).

2.2.2.2 Analyse der Tumorzelladhäsion

Die Zell-Zell-Adhäsion zwischen humanen Kolonkarzinomzellen (DLD1, HT29), humanen Mammakarzinomzellen (MCF7), sowie chinesischen Hamster-Ovarzellen (CHO-K1) und konfluenten Endothelzellen (HUVEC) wurde durch eine ELISA-ähnliche Methode bestimmt, die auf dem Vybrant™ Zell-Adhäsions-Assay (Molecular probes, Leiden) basiert. Dazu wurden die Tumorzellen mit 5 µM Calcein AM (Extinktion: 495 nm; Emission: 517 nm) für 30 min bei 37 °C inkubiert. 5×10^5 der so markierten Tumorzellen wurden anschließend auf einen konfluenten Endothelzell-Monolayer gegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation wurden die nicht adhärenen Zellen durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt und die Anzahl an adhärenen Zellen dann mit Hilfe des Fluorimeters bestimmt. Die Zunahme der Tumorzelladhäsion nach TNF α -Behandlung oder IR-Exposition wurde relativ zur spontanen Adhäsion an unbehandelte HUVEC berechnet und der Bezugswert (= unbehandelte Kontrolle) gleich 1 gesetzt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Der Zellrasen exponentiell wachsender sowie konfluenter Zellen wurde zweimal mit kaltem PBS gespült, danach 200 µl heißer SDS-haltiger 2x Roti-Load Ladepuffer® zugegeben und das Zelllysat aus einer Plastik Kulturschale mit einem Gummischaber in ein Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluß erfolgte eine Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier, Duty cycle: 40 %, 4x 10 sec) zum Scheren der DNA und eine Zentrifugation zur

Pelletierung unlöslicher Bestandteile (14000 U/min, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert oder direkt weiter verarbeitet.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte wie beschrieben (Laemmli, 1970). Es wurden denaturierende Polyacrylamidtrenngel mit einem Polyacrylamidanteil von 12 % oder 15 % verwendet. Das Trenngel wurde zwischen Glasplatten (Bio-Rad, München) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Die Polymerisation war nach ca. 30 min abgeschlossen. Nach Entfernen des Isopropanols wurde ein Sammelgel (4 % Polyacrylamidanteil) auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zur Aussparung von Ladetaschen eingebracht. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit SDS-Laufpuffer ausgespült. Die aufzutragenden Proben wurden wie folgt behandelt: Pro Spur wurden 15-50 µg Protein mit 1/4 Vol Ladepuffer (Roth, Karlsruhe) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 25-50 mA.

2.2.3.3 Western blot-Transfer

Nach der Auftrennung der Proteine durch eine SDS-PAGE wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das Polyacrylamidgel wurde zuerst in Protein-Transfer-Puffer (Towbin, pH 8,3, 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) überführt und auf eine in Puffer getränkte Nitrozellulosemembran gelegt. Ober- und Unterseite wurden mit einem puffergetränkten Schwamm und je einer Doppellage in Puffer getränkten Whatman-Papier umschlossen, in einem Gelhalter fixiert und vertikal in eine mit Protein-Transfer-Puffer gefüllte Transferkammer (Bio-Rad, München) gegeben, so dass der Nitrozellulosefilter zur Anode hin orientiert war. Die Überführung der negativ geladenen Proteine auf die Membran erfolgte bei 300 mA für eine Stunde. Nach Beendigung des Transfers erfolgte eine Überprüfung der Beladung und der Proteinübertragung durch Färbung des Filters mit Ponceau S-Lösung.

2.2.3.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Antikörper

Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen wurde der Nitrozellulosefilter für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungslösung (TBS mit 5 % Magermilchpulver und 0,2 % Tween20) inkubiert. Der Filter wurde anschließend mit dem primären Antikörper (1:500 oder 1:1000) in Blockierungslösung inkubiert. Der Filter wurde danach für 3x 10 min mit

TBS-Tween20 gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der Filter mit einem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:5000 in Blockierungslösung) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und erneut 3x 10 min in TBS/Tween20 gewaschen. Die Detektion des Chemolumineszenzsignals von gebundenen Antikörpern erfolgte mittels eines ECL-Kits und die Detektion mit „High performance chemiluminescence film“ (beide Amersham, Braunschweig). Um für eine weitere Inkubation (Rehybridisierung) die „alten“ Antikörper von dem Filter abzuwaschen, wurde der Filter 1x 20 min in 100 mM Glycin-Lösung (pH 2,8) inkubiert, danach 1x 10 min in TBS-Tween20 gewaschen und 1 h in Blockierungslösung inkubiert. Bei der Verwendung phosphospezifischer Antikörper ist die vom Antikörper erkannte Proteinphosphorylierung eine Indikation für die Aktivierung dieses Proteins (I κ B- α , ERK-2).

2.2.3.5 Beta-Glo®-Assay

Zur Quantifizierung des Gesamtanteils an Tumorgewebe in der Lunge wurde die Aktivität des Reporterproteins β -Galaktosidase (β -Gal), welches stabil in den zur Injektion verwendeten Tumorzellen überexprimiert wurde, bestimmt. Hierzu wurde 40 mg Lungengewebe in 300 μ l Ultraschallpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1 mM EDTA, 1 mM β -Mercaptoethanol und 5 % Glycerin) mit Hilfe des Ultra Turrax auf Eis homogenisiert, anschließend sonifiziert (2x 10 sec, Duty cycle: 40 %) und zentrifugiert (10 min, 10000 g, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt. Der Beta-Glo®-Assay wurde laut Hersteller Angaben durchgeführt und besteht aus 2 Komponenten (Beta-Glo®-Substrat und Beta-Glo®-Puffer), die kombiniert das Beta-Glo®-Reagenz ergeben, welches bei -20 °C gelagert wurde. In der eigentlichen Reaktion wurde 6-O- β -Galactopyranosyl-Luziferin durch die β -Gal in Luziferin gespalten, welches dann in Gegenwart von Ko-Faktoren durch das Enzym Luziferase in Licht umgewandelt wurde. Das Lumineszenzsignal wurde 30 min nach Zugabe des Beta-Glo®-Reagenz zur Probe am Luminometer (Berthold detection systems) gemessen. Die β -Gal-Aktivität wurde in „relative light units“ (RLU) angegeben.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Präparation von Nukleinsäuren

2.2.4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Midi-Präp)

Zur Transfektion geeignete hochreine Plasmid-DNA wurde säulenchromatographisch mittels Plasmid-Midi-Kit (Qiagen) nach Angaben der Herstellerfirma isoliert. Dazu wurden Bakterien aus einem Kulturvolumen von 100 ml durch Zentrifugation (4000 U/min, 10 min, 4 °C) sedimentiert und in 4 ml Tris-Puffer P1 (50 mM Tris/HCl, pH 8,8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) aufgenommen. Zur alkalischen Lyse wurde die Zellsuspension mit 4 ml Lysepuffer P2 (200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS) versetzt, vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml eisgekühltem Puffer P3 (3 M KAc, pH 5,5) wurde die Lösung neutralisiert. Die Plasmid-DNA konnte als löslicher Bestandteil von der unlöslichen, an Zelltrümmern gebundenen denaturierten chromosomalen DNA durch Zentrifugation (4500 U/min, 30 min, 4 °C) abgetrennt werden. Der Überstand wurde auf eine zuvor äquilibrierte DNA-Bindesaule geladen. Nach zweimaligem Waschen und anschließender Elution wurde die Plasmid-DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol zur Aufkonzentrierung präzipitiert (10 min, 10.000 x g, RT), mit 70 % Ethanol gewaschen und in TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

2.2.4.2 Synthese von cDNA

Die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA wurde mittels des iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, München) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Es wurden 0,5 µg Gesamt-RNA in die Reaktion eingesetzt.

2.2.4.3 Primer-Design

Alle für PCR-Reaktionen notwendigen Primerpaare wurden auf Basis publizierter cDNA-Sequenzen bzw. mit Hilfe des Programms „Primer3“ designed. Hierfür wurde auf die NCBI Nukleotid GenBank zugegriffen.

2.2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (Mullis, 1986) besteht in einer mehrfachen Replikation eines DNA-Fragments, welche durch eine Denaturierung der neu entstandenen Doppelstränge beliebig oft wiederholt werden kann. Für eine PCR werden Primer verwendet, die auf den verschiedenen Strängen der DNA binden und mit ihren 3'-

Enden aufeinander zuweisen. Die Primer werden durch die thermostabile Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* verlängert, wodurch die dazwischen liegenden Sequenzen aufgefüllt werden. Die neu synthetisierten Stränge dienen im nächsten Zyklus wieder als Matrize (Template), an welche die Primer hybridisieren können. Dadurch wächst die Anzahl an DNA-Fragmenten exponentiell an. In qRT-PCR-Ansätzen wird cDNA eingesetzt, die aus Gesamt-RNA synthetisiert wurde. Mit dieser Methode wird untersucht, in welcher Größenordnung ein bestimmtes Gen (repräsentiert durch ein Fragment dieses Gens) auf mRNA-Ebene im Vergleich zu Referenzproben transkribiert wurde. Die Reaktionen wurden mit 0,5 µl der synthetisierten cDNA in einem Endvolumen von 25 µl mit Master Mix Red (Ampliqon, Hamburg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die PCR wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: Denaturierung für 5 min bei 95 °C (1x), 35 Zyklen mit jeweils 1 min bei 94 °C, 1 min bei 60 °C, 1 min bei 72 °C, abschließend 1x 10 min bei 72 °C.

2.2.4.4.1. Quantitative RT-PCR

Eine Quantifizierung der RNA-Expression erfolgte mittels "Real time-PCR", wobei der Fluoreszenzfarbstoff „Absolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix“ (Thermo Fisher) und der Thermalcycler „MyIQ“ (Bio-Rad) verwendet wurden. Für jede Reaktion wurden 2 µl einer 1:10 verdünnten cDNA und spezifische Primer (jeweils 0,06 µM) eingesetzt. Die qRT-PCR wurden mit folgenden Parametern durchgeführt: Denaturierung bei 95 °C für 15 min (1x), 40 Zyklen mit jeweils 30 sec bei 95 °C, 1 min bei 60 °C, 1 min bei 72 °C. Am Ende wurde zusätzlich eine Schmelzkurve bestimmt, um die Spezifität der Reaktion zu bestimmen. Von jeder Probe wurde eine Zweifach- oder Dreifach-RT-PCR Analyse durchgeführt.

2.2.4.5 DNA-Gelelektrophorese

Die Größenauftrennung der PCR-Amplifikate erfolgte in horizontal laufenden 2 %-igen Agarosegelen (2 % Agarose [w/v] in TBE-Puffer). Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde der Agarose-Lösung der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (1:10000) zugesetzt. Die Proben, die bereits durch den Ready Red Taq Master Mix® Probenpuffer angefärbt waren, wurden in die Geltaschen pipettiert. Zur Größenidentifizierung der Fragmente wurde zusätzlich ein 100 bp Marker mit aufgetragen. Die Gele waren für ca. 30 min einer Spannung von 100 mV/cm ausgesetzt: Die Visualisierung der Fragmente erfolgte auf einem UV-Transilluminator.

2.2.5 Tierexperimentelle Arbeiten

2.2.5.1 Mausmodell und -haltung

Als *in vivo*-Modell wurden BALB/c Rag^{2-/-}, sowie CB-17^{-/-} Scid^{-/-}-Mäuse verwendet. Die Tiere stammten aus der zentralen Tierversuchsanstalt der Universitätsmedizin Mainz. Die Mäushaltung erfolgte unter Standardbedingungen (Temperatur 21-23 °C, Luftfeuchtigkeit 45-60 %, Tag-Nacht-Rhythmus: 12 h Licht/12 h Dunkelheit) (Hogan, 1994).

2.2.5.2 Experimentelle Lungenmetastasierung

Zur Analyse einer auftretenden Lungenmetastasierung wurden 2×10^6 stabil transfizierte Zellen in einem Volumen von 0,25 ml PBS in die laterale Schwanzvene von nicht narkotisierten Mäusen injiziert. Nach vier Wochen wurden die Mäuse zur Organentnahme durch Genickbruch getötet. Die Organe wurden unter semisterilen Bedingungen entnommen, makroskopisch auf Metastasen untersucht und anschließend fotografiert (Canon Powershot SX110IS). Danach wurden die Proben bei -80 °C gelagert, zur β -Galactosidase Aktivitätsmessung verwendet oder zur Herstellung von Paraffinschnitten in Formaldehyd (Rotifix) fixiert.

2.2.5.3 Histologie und Quantifizierung

Formaldehydfixierte Paraffinblöcke wurden in 4 μ m-Sektionen unterteilt und eine Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) durchgeführt. Die gefärbten Lungenschnitte wurden danach mikroskopisch analysiert und zur Dokumentation fotografiert. Die Quantifizierung des Tumorareals erfolgte mit Adobe Photoshop 7.0. Dazu wurde eine Histogramm-Auswertung der jeweiligen Lungenschnitte durchgeführt, um die Flächenproportionalität der Gesamtlungenfläche zu erhalten. Mit dessen Hilfe wurde anschließend der prozentuale Flächenanteil von Normal- bzw. Tumorgewebe bestimmt. Pro Lunge wurden 4 bis 10 Schnitte angefertigt. Pro Schnitt wurden mehrere Bereiche ausgewertet und quantifiziert.

2.2.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde der ungepaarte, zweiseitige Student's T-Test für unverbundene Stichproben angewendet. Die Berechnung erfolgte mit Microsoft Excel®. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant betrachtet. Die Daten in den Graphen wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Steigerung der Tumorzelladhäsion an Endothelzellen durch Vorbehandlung mit inflammatorischen Zytokinen *in vitro*

Bereits in Vorarbeiten von Nübel (2004) konnte gezeigt werden, dass die E-Selektin-mRNA- und Protein-Expression bei humanen umbilikalvenösen endothelialen Zellen (HUVEC, EZ) durch Stimulation mit Zytokinen beeinflusst werden kann und die Adhäsion humaner Tumorzellen (TZ) an diese dadurch gesteigert wird. Die zytokinabhängige Induktion von E-Selektin erfolgt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Whitley, 1994). Ausgehend von diesen Befunden stellte sich nunmehr die Frage, ob dieser pro-adhäsive Effekt durch selektive Vorbehandlung der Tumorzellen oder gleichzeitige Behandlung von TZ und EZ ebenfalls auftritt oder verändert werden kann.

Die Fragestellungen des *in vitro* Arbeitsprogrammes dieser Arbeit wurden deshalb unter Verwendung von HUVEC und humanen Kolonkarzinomzellen (HT29) untersucht. Dazu wurden die HUVEC in entsprechendem Medium nach Angaben des Herstellers kultiviert. Um die Tumorzelladhäsion an Endothelzellen (EZ) zu bestimmen, wurde eine ELISA-ähnliche Methode verwendet, die auf dem VybrantTM-Zelladhäsionsassay basiert. Dazu wurden die Tumorzellen (TZ) mit Calcein AM (5 μ M) markiert und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten auf den konfluenten Endothelzell-Monolayer gegeben. Nicht adhärierte Tumorzellen wurden nach 2 Stunden Inkubationszeit durch mehrmaliges Waschen entfernt. Um den Einfluss von TNF α zu untersuchen wurden die Endothel- und/oder Tumorzellen vier Stunden vor Tumorzellzugabe mit 10 ng/ml TNF α vorbehandelt. Zur Quantifizierung der Adhäsion nach TNF α -Behandlung wurde die spontane Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen gleich 1 gesetzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die relative Zelladhäsion sowohl durch eine TNF α -Vorbehandlung von EZ oder TZ um durchschnittlich 50 % gesteigert wurde (Abb. 1). Dieser pro-adhäsive Zytokin-Effekt wurde durch gleichzeitige Vorbehandlung von Tumorzellen und Endothelzellen kaum verstärkt.

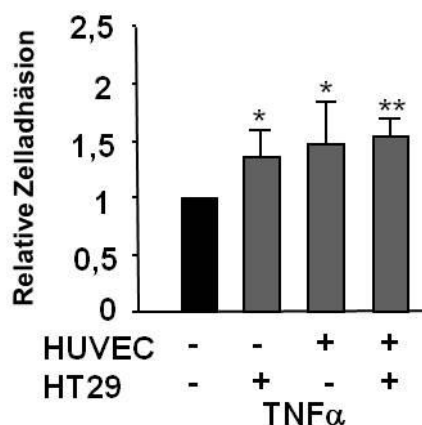


Abb. 1: TNF α -induzierte Tumorzelladhäsion.

HUVEC und Kolonkarzinomzellen (HT29) wurden mit TNF α (10 ng/ml, 4 h) vorbehandelt (+) oder nicht (-). Die Tumorzelladhäsion wurde nach 2 h wie im Methodenteil beschrieben gemessen. Die gezeigten Mittelwerte \pm Standardabweichung stammen aus einem repräsentativen Experiment gemessen in vierfacher Ausfertigung. *p \leq 0.05, ** p \leq 0.01.

3.2. Einfluss von ionisierender Strahlung (IR) auf die Tumorzelladhäsion *in vitro*

3.2.1 Vorbehandlung von Endothelzellen mit TNF α und ionisierender Strahlung führen zu einer pro-adhäsiven Endothel- und Tumorzellantwort

Der Nachweis einer konzentrationsabhängigen Erhöhung von Zelladhäsionsmolekülen auf Ebene der Endothelzelle nach Behandlung mit Zytokinen und Steigerung der Tumorzelladhäsion an HUVEC konnte bereits gezeigt werden (Nübel, 2004). Diesem Effekt liegt vor allem die Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen (wie z. B. E-Selektin) auf Endothelzellen zugrunde, ausgelöst durch eine NF- κ B- Aktivierung. In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob durch Behandlung der Tumorzellen mit ionisierender Strahlung auch auf Ebene der Tumorzelle Adhäsionsfaktoren induziert werden, die zu einer Zunahme der TZ-EZ-Adhäsion führen.

Um die Adhäsion von bestrahlten Tumorzellen an unbehandelte und TNF α -vorbehandelte HUVEC zu analysieren, wurden zwei verschiedene humane Kolonkarzinomzellen (HT29 und DLD1) ausgewählt, welche mit verschiedenen Dosen an γ -Strahlung (2, 5 und 10 Gy) bestrahlt wurden. Vier Stunden nach Behandlung der

Endothelzellen mit $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) wurden die Tumorzellen zu den HUVEC gegeben und nach weiteren zwei Stunden wurden die nicht adhärenen Zellen durch mehrmaliges Waschen entfernt. Wie in Abb. 2A und Abb. 2B zu erkennen ist, induziert γ -Strahlung in Tumorzellen ebenfalls Adhäsionsfaktoren, die zu einer Erhöhung der TZ-EZ-Adhäsion von bis zu 100 % führen. Behandlung von Endothelzellen mit inflammatorischen Zytokinen und Zugabe von unbehandelten Tumorzellen zeigte, dass die basale Adhäsion um den Faktor 2 bzw. 3 erhöht werden kann. Bei gleichzeitiger Behandlung konnte die Adhäsion von bestrahlten TZ noch gesteigert werden, wobei bei HT29 (Abb. 2B) ein deutlich stärkerer Effekt beobachtet werden konnte, im Vergleich zu den ebenfalls untersuchten DLD1 (Abb. 2A).

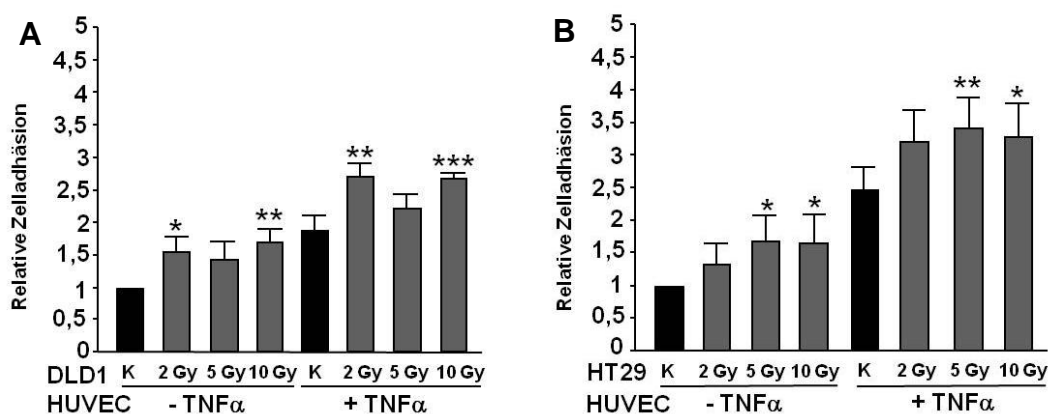


Abb. 2: Adhäsion von bestrahlten Tumorzellen an $\text{TNF}\alpha$ -behandelte HUVEC.

Endotheliale Zellen wurden mit $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml, 4 h) vorbehandelt und Kolonkarzinomzellen (A: DLD1 und B: HT29) wurden mit den angegebenen Dosen IR behandelt. Nach 4 h wurden die mit Calcein AM markierten Tumorzellen zum endothelialen Monolayer zugegeben und die Zelladhäsion wurde wie beschrieben analysiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von einem repräsentativen Experiment gemessen in vierfacher Ausfertigung. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, -*** $p \leq 0.001$.

3.2.2 Bestrahlung von Endothelzellen und Tumorzellen steigert die EZ-TZ-Interaktion *in vitro*

Verschiedene Agenzien wurden in vorangegangenen Arbeiten bereits hinsichtlich ihrer Fähigkeit getestet, die NF- κ B-Aktivität und somit auch die E-Selektin-Expression in humanen Endothelzellen zu induzieren (Nübel, 2004). So konnte bereits gezeigt werden, dass neben einer Behandlung mit z. B. TNF α , auch eine Behandlung mit γ -Strahlung in der Lage ist, die E-Selektin-mRNA- und Protein- Expression zu induzieren und dosisabhängig zu einem Anstieg an E-Selektin-Protein an der Zelloberfläche zu führen. Da E-Selektin bei der Metastasierung, insbesondere bei Kolonkarzinomen (Krause und Turner, 1999) von besonderer Bedeutung ist, stellte sich die Frage, wie sich eine gleichzeitige Bestrahlung von Tumor- und Endothelzellen auf die EZ-TZ-Interaktion auswirkt. Das Resultat dieser Analysen ist in Abb. 3A dargestellt. Hierbei wurden Tumorzellen (HT29) mit verschiedenen Dosen von ionisierender Strahlung (2, 5 und 10 Gy) behandelt, fluoreszenzmarkiert und nach 4 Stunden zu unbestrahlten Endothelzellen gegeben. Ersichtlich ist, dass schon eine radioonkologisch relevante Dosis von 2 Gy ausreichend war, um die Adhäsion von Tumorzellen an HUVEC um etwa 25 % zu erhöhen und, im Vergleich zur Basaladhäsion, bei erhöhter IR-Behandlung mit 5 Gy eine maximale Adhäsionszunahme erreicht wurde. Ein weiterer Anstieg der Adhäsion konnte bei einer Dosis von 10 Gy nicht mehr detektiert werden. Es zeigte sich, dass eine kombinierte Strahlenbehandlung von EZ und TZ einen additiven Effekt aufwies (Abb. 3B). Hier war bei einer eingesetzten Dosis von jeweils 5 Gy eine Zunahme der EZ-TZ-Adhäsion um den Faktor 4 zu beobachten. Dies konnte auch mikroskopisch anhand der mit Calcein AM fluoreszenzmarkierten Tumorzellen dargestellt werden (Abb. 3C).

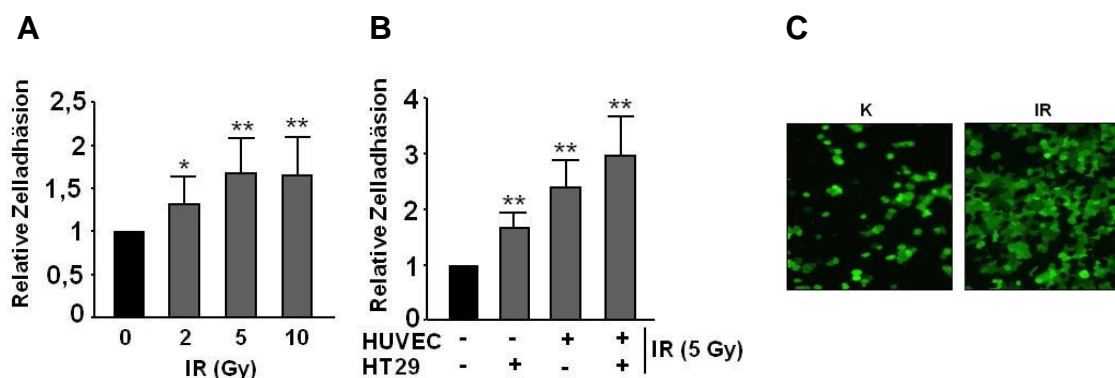


Abb. 3: Adhäsion von Tumorzellen (HT29) an HUVEC in Abhängigkeit der Dosis ionisierender Strahlung (A) und kombinierter Strahlenexposition (B).

A: Tumorzellen (HT29) blieben unbehandelt oder wurden mit ansteigenden Dosen ionisierender Strahlung (IR) bestrahlt. Nach 4 h Inkubation wurden HT29 auf den konfluenten endothelialen Monolayer zugefügt. Die Adhäsion wurde, wie zuvor bereits beschrieben, nach 2 h analysiert. Die relative Zelladhäsion in der unbestrahlten Kontrolle wurde gleich 1.0 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung eines repräsentativen Experiments (Vierfach-Bestimmung). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ ($n = 15$).

B: Endotheliale Zellen und Tumorzellen wurden mit 5 Gy bestrahlt oder nicht. Nach 4 h Post-Inkubationszeit wurden die unbestrahlten oder bestrahlten Tumorzellen zugefügt und die Adhäsion wurde nach weiteren 2 h analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von einem repräsentativen Experiment gemessen in vierfacher Ausfertigung. Gezeigt ist die relative Adhäsion auf nicht-bestrahlte HUVEC, welches als 1.0 gesetzt wurde. ** $p \leq 0.01$ ($n = 8$).

C: Mikroskopische Darstellung der strahleninduzierten Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen. K, Basaladhäsion ohne Bestrahlung; IR, mit 5 Gy bestrahlte HUVEC; +, fluoreszenzmarkierte, mit 5 Gy bestrahlte HT29.

3.2.3 Inhibierung der EZ-TZ-Adhäsion nach Strahlenexposition durch den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin

Aus der Literatur ist bekannt, dass ionisierende Strahlung sowohl in normalen als auch in tumorigenen Zellen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt (Wang, 2002) und so Entzündungsreaktionen und Zellüberleben reguliert (Baichwal, 1997; Baeuerle, 1996). Da zudem bekannt ist, dass die Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle (wie z. B. E-Selektin) (Baluna, 2006; Hallahan, 1996) von einer NF- κ B-Aktivierung abhängig ist, stellte sich die Frage, ob IR-induzierte NF- κ B-Aktivierung durch eine pharmakologische Beeinflussung inhibiert werden kann. Es

konnte bereits gezeigt werden, dass eine strahleninduzierte E-Selektin-Expression in HUVEC durch Vorbehandlung mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, wie z. B. Lovastatin beeinflusst werden kann und die endotheliale Aktivierung von NF- κ B durch inflammatorische Zytokine oder ionisierende Strahlung abgeschwächt wird. In diesem Teil der Arbeit sollte nunmehr untersucht werden, ob eine Vorbehandlung von Tumorzellen mit Lovastatin die IR-induzierte Erhöhung der Tumorzelladhäsion an Endothelzellen abschwächen kann. Dazu wurden zwei verschiedene humane Karzinomzelllinien (MCF7, humane Mammakarzinomzelllinie; HT29, humane Kolonkarzinomzelllinie) und die murine tumorigene chinesische Hamster Ovarzelllinie CHO-K1 verwendet.

Wie in den Diagrammen zu sehen ist, zeigt eine gleichzeitige Bestrahlung von HUVEC und HT29 (Abb. 4A) bzw. CHO-K1-Zellen (Abb. 4C) einen additiven Effekt, wohingegen eine strahleninduzierte maximale TZ-EZ-Adhäsion bei MCF7-Zellen (Abb. 4B) nur bei einer Behandlung von HUVEC mit γ -Strahlung beobachtet werden konnte. Hier zeigte sich bei einer gleichzeitigen Vorbehandlung von Endothel- und Tumorzellen mit ionisierender Strahlung wider Erwarten keine additive Wirkung. Um die Statinwirkung auf die jeweilige Zelllinie zu untersuchen, wurden diese mit 10 μ M Lovastatin über Nacht vorbehandelt. Unter diesen Bedingungen konnte beobachtet werden, dass eine Vorbehandlung von endothelialen Zellen zu einer deutlichen Hemmung der Tumorzelladhäsion führte. Im Vergleich dazu konnte bei einer Statin-Vorbehandlung von Tumorzellen ein sichtlich geringerer inhibitorischer Effekt ermittelt werden (Abb. 4). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Inhibierung der TZ-EZ-Interaktionen primär durch Herabregulation von IR-induzierten endothelialen Oberflächenadhäsionsfaktoren bedingt ist.

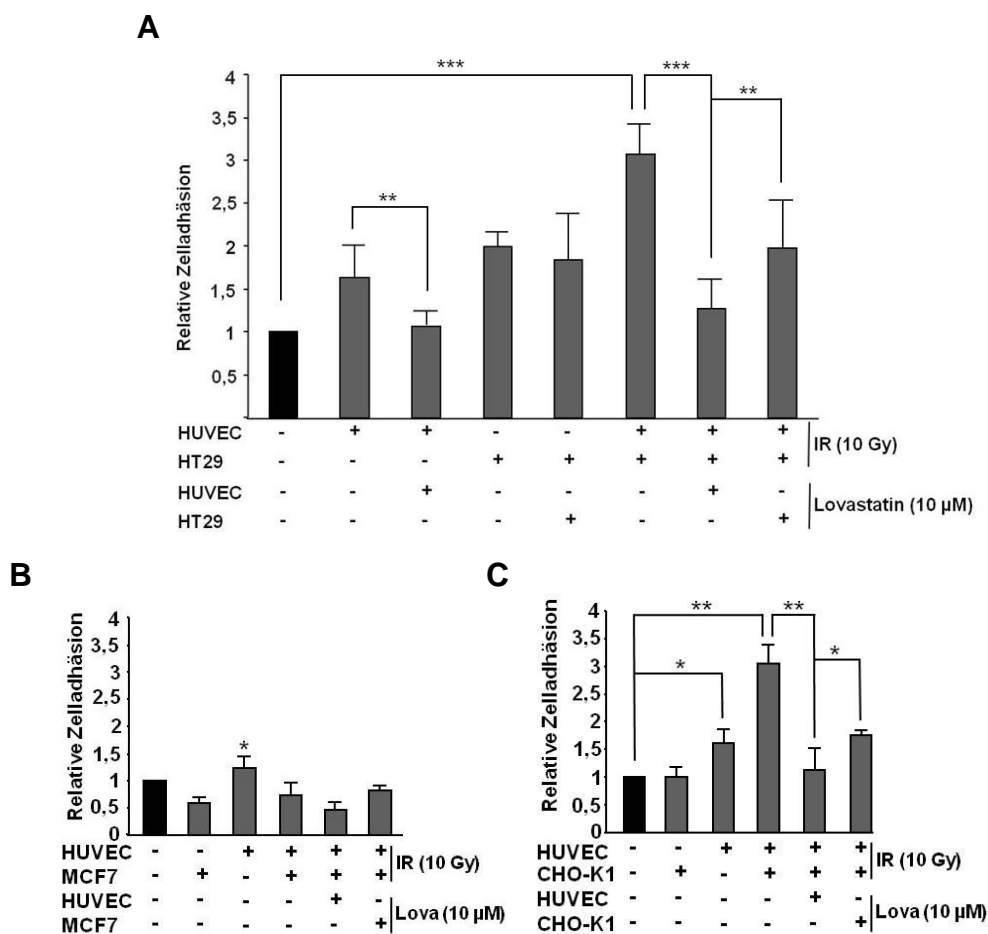


Abb. 4: Lovastatin beeinflusst die Tumorzelladhäsion nach IR-Exposition.

Konfluente HUVEC und verschiedene Zelllinien (**A**: HT29, **B**: MCF7 und **C**: CHO-K1) wurden über Nacht mit Lovastatin (10 µM) behandelt oder nicht und mit 10 Gy bestrahlt. Nach 4 h Inkubation wurde der endotheliale Monolayer mit den Zellen überschichtet und 2 h später wurde die Zelladhäsion wie beschrieben gemessen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 4). Die basale Zelladhäsion wurde als 1.0 gesetzt. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

Um herauszufinden, welche Zelladhäsionsmoleküle wichtig für die strahleninduzierte Induktion von EZ-TZ-Interaktionen sind, wurde die mRNA-Expression von verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen auf Ebene von Endothel- und Tumorzellen analysiert. Abbildung 5 zeigt, dass die Behandlung von HUVEC mit γ -Strahlung (10 Gy) zu einer Induktion der mRNA-Expression von E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 mit einem schwachen Effekt nach 2 Stunden und einem deutlichen Anstieg nach 4 Stunden führte. Die semiquantitative RT-PCR Analyse der Kolonkarzinomzellen zeigte,

dass nach Strahlen-Exposition erhöhte Mengen an ICAM-1, LAMP2, CD44 und CXCR4 exprimiert wurden. Diese wurden bereits als E-Selektin-spezifische Liganden beschrieben (Tomlinson, 2000; Hanley 2004; Hanley, 2005). Um den Einfluss von Lovastatin auf die mRNA-Expression zu untersuchen wurden HUVEC und HT29 jeweils mit 10 μ M Lovastatin über Nacht vorbehandelt. Die starke Induktion der strahleninduzierten mRNA-Expression von E-Selektin, VCAM und ICAM-1 wurde durch Lovastatin deutlich inhibiert, wohingegen die Statin-Vorbehandlung der Kolonkarzinomzellen keinerlei inhibitorischen Effekte zeigte. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen überein, dass eine Lovastatin-Vorbehandlung von Tumorzellen die TZ-EZ-Adhäsion nur gering beeinflusst (siehe auch Abb. 4A).

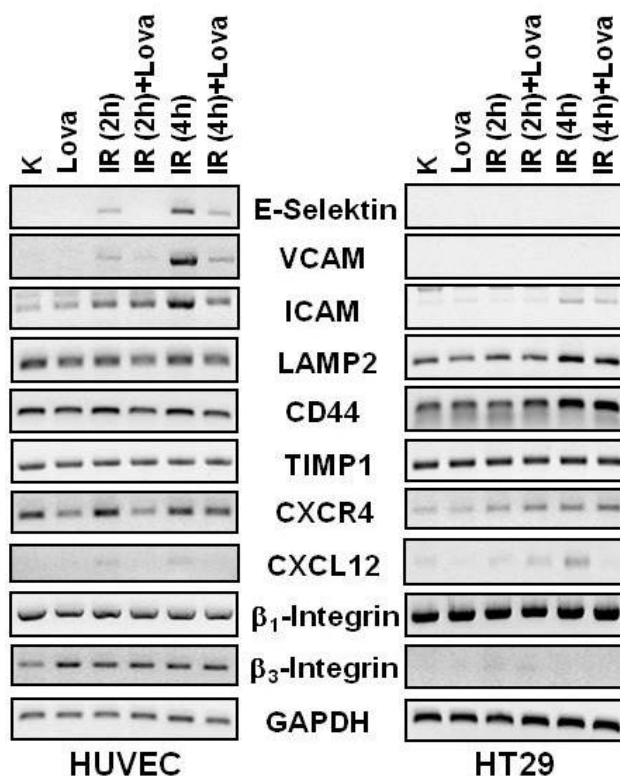


Abb. 5: Auswirkungen von Lovastatin-Vorbehandlung und ionisierender Strahlung auf die Zelladhäsionsmolekül-mRNA-Expression.

HUVEC und HT29 wurden mit Lovastatin (20 μ M, 16 h) vorbehandelt oder nicht und mit 20 Gy bestrahlt. Nach 2 h und 4 h Inkubation wurden die Zellen für die Untersuchung der verschiedenen Zelladhäsionsmolekül-mRNA-Expression mit einer semiquantitativen RT-PCR Analyse geerntet.

3.2.4 Hyaluronsäure fördert den pro-adhäsiven Strahleneffekt *in vitro*

Selektine stellen eine wichtige Gruppe u. a. bei der Extravasation von PMNs (polymorphonukleären Neutrophilen) zu inflammatorischen Stellen dar. Katayama et al. zeigten, dass CD44 als physiologischer Ligand die Bindung von neutrophilen Zellen an E-Selektin fördert (Katayama, 2005). Bekannt ist zudem, dass CD44 mit Hyaluronsäure interagiert (DeGrendele, 1997). Da CD44 auch auf humanen Kolonkarzinomzellen detektiert werden konnte (Abb. 5) und hier auch eine Induktion nach ionisierender Strahlung beobachtet wurde, stellte sich die Frage, ob möglicherweise die strahleninduzierte TZ-EZ-Adhäsion über eine CD44-E-Selektin-Bindung gesteigert wurde und ob durch HS, welche an CD44 bindet, die CD44-E-Selektin-Interaktion inhibiert und somit die EZ-TZ-Adhäsion abgeschwächt wird.

Um den Einfluss von Hyaluronsäure auf die HUVEC-HT29-Interaktionen zu untersuchen, wurden endotheliale Zellen und/oder humane Kolonkarzinomzellen mit 10 Gy bestrahlt. Nach vier Stunden wurden die Endothelzellen mit 1 oder 10 µg/ml HS behandelt und danach wurden die Karzinomzellen auf den Endothelzellmonolayer gegeben. Nach weiteren zwei Stunden wurde die relative Tumorzelladhäsion bestimmt. Abbildung 6 zeigt, dass die Adhäsion durch Addition der Hyaluronsäure wider Erwarten gesteigert wurde. Ein tendenzieller Effekt wurde nach Bestrahlung der Tumorzellen erreicht.

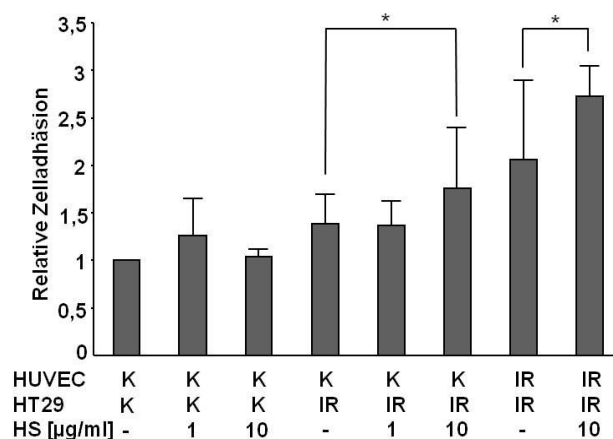


Abb. 6: Hyaluronsäure beeinflusst die Tumorzelladhäsion *in vitro*

HUVEC und HT29 wurden mit 10 Gy bestrahlt. Nach einer Inkubationszeit von 4 h, wurde Hyaluronsäure (1 oder 10 µg/ml) auf den Monolayer der Endothelzellen gegeben und anschließend die Calcein-markierten Tumorzellen zugegeben. 2 h später wurde die Zelladhäsion wie beschrieben bestimmt. Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei unabhängigen Experimenten ($n = 4$). Die basale Zelladhäsion wurde als 1.0 gesetzt. HS = Hyaluronsäure. * $p \leq 0.05$.

3.3 Einfluss von Ganzkörperbestrahlung auf die Extravasation von Tumorzellen sowie die Lungenmetastasierung *in vivo*

Ionisierende Strahlung wird häufig in der Krebsbehandlung zur lokalen Tumorkontrolle eingesetzt. Jedoch bewirkt IR nicht nur den Tumorzelltod, sondern führt auch zu einer Schädigung des normalen Gewebes bis hin zu Inflammation und Entstehung von Fibrose. Vor allem im Bereich der prophylaktischen Strahlenbehandlung, z. B. PCI (prophylactic cranial irradiation) oder bei palliativen Behandlungen wird auch das Normalgewebe einer nennenswerten Strahlenexposition ausgesetzt. In der Vergangenheit wurde bisher kaum untersucht, ob die Exposition von Normalgewebe zu pro-metastatischen Effekten führt. Voraussetzung für eine Tumorzellextravasation *in vivo* ist die Bindung von zirkulierenden Tumorzellen an das Endothel. Dies könnte durch eine Hochregulation von endothelialen Zelladhäsionsmolekülen ausgelöst werden, die für die Adhäsion und nachfolgende Extravasation tumorigener Zellen verantwortlich sind. Aufgrund der oben dargestellten *in vitro* Ergebnisse stellte sich die Frage, ob Strahlentherapie zu einer Förderung der Metastasierung *in vivo* führen kann.

3.3.1 Ganzkörperbestrahlung induziert Metastasenformation in der Lunge im *in vivo* BALB/c Rag^{2/-}-Mausmodell

In Folge der u. a. gezeigten strahleninduzierten E-Selektin-mRNA-Expression, stellte sich im folgenden Schritt die Frage, ob Ganzkörperbestrahlung ebenfalls zu einer Förderung der Tumorzell-Extravasation und Metastasenbildung in der Lunge führt.

Um dies eingehend zu untersuchen, wurden zunächst verschiedene Zellsysteme getestet (Abb. 7B). Als Mausmodell wurden immundefiziente BALB/c Rag^{2/-}-Mäuse verwendet. Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen in die Schwanzvene der Mäuse injiziert (Abb. 7A). Danach wurden die Tiere mit 4 Gy bestrahlt (Ganzkörperbestrahlung). Je nach Zelllinie erfolgte die Analyse der Ausbildung von Lungenmetastasen nach 2-4 Wochen. Wie in der Tabelle 1 ersichtlich, konnten bei den hier untersuchten humanen Zelllinien keinerlei Lungenmetastasen und somit kein pro-metastatischer Strahleneffekt detektiert werden. In den humanen Mammakarzinomzellen MDA-MB231 zeigte sich bereits in der unbestrahlten Kontrollgruppe eine massive Metastasenbildung in der Lunge. In den bestrahlten Tieren konnte daraufhin keine deutliche Erhöhung der Tumorbildung mehr festgestellt werden. Bei Verwendung von MDA-MB231 Zellen blieben die Tumorzellen im Blutgefäß hängen und zeigten keine Extravasation in das

Lungengewebe. Bei den verwendeten murinen Melanomzellen B16F10 hingegen konnte ein äußerst starkes Tumorwachstum bereits basal in den Kontrollgruppen beobachtet werden. Hier war die Bildung von Metastasen so stark, der Versuch aus tierschutzrechtlichen Gründen bereits nach 2 Wochen terminiert werden musste. Durch das schnelle und aggressive Metastasierungsverhalten in der unbestrahlten Kontrollgruppe konnte in der entsprechenden Strahlengruppe keine Erhöhung der Tumorbildung mehr beobachtet werden. Ein deutlicher Strahleneffekt zeigte sich nur bei den chinesischen Hamsterovarzellen CHO-K1 (siehe unten), die schon von Kikkawa et al. als tumorigen beschrieben wurden (Kikkawa, 2002). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die CHO-K1 Zellen für die weiteren Analysen unter Verwendung des BALB/c Rag^{2-/-}-Mausmodells ausgewählt. Um den Einfluss von IR auf die mRNA-Expression von verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen und die NF-κB-Aktivierung *in vivo* zu untersuchen, wurden die Mäuse mit 6 Gy (Ganzkörper-Exposition) behandelt und nach 4 Stunden wurden große Blutgefäße der Lungen- und Abdominalarterien präpariert. Ionisierende Strahlung führte zu einem Anstieg der E-Selektin- und ICAM-1-mRNA-Expression, zeigte jedoch keinen Einfluss auf die CD44-mRNA Expression (Abb. 5). Als Positivkontrolle dienten Blutgefäße, die 30 Minuten mit TNF α vorbehandelt wurden.

Korrelierend zu den mRNA-Ergebnissen, zeigte sich auch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB, welche durch die induzierte p-IκB-Phosphorylierung angezeigt wurde (Abb. 7C). Die Ergebnisse stimmten mit anderen Experimenten überein, bei denen eine strahleninduzierte Aktivierung von NF-κB und ein darauffolgender Anstieg von E-Selektin, bzw. ICAM-1 beobachtet werden konnte (Hallahan, 1998; Schindler, 1994). Ionisierende Strahlung zeigte keinen Effekt auf die $\beta_{1/3}$ -Integrin-Expression in HUVEC und HT29, sowie auf die TIMP1-mRNA-Expression (Abb. 5)

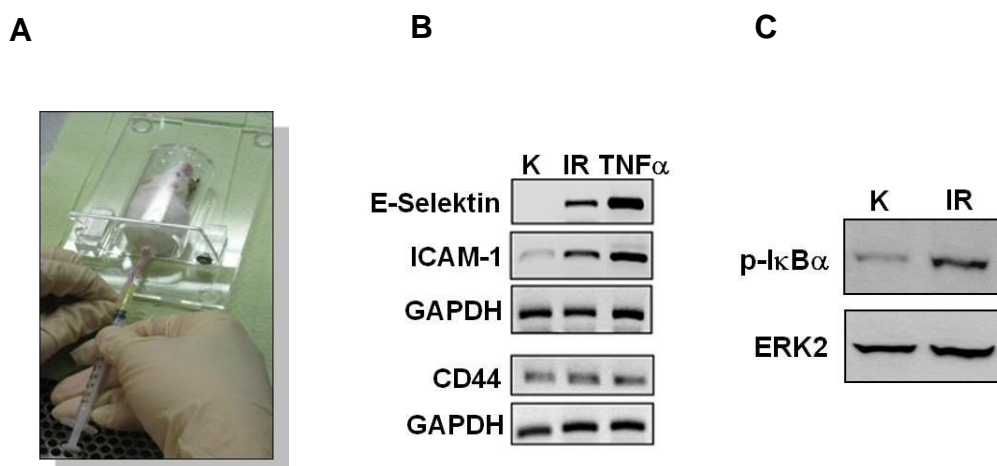


Abb. 7: Metastasierungspotential verschiedener Zelllinien nach ionisierender Strahlung und Einfluss auf die mRNA-Expression und den Phosphorylierungsstatus.

A: Abbildung der Zellinjektion in die laterale Schwanzvene von BALB/c Mäusen.

B: Immundefiziente Rag^{2-/-} BALB/c-Mäuse wurden mit 6 Gy bestrahlt. Nach 4 Stunden wurde die mRNA-Expression von verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen in großen Blutgefäßen von Lunge und Abdomen durch RT-PCR analysiert. Zur internen Normierung wurde die GAPDH-mRNA-Expression bestimmt. Als Positivkontrolle dienten mit TNF α (10 ng/ml, 30 min, 37 °C) behandelte isolierte Blutgefäße.

C: Zur Analyse der NF- κ B-Aktivität, 4 Stunden nach Ganzkörper-Bestrahlung von BALB/c-Mäusen mit 6 Gy, wurden Leberextrakte präpariert und die Phosphorylierung von p-I κ B, als Indikation für die NF- κ B-Aktivierung, durch Western Blot Analyse, entsprechend der Beschreibung in Material/Methoden, bestimmt. Als interne Ladekontrolle für die aufgetragenen Proteinmengen diente ERK-2.

Tabelle 1: Übersicht über das Metastasierungspotential verschiedener humaner und muriner Tumorzelllinien.

Jeweils 2×10^6 Zellen wurden in immundefiziente BALB/c Rag^{2-/-}-Mäuse injiziert und anschließend mit 4 Gy bestrahlt. Kontrolle, unbestrahlt; IR, 4 Gy (Ganzkörper). Die Analyse von Lungenmetastasen erfolgte je nach Zelllinie nach 2-4 Wochen. –, keine Metastasen detektierbar; +, wenige Metastasen; +++, sehr viele Metastasen.

Zelllinie		Kontrolle	IR
Kolonkarzinom (human)	HT29	-	-
	DLD1	-	-
Mammakarzinom (human)	MCF7	-	-
	T47D	-	-
	MDA MB 231	++	++
Nierenzellkarzinom (human)	CCF-RC1	-	-
Pankreaskarzinom (human)	BxPC3	-	-
Melanom (murin)	B16F10	+++	+++
Chinesische Hamster Ovarzellen	CHO-K1	+	+++

Um den gezeigten Strahleneffekt auf die Metastasenbildung detaillierter zu untersuchen, wurden nachfolgend die murinen CHO-K1 Ovarzellen aufgrund ihres starken Metastasierungspotenzials nach IR ausgewählt (Tabelle 1). 2×10^6 Zellen wurden in die laterale Schwanzvene von BALB/c Rag^{2-/-}-Mäusen injiziert und anschließend mit γ -Strahlung (4 Gy, Ganzkörper) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 3-4 Wochen wurden verschiedene Organe (Lunge, Leber) präpariert. Wie in Abb. 8E zu sehen ist, konnte makroskopisch und histologisch ein sehr starker Anstieg der Metastasenformation in der Lunge, sowie ein schwächerer Effekt in der Leber von bestrahlten Mäusen detektiert werden. Daraus folgend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass ionisierende Strahlung den Extravasationsschritt von Tumorzellen in das Lungengewebe fördert. Um den pro-metastatischen Effekt von IR weiter zu untersuchen und darzustellen, wurden CHO-K1 Zellen sowohl mit dem „red-fluorescent protein“ (RFP), dem Luziferase-Protein, als auch mit β -Galaktosidase-Protein stabil transfiziert. Die überexprimierenden Zellen wurden jeweils in das BALB/c-Maussytem intravenös injiziert und die Tiere anschließend sofort mit 4 Gy bestrahlt.

Wie in den vorangegangenen Versuchen, wurden die Mäuse nach 3-4 Wochen auf die Ausbildung von Lungenmetastasen hin untersucht. Auch hier zeigte sich jeweils ein sehr deutlicher Strahleneffekt in der IR-Gruppe (Abb. 8C und 8D). Um die Metastasenbildung quantitativ zu erfassen, wurde die Fläche des Tumorbereiches einer jeweiligen Lungensektion im Vergleich zum Normalgewebe bestimmt (Abb. 8A). Anhand des Übersichtsdiagramms zeigt sich der pro-metastatische Effekt von IR, welcher zu einem signifikanten Anstieg der Metastasenbildung führte. Dies wurde auch durch β -Galaktosidase-Analysen bestätigt. Hierbei wurden β -Gal-überexprimierende CHO-K1 Zellen injiziert. Die Aktivität wurde im Anschluss in Proteinextrakten aus präparierten Lungen quantifiziert. Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe konnte in Lungenextrakten der bestrahlten Gruppe eine 4-5fache Erhöhung der β -Gal-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 8B). Alle durchgeführten Analysen zeigten, dass IR zu einem pro-metastatischen Effekt führt und die Ausbildung von Lungenmetastasen im Vergleich zu unbestrahlten Tieren stimuliert.

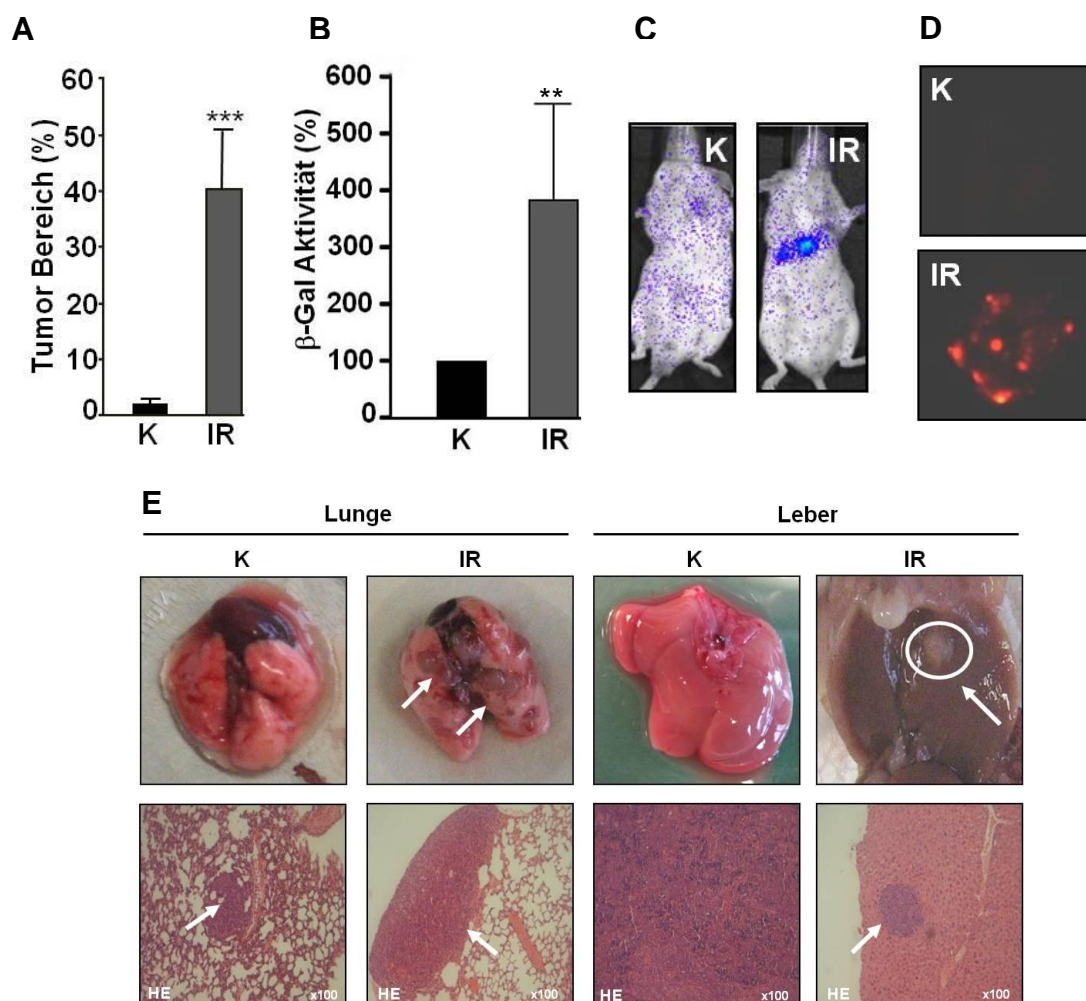


Abb. 8: Stimulation der Tumorzell-Extravasation und Ausbildung von Lungenmetastasen durch Ganzkörperbestrahlung in vivo.

A: 2×10^6 CHO-K1 Zellen wurden in die laterale Schwanzvene von immundefizienten BALB/c Rag^{2-/-}-Mäusen injiziert. Sofort nach Zellinjektion wurden die Mäuse mit 4 Gy bestrahlt (Ganzkörperbestrahlung). Die Quantifizierung der Bildung von Lungenmetastasen im Vergleich von bestrahlten zu unbestrahlten Mäusen wurde durch die Kalkulation des prozentualen Anteils des Tumorbereiches im Verhältnis zur gesamten Lunge durchgeführt. *** $p < 0,001$ (n = 4-8 Mäuse).

B: 3-4 Wochen nach Injektion von β -Galaktosidase-überexprimierenden CHO-K1 Zellen und anschließender Ganzkörper-Bestrahlung mit 4 Gy wurde die relative β -Gal-Aktivität in den entnommenen Lungenextrakten bestimmt. Hierbei wurden die nicht bestrahlten Kontroll-Mäuse im Verhältnis zu bestrahlten Mäusen verglichen. Die β -Gal-Aktivität in den Lungenextrakten der Kontroll-Mäuse wurde als 100 % gesetzt. ** $p \leq 0,01$ (n = 4-8 Mäuse).

C: Die Luziferase-Aktivität in den Lungen wurde mit Hilfe des „Live Imaging“-Gerätes dargestellt. Die Luziferase-überexprimierenden CHO-K1 Zellen wurden 3-4 Wochen zuvor i. v.

injiziert und die Mäuse anschließend mit 4 Gy bestrahlt (Ganzkörperexposition). Gezeigt sind repräsentative Bilder (2-3 Mäuse pro Gruppe wurden analysiert).

D: RFP (Rotfluoreszierendes Protein)-überexprimierende CHO-K1 Zellen wurden in die laterale Schwanzvene von immundefizienten BALB/c Rag^{2-/-}-Mäusen injiziert. Die Bildung von Lungenmetastasen wurde 3-4 Wochen nach Ganzkörperbestrahlung mit 4 Gy untersucht. K: Kontrolle, unbestrahlt; IR, Ganzkörperbestrahlung mit 4 Gy. Gezeigt sind repräsentative Bilder. Pro Gruppe wurden 2-3 Mäuse analysiert.

E: 2×10^6 CHO-K1 Zellen wurden in die laterale Schwanzvene von immundefizienten Rag^{2-/-} BALB/c-Mäusen injiziert, welche sofort im Anschluss mit 4 Gy bestrahlt wurden (Ganzkörper). Die Bildung von Lungen- und Lebermetastasen wurde nach 3-4 Wochen bestimmt. Gezeigt werden jeweils repräsentative makroskopische und histologische Aufnahmen (4-8 Mäuse wurden pro Gruppe untersucht).

3.3.2 Lovastatin wirkt einer strahleninduzierten Metastasenformation *in vivo* entgegen

Die beobachtete Strahlenwirkung auf die Tumorzelladhäsion *in vitro* und vor allem die deutliche Tumorzelle extravasation und Metastasenbildung *in vivo* führten zur Frage, ob eine Lovastatin-Vorbehandlung, welche die Tumorzelladhäsion *in vitro* verminderte (Abb. 4), auch im Mausmodell zu einer reduzierten Tumorzelle extravasation führt und letztendlich so zu einer abgeschwächten Metastasierung. Bereits bekannt ist, dass der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor zu einer Hemmung der NF- κ B- und Rac1-regulierten E-Selektin-Expression nach Behandlung mit inflammatorischen Zytokinen, wie TNF α , oder ionisierender Strahlung führt (Nübel, 2004). Da eine erhöhte E-Selektin-mRNA-Expression in bestrahlten Blutgefäßen detektiert werden konnte (Abb. 7C), wurde vermutet, dass der pro-metastatische Strahleneffekt durch Statin-Behandlung auch im *in vivo* System abgeschwächt werden kann. Um die Wirkung von Statinen auf die pro-metastatischen Effekte *in vivo* zu analysieren, wurde zunächst die mRNA-Expression von Zelladhäsionsmolekülen nach Lovastatin-Behandlung untersucht. Hierzu wurden BALB/c-Mäuse mit 10 mg/kg Lovastatin (Applikation per os) vorbehandelt. Danach wurden sie mit 6 Gy bestrahlt und nach 4 Stunden wurden große Blutgefäße aus Lunge und Abdomen isoliert. Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR sind in Abbildung 7A zu sehen. In Übereinstimmung mit den *in vitro* Ergebnissen wurde die strahleninduzierte mRNA-Expression von E-Selektin und ICAM-1 abgeschwächt. Zudem zeigte sich eine verminderte mRNA-Expression von CD44, wobei hier kein Strahleneffekt detektiert wurde.

Die Menge an ICAM-1-mRNA wurde zusätzlich durch eine Real-Time Analyse bestimmt und zeigte eine bis zu 6-fache Induktion der mRNA nach γ -Strahlung, sowie eine starke Verminderung nach Statin-Ko-Behandlung bis zum basalen unbehandelten Level. (Abb. 9B). Der deutliche Lovastatin Effekt wurde auch mit Hilfe eines β -Galaktosidase Assays detektiert. Um die β -Gal-Aktivität in den Lungenextrakten zu bestimmen, wurden die Mäuse für zwei Tage mit Lovastatin (10 mg/kg; p. o.) vorbehandelt. Nach der Ganzkörperbestrahlung mit 4 Gy erfolgte die Analyse der Lungenextrakte nach 3-4 Wochen. Wie schon in den Versuchen zuvor zeigte sich ein starker Strahleneffekt mit einem Anstieg der β -Gal-Aktivität bis zu 500 %. Der starke protektive Schutz von Lovastatin auf die strahleninduzierte Metastasenformation in der Lunge wurde mit einer Abnahme der β -Galaktosidase-Aktivität von ~90 %, im Vergleich zur bestrahlten Gruppe, quantifiziert. Zur weiteren Optimierung des beobachteten protektiven Statin-Effekts wurden verschiedene Statinbehandlungen getestet. Dazu wurde die Vorbehandlungsphase auf 2 Wochen verlängert, sowie parallel eine Nachbehandlung von 14 Tagen durchgeführt. Um die Tumorbildung in der Lunge zu untersuchen wurden CHO-K1 Zellen intravenös injiziert und nach 3-4 Wochen wurden die Organe der verschiedenen Behandlungsgruppen präpariert.

Bereits in den nur vorbehandelten Mäusen zeigte sich ein starker protektiver Statin-Effekt in der IR-Gruppe. Dieser konnte durch eine Nachbehandlung von weiteren zwei Wochen nicht mehr verstärkt werden (Abb. 9D). Dies verdeutlicht, dass eine alleinige Vorbehandlung mit Statinen zur Abschwächung der Strahlenwirkung ausreichend ist. Interessanterweise zeigte bereits eine alleinige Statinvorbehandlung von 14 Tagen einen sehr schwachen pro-metastatischen Effekt. Jedoch auch hier fand keine weitere Zunahme des Tumorbereiches bei einer zusätzlichen Nachbehandlung von 2 Wochen nach Zellinjektion und γ -Bestrahlung mit 4 Gy statt.

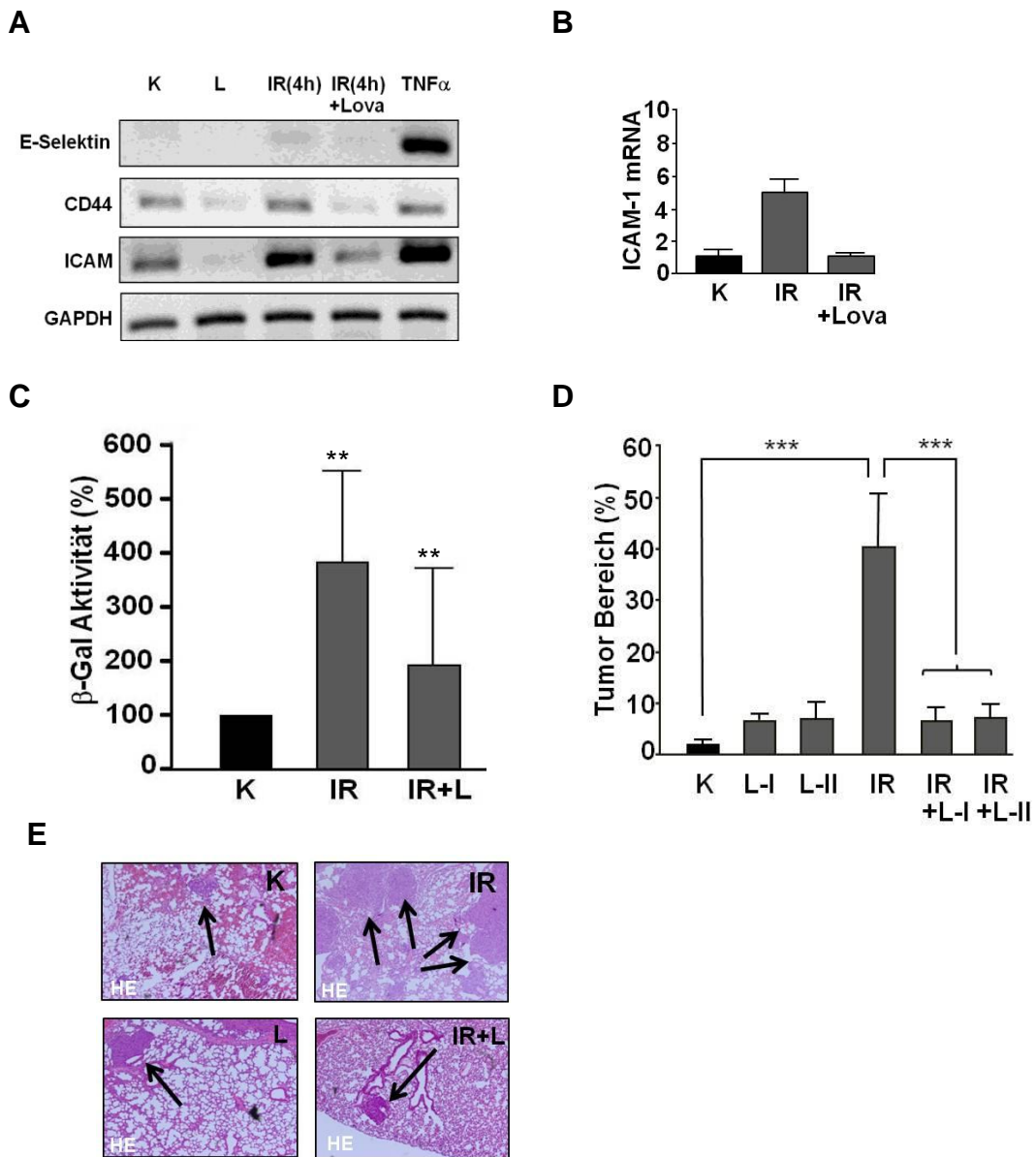


Abb. 9: Strahleninduzierte Metastasierung in vivo kann durch Lovastatin vermindert werden.

A: BALB/c-Mäuse wurden mit Lovastatin (10 mg/kg, p. o.) vorbehandelt und mit 6 Gy bestrahlt. Nach 4 Stunden wurde große Blutgefäße (Abdominal- und Lungenarterien) isoliert und die mRNA-Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR bestimmt. Als Positivkontrolle wurden isolierte Blutgefäße mit TNF α (10 ng/ml, 30 min, 37 °C) benutzt.

B: ICAM-1-mRNA-Expression wurde durch Real-Time PCR Analyse bestimmt (Dreifach-Bestimmung). Die Menge an ICAM-1-mRNA wurde anhand der Menge an GAPDH und β -Actin normalisiert und in der unbehandelten Kontrollgruppe als 1.0 gesetzt. K, Kontrolle; IR,

Bestrahlung mit 6 Gy; IR+Lova, Bestrahlung nach Lovastatin-Vorbehandlung (10 mg/kg, p. o., 2 Tage).

C: Der Effekt von Lovastatin auf die strahleninduzierte Tumorzell-Extravasation und Metastasierung wurde anhand der β -Gal-Aktivität in Proteinextrakten von Lungen analysiert. Die relative β -Galaktosidase-Aktivität in der unbehandelten Kontrollgruppe wurde gleich 100 % gesetzt. ** $p \leq 0,01$ (n = 4 Mäuse).

D: Immundefiziente BALB/c Rag^{2-/-}-Mäuse wurden mit Lovastatin für 2 Wochen vorbehandelt oder nicht (10 mg/kg, p. o., 3x pro Woche). Nach Injektion von 2×10^6 CHO-K1 Zellen in die laterale Schwanzvene erfolgte eine sofortige Ganzkörperbestrahlung mit 4 Gy. Nach 3-4 Wochen wurde der prozentuale Anteil an Metastasen pro Lungensektion im Verhältnis zur Kontrolle, wie in Material/Methoden beschrieben, bestimmt. K, unbehandelte Mäuse; IR, Bestrahlung mit 4 Gy; L-I, Lovastatin Vorbehandlung allein; L-II, Lovastatin Vor- und Nachbehandlung. Die Nachbehandlung mit Lovastatin (10 mg/kg, p. o., 3x pro Woche) wurde für 14 Tage durchgeführt. *** $p \leq 0,001$ (n = 4 Mäuse/Gruppe).

E: Histologische Abbildungen von präparierten Lungen (n = 4-6 Tiere/Gruppe). Die Injektion von 2×10^6 CHO-K1 Zellen erfolgte i. v. in immundefiziente BALB/c Rag^{2-/-}-Mäuse, die anschließend sofort mit 4 Gy (Ganzkörper) bestrahlt wurden. Die Tiere der entsprechenden Gruppe wurden nur mit Lovastatin vorbehandelt, es erfolgte keine Nachbehandlung. Die Präparation der Lungen und Analyse der Metastasen erfolgte nach 3-4 Wochen. K, unbehandelt; L, Lovastatin Vorbehandlung; IR, Bestrahlung mit 4 Gy; IR+L, Bestrahlung nach Lovastatin Vorbehandlung.

Um herauszufinden, ob die starke Metastasenbildung nach ionisierender Strahlung – und die Hemmung durch Lovastatin – auf einer Induktion von pro-adhäsiven Faktoren auf Seite der Endothelzellen beruht, wurden BALB/c Rag^{2-/-}-Mäuse mit Lovastatin vorbehandelt (10 mg/kg, p. o.; 4 Tage) und danach mit 4 Gy ganzkörperbestrahlt. Sofort im Anschluss an die Bestrahlung wurden 2×10^6 unbehandelte CHO-K1 Zellen in die Schwanzvene injiziert. Die Analyse des prozentualen Tumorbereiches der präparierten Lungensektionen (Abb. 10) nach 3-4 Wochen ergab, dass die Bestrahlung der Maus und Injektion von unbehandelten Tumorzellen die Bildung von Metastasen signifikant um das 4-5fache erhöht. Diese Wirkung wurde durch Vorbehandlung mit Lovastatin deutlich reduziert. Aufgrund der Ergebnisse lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die pro-metastatische Strahlenwirkung vor allem durch endotheliale, Lovastatin-sensitive Strahlenantworten ausgelöst wird.

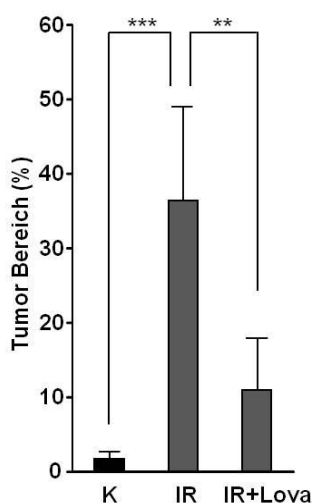


Abb. 10: Ganzkörperbestrahlung vor Tumorzell-Injektion induziert die Tumorzell-Extravasation *in vivo* und kann durch Lovastatin-Vorbehandlung gehemmt werden.

Unbehandelte 2×10^6 CHO-K1 Zellen wurden nach Ganzkörper-Bestrahlung von BALB/c Rag2^{-/-}-Tieren mit 4 Gy in die laterale Schwanzvene der Tiere injiziert. Ein Teil der Tiere wurde vor der Bestrahlung mit Lovastatin (10 mg/kg, p. o.) für 4 Tage vorbehandelt. Nach 3-4 Wochen wurden die entstandenen Lungenmetastasen als prozentualer Anteil pro Lungensektion analysiert und quantifiziert. **p≤0,01; ***p≤0,001 (4-8 Mäuse/pro Gruppe). K, unbehandelt; IR, Bestrahlung mit 4 Gy; IR+Lova, Bestrahlung nach Lovastatin Vorbehandlung.

3.3.3 Ionisierende Strahlung beeinflusst auch die Metastasenbildung im Scid CB-17-Mausmodell

Aufgrund der Tatsache, dass bei keiner der anfänglich getesteten humanen Karzinomzellen ein pro-metastatischer Strahleneffekt im BALB/c Rag2^{-/-}-Mausmodell detektiert werden konnte, wurden alle oben dargestellten Versuche mit tumorigenen Hamster-Zellen durchgeführt. Um die mögliche Relevanz der erhaltenen Daten für humane Karzinomzellen zu überprüfen, wurde das Metastasierungspotential von humanen Kolonkarzinomzellen (HT29) im CB-17-Scid-Mausmodell überprüft. Aufgrund der Tatsache, dass Scid-Mäuse sehr strahlensensitiv reagieren, bedingt durch einen DNA Reparaturdefekt (Tacciolo, 1998), wurde die Strahlendosis auf 2,5 Gy reduziert. Da angenommen wurde, dass es durch die geringere Strahlendosis zu einem abgeschwächten pro-metastatischen Effekt kommt, wurde das CB-17-Scid/HT29-System vor allem zur Bestätigung der bereits erhaltenen *in vivo*-Ergebnisse benutzt. Es wurden grundsätzlich die gleichen IR-Ergebnisse erhalten wie im BALB/c-CHO-K1-Modell, wenngleich die Metastasenbildung insgesamt schwächer ausfiel (Abb. 11B). Wie bereits zuvor wurde der prozentuale Tumorbereich im Vergleich zum Normalgewebe bestimmt. Weder in der unbestrahlten Kontrollgruppe, noch in der Lovastatingruppe konnte eine basale Metastasenbildung detektiert werden. Hingegen

zeigte eine Behandlung mit γ -Strahlen (2,5 Gy), nach Injektion von humanen HT29, eine deutliche Induktion der Tumorbildung in der Lunge (Abb. 11A). Desweiteren wurde dieser pro-metastatische Strahleneffekt erneut durch eine Statin-Vorbehandlung signifikant abgeschwächt. Im Vergleich zum BALB/c-Mausmodell zeigten sich in der bestrahlten Gruppe wesentlich kleinere Metastasen in den Lungensektionen.

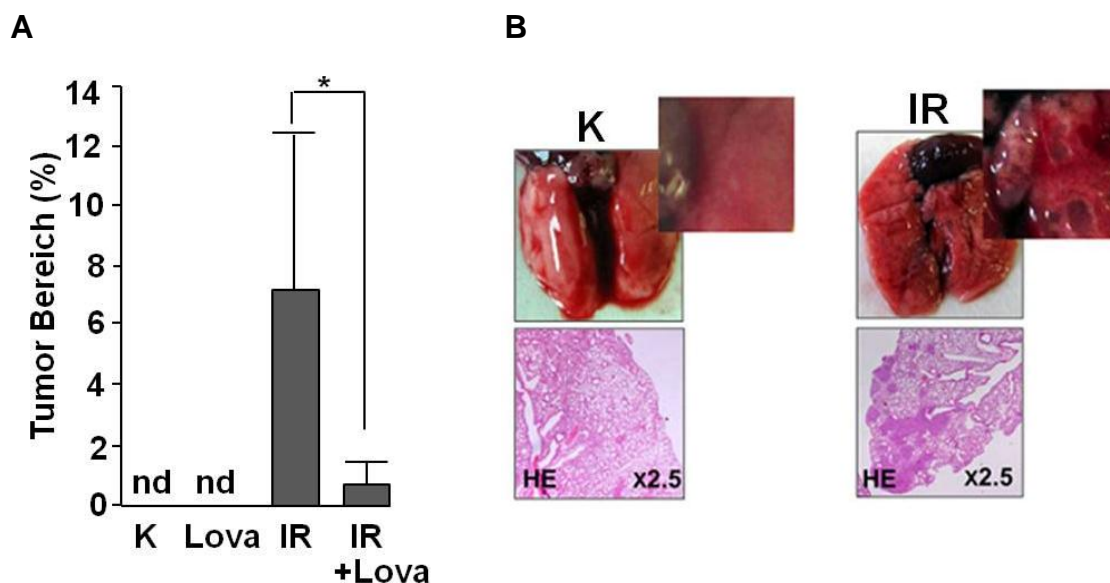


Abb. 11: Induktion von Lungenmetastasen in CB-17 Scid-Mäusen nach ionisierender Strahlung.

A, B: 2×10^6 humane Kolonkarzinomzellen (HT29) wurden in die laterale Schwanzvene von CB-17 Scid-Mäusen injiziert. Die Tiere wurde mit Lovastatin (10 mg/kg, p. o., 4 Tage) vorbehandelt oder nicht. Direkt nach Zellinjektion wurden die Mäuse mit 2,5 Gy bestrahlt (Ganzkörper) und nach 3-4 Wochen wurde die Bildung von Lungenmetastasen quantifiziert und bestimmt (siehe Material/Methoden).

A: Quantitative Analyse des prozentualen Tumorbereiches in den untersuchten Lungensektionen. K, nicht bestrahlte Gruppe; IR, Ganzkörperbestrahlung mit 2,5 Gy; nd, nicht detektierbare Metastasen. * $p \leq 0,05$ (n = 3-4 Mäuse).

B: Makroskopische und histologische Illustrationen des Strahleneffektes nach IR.

3.3.4 Rac1 ist in die IR-induzierbare Endothelzell-Tumorzell-Adhäsion involviert *in vitro* und *in vivo*

E-Selektin ist während der inflammatorischen Zellantwort für das sogenannte „Leukozyten-Rollen“ auf der Endothelzelloberfläche verantwortlich. Bereits Hallahan (1997) zeigte, dass die strahleninduzierte E-Selektin-Expression zu einer gesteigerten Leukozytenadhäsion am Endothel führt und diese durch Vorbehandlung mit Glycyrrhizin, einem Sialyl Lewis X-Strukturanalogon abgeschwächt werden kann. Verschiedene sLe^x-tragende Liganden konnten auch auf Kolonkarzinomzellen nachgewiesen werden, ebenso wie die hohe Bindungsfähigkeit dieser Tumorzellen an endotheliales E-Selektin (Rice, 1989; Takada, 1991; Matsuura, 1998). Daher sollte überprüft werden, inwiefern Sialyl Lewis X-Strukturen auch für die EZ-TZ-Interaktion *in vitro* bzw. im *in vivo*-Mausmodell bedeutsam sind. Für die *in vitro*-Versuche wurden endotheliale Zellen mit Glycyrrhizin für 30 Minuten vorbehandelt. Die relative Tumorzelladhäsion wurde wie in Material/Methoden beschrieben im Anschluss analysiert. Wiederholt wurde eine strahleninduzierte Erhöhung der TZ-Adhäsion an HUVEC beobachtet. Ein inhibierender Effekt von Glycyrrhizin (GL) konnte sowohl nach alleiniger EZ-Bestrahlung (Abb. 12A), sowie nach alleiniger TZ-Bestrahlung detektiert werden, wobei die inhibierende Wirkung bei zuvor bestrahlten Endothelzellen wesentlich stärker ausfiel. Dieser signifikante anti-adhäsive Effekt des sLe^x-Mimetikums war auch bei gleichzeitiger Bestrahlung von EZ und TZ nachweisbar (Abschwächung der Adhäsion um ~50 %).

Im weiteren Verlauf wurde der Einfluss des E-Selektin-Liganden Sialyl Lewis X auf IR-induzierte Tumorzelle extravasation und Metastasierung *in vivo* untersucht. Dazu wurden BALB/c Rag^{2-/-}-Mäuse 24 Stunden (10 mg/kg, i. p.), sowie 30 Minuten (5 mg/kg, i. p.) vor Tumorzellinjektion mit Glycyrrhizin vorbehandelt. Sofort im Anschluss an die intravenöse Injektion der tumorigenen CHO-K1 Zellen wurden die Tiere mit 4 Gy ganzkörperbestrahlt. Nach 3-4 Wochen wurden die präparierten Lungensektionen quantifiziert. In Übereinstimmung mit den zuvor gezeigten *in vitro*-Daten, resultierte eine Glycyrrhizin-Vorbehandlung der Mäuse in einer signifikanten Inhibierung der Metastasenbildung in den untersuchten Lungensektionen. Der prozentuale Tumorbereich zeigte eine Verringerung von ~43 % Tumorgewebe in bestrahlten Mäusen zu ~5 % in bestrahlten, mit GL vorbehandelten Mäusen (Abb. 12C).

Der Transkriptionsfaktor NF-κB spielt bei der Induktion der E-Selektin-Expression sowohl durch inflammatorische Zytokine (Schindler und Baichwal, 1994) als auch

durch ionisierende Strahlung (Hallahan, 1995) eine entscheidende Rolle. Da bekannt ist, dass die Aktivierung von NF- κ B nach ionisierender Strahlung bzw. Behandlung mit TNF α u. a. durch die Ras-homologe GTPase Rac1 reguliert wird, deutet dies darauf hin, dass Rac1 möglicherweise eine Rolle bei der strahleninduzierten Tumorzelladhäsion *in vitro* bzw. der Tumorzellextravasation und Metastasierung *in vivo* spielen könnte. Um dieser Frage nachzugehen wurde der spezifische Rac1-Inhibitor NSC23766 verwendet (Gao, 2004). HUVEC wurden mit 100 μ M NSC23766 für 4 Stunden vorbehandelt oder nicht, anschließend mit 10 Gy bestrahlt und zwei Stunden nach Zugabe der humanen Kolonkarzinomzellen HT29 wurde die relative Tumorzelladhäsion an den Endothelzellen bestimmt.

Wie in Abbildung 12B zu sehen ist, inhibierte die Vorbehandlung der endothelialen Zellen mit NSC23766 vor allem die strahleninduzierte EZ-TZ-Adhäsion nach γ -Bestrahlung der Endothelzellen. So wurde eine Abschwächung der Adhäsion um ~50 % erreicht. Wurden nur die Tumorzellen bestrahlt, konnte zwar ein Strahleneffekt detektiert, jedoch keine deutliche Inhibierung in Folge einer Rac1-Hemmung festgestellt werden. Aufgrund der oben dargestellten *in vitro*-Befunde, wurden im Hinblick auf eine mögliche Beeinflussung der Tumorzell-Extravasation, BALB/c Rag^{2-/-}-Mäuse jeweils 48 und 24 Stunden vor Ganzkörperbestrahlung mit 4 Gy mit 5 mg/kg durch intraperitoneale Injektion behandelt. Drei bis vier Wochen nach Tumorzellinjektion wurden die Lungen der Tiere präpariert und der prozentuale Anteil des Tumorgewebes im Vergleich zum Normalgewebe quantifiziert. Vorbehandlung mit NSC23766 inhibierte die pro-metastatische Wirkung der ionisierenden Strahlung nahezu komplett (Abb. 12B). Somit sind Rac1-regulierte Signalwege auch für die IR-induzierbare Extravasation und Ausbildung von Lungenmetastasen *in vivo* relevant.

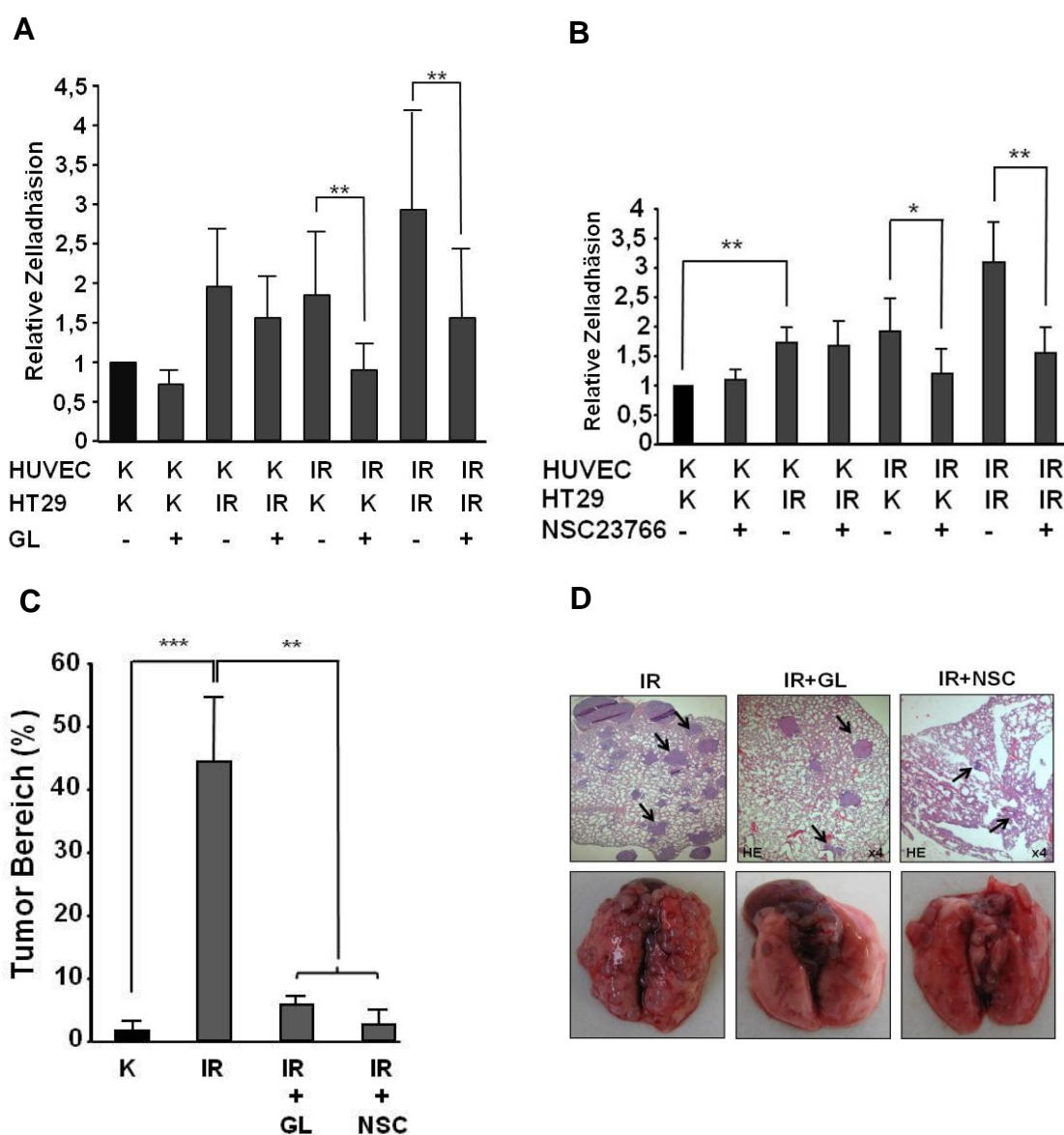


Abb. 12: E-Selektin-Liganden und Rac1 sind in die strahleninduzierte Tumorzell-Endothelzell-Adhäsion *in vitro* und Metastasierung *in vivo* involviert.

A, B: HUVEC wurden vorbehandelt oder nicht mit (A) Glycyrrhizin (Sialyl Lewis X-Mimetikum) (2 mM, 30 min) oder (B) NSC23766 (Rac1-Inhibitor) (100 μ M, 4 h). Zwei Stunden nach γ -Bestrahlung mit 10 Gy wurde die Tumorzell-Endothelzell-Interaktion *in vitro* gemessen. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ ($n = 8$).

C, D: Immundefiziente $Rag^{2-/-}$ BALB/c-Mäuse wurden mit Glycyrrhizin (GL) oder NSC23766 (NSC) vorbehandelt oder nicht. Es folgte die Injektion von 2×10^6 CHO-K1 Zellen in die laterale Schwanzvene und eine sofortige Bestrahlung mit 4 Gy (Ganzkörper). Nach 3-4 Wochen wurde die Bildung von Lungenmetastasen analysiert. (C) Übersichtsdiagramm über den prozentualen Anteil an Tumorgewebe in den präparierten Lungensektionen. K, unbestrahlt; IR, Ganzkörperbestrahlung mit 4 Gy. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ ($n = 4-8$ Tiere). (D) Makroskopische und histologische Illustrationen der jeweiligen Behandlungsgruppe.

4. Diskussion

Nebeneffekt von ionisierender Strahlung ist eine phänotypische und genotypische Änderung von Tumorzellen, welche die Strahlenbehandlung überlebt haben. Dies führt zu einer erhöhten Malignität. Demzufolge zeigten verschiedene *in vitro*-Studien eine Zunahme von Tumorzell-Adhäsion, -Motilität und -Invasivität nach Bestrahlung, basierend auf Veränderungen der Genexpression verschiedener pro-maligner Faktoren, wie z. B. Matrixmetalloproteinasen (MMP) (Park, 2006; Jung, 2007, Nübel, 2004). Ebenso konnte bei *in vivo*-Studien gezeigt werden, dass strahleninduzierte zelluläre Stressantworten von überlebenden Tumorzellen deren invasives Potenzial fördern können (Camphausen, 2001; Nakayama, 2007). Bei *in vitro*-Studien zeigte Kaliski im Jahr 2005, dass ionisierende Strahlung zu einem dosisabhängigen Anstieg der Invasion von B16 Melanomzellen im Matrigel-Invasion-Assay führt. Pro-metastatische *in vivo*-Effekte zeigten auch Agemy et al (Agemy, 2008), bei der eine Behandlung von SCID-Mäusen mit IR nach Injektion von WISH-PC2 und WM-4A Prostatakarzinomzellen eine erhöhte Metastasenbildung im Bereich der Nieren und interscapulären Bereichen förderte. Ergebnisse, die auch von Sofia Vala et al. verifiziert werden konnten. Hier zeigten niedrige Dosen ionisierender Strahlung ebenfalls einen Anstieg von Tumorwachstum und Metastasierung (Sofia Vala, 2010)

Auch Patientendaten unterstützen die Bedenken möglicher pro-metastatischer Wirkungen ionisierender Strahlung (Ito, 1984; Chung, 2006). So zeigte De la Monte bereits im Jahr 1988, dass Behandlung von Patienten mit ionisierender Strahlung zu einem erhöhten Aufkommen von Metastasen im Bereich von Darm, Pankreas und Substantia alba führen. Jedoch wird die klinische Relevanz pro-metastatischer IR-Effekte äußerst kontrovers diskutiert (Madani, 2008; Brown, 2008).

4.1 Pharmakologische Modifikation von zytokin- und strahleninduzierter Adhäsion zwischen Endothel- und Tumorzellen *in vitro*

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Vorbehandlung von tumorigenen Zellen mit inflammatorischen Zytokinen, wie $\text{TNF}\alpha$, zu einer Erhöhung der Tumorzelladhäsion führt. Die Adhäsion von bestrahlten Tumorzellen konnte noch erhöht werden, wenn Endothelzellen mit $\text{TNF}\alpha$ zusätzlich vorbehandelt wurden. Ein pro-adhäsiver Effekt konnte bereits in einer früheren Studie von Nübel et al. (2004) bei Vorbehandlungen von Endothelzellen mit $\text{TNF}\alpha$ beobachtet werden. Ob eine gleichzeitige Behandlung der Tumorzellen mit $\text{TNF}\alpha$ und ionisierender Strahlung ebenfalls einen additiven Effekt zeigen würde, bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten. Jedoch deuten die bisherigen Ergebnisse der Arbeitsgruppe auf einen solch additiven pro-adhäsiven Effekt hin, da bereits eine dosisabhängige additive Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ und IR auf die E-Selektin-Proteinexpression beobachtet werden konnte. Beide Agenzien induzieren eine NF- κ B-Aktivierung, welche essentiell für eine Stimulation der Expression von Zelladhäsionsmolekülen, wie E-Selektin ist. Somit konnte gezeigt werden, dass NF- κ B relevant für die TZ-EZ-Adhäsion ist.

In weiteren Versuchen konnte zudem gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung von HUVEC mit dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin zu einer Inhibierung der strahleninduzierten Tumorzelladhäsion führt, jedoch keinen deutlichen Einfluss auf die Tumorzelladhäsion an Endothelzellen *in vitro* hat, wenn selektiv nur Tumorzellen vorbehandelt werden. Dieser Befund deutet daraufhin, dass die anti-adhäsiven Wirkungen von Statinen hauptsächlich auf einer verringerten Hochregulation endothelialer Adhäsionsfaktoren nach γ -Strahlung beruhen. Mittels mRNA-Expressionanalysen sollte festgestellt werden, welche Zelladhäsionsmoleküle essentiell für die strahleninduzierte Steigerung der Endothelzell-Tumorzell-Adhäsion sind und zudem für die inhibitorischen Wirkungen von Lovastatin bedeutsam sind. Es wurde gezeigt, dass die mRNA-Expression von E-Selektin und ICAM-1 nach IR Exposition von Endothelzellen erhöht ist. Es wird angenommen, dass die Proteinmenge ebenfalls zunimmt, da in vorherigen Studien eine Änderung der jeweiligen Proteinmenge mit der Steigerung der mRNA-Expression übereinstimmte (Nübel, 2004). Als entsprechende Counterliganden auf Seite der Tumorzellen zeigten LAMP2, CXCR4, CD44 (Tomlinson, 2000; Hanley, 2005) eine Hochregulation der mRNA vier Stunden nach γ -Bestrahlung. Diese wurde jedoch nicht

durch eine Vorbehandlung mit Lovastatin beeinflusst. Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen wonach eine Lovastatin-Behandlung von Tumorzellen keinen Einfluss auf die Tumorzell-Endothelzell-Adhäsion hat. Ob CD44, LAMP2 und CXCR4 funktionell in die TZ-EZ-Adhäsion involviert sind, ist noch weitgehend unklar. Jedoch konnte bereits von Saitoh et al. (1992) beobachtet werden, dass stark metastasierende Kolonkarzinomzellen eine größere Anzahl an LAMP1-Molekülen exprimieren, als gering metastasierende Zellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass sowohl LAMP1, als auch LAMP2 Sialyl Lewis X-Strukturen besitzen. Eine Zunahme an LAMP1 und LAMP2 Molekülen auf der Zelloberfläche führte, bei gleichzeitiger Erhöhung von sLeX-Determinanten, zu einer erhöhten Adhäsion der Tumorzellen an E-Selektin-exprimierenden Zellen (Sawada, 1993).

Vor kurzem konnte festgestellt werden, dass IR die Sialylierung von Beta1-Integrinen fördert (Lee, 2010). Da sialylierte Proteine als E-Selektin-Gegenliganden diskutiert werden (Kobayashi, 2007), wäre es denkbar, dass die Stimulation der Tumorzell-Endothelzell-Adhäsion nach γ -Bestrahlung der Tumorzellen eher aus einer Veränderung der post-translationalen Modifikation von pro-adhäsiven Molekülen resultiert, als aus einer Erhöhung ihrer „de novo“-Syntheserate.

Die *in vitro*-Ergebnisse zeigen einen additiven Effekt, wenn sowohl Endothel- als auch Tumorzellen mit ionisierender Strahlung behandelt werden und eine gleichzeitige Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen und den entsprechenden Gegenliganden auf den humanen Tumorzellen stattfindet.

4.2 Tumorzellextravasation und Metastasierung kann *in vivo* durch ionisierende Strahlung induziert werden

Die Bindung von Tumorzellen an das Endothel ist die Voraussetzung für die Extravasation *in vivo*. *In vitro*-Daten legen die Vermutung nahe, dass eine Strahlentherapie auch zu einer Förderung der Metastasierung *in vivo* führen könnte. Die beobachtete Hochregulation von NF- κ B, sowie E-Selektin und ICAM-1 sind übereinstimmend mit früheren Studien, die eine jeweilige Erhöhung nach Behandlung mit ionisierender Strahlung zeigten (Hallahan, 1995; Hallahan, 1996; Hallahan, 1998; Schindler, 1994). Die Entscheidung murine CHO-K1 Zellen zu benutzen, welche ein tumorigenes Wachstum aufweisen (Kikkawa, 2002), wurde nach Testung von verschiedenen humanen

Karzinomzellen getroffen, welche entweder ein zu hohes oder eine zu geringes basales Metastasierungspotential aufwiesen. Allein die ausgewählten CHO-K1 Zellen zeigten sich im Rag^{2/-}-Mausmodell als geeignet, um mögliche pro-metastatische Strahleneffekte genauer zu untersuchen.

Eine Ganzkörperbestrahlung von Mäusen, welchen zuvor Tumorzellen injiziert wurden, zeigte eine starke Kolonialisierung der Lunge mit Metastasen. Da die Extravasation von zirkulierenden tumorigenen Zellen Voraussetzung für die Formation von Lungenmetastasen ist und Endothelzell-Tumorzell-Adhäsion durch ionisierende Strahlung *in vitro* stimuliert werden konnte, ist davon auszugehen, dass Ganzkörperbestrahlung den Prozess der Tumorzell-Extravasation fördert. In Anbetracht der klinischen Situation deuten die Resultate daraufhin, dass trotz der unbestrittenen günstigen therapeutischen Wirksamkeit von Radiotherapien (z. B. Abtöten der Tumorzellen) diese die Wahrscheinlichkeit erhöhen könnten, dass überlebende Tumorzellen extravasieren und neue Tumore an sekundären Orten bilden können. Pro-metastatische Effekte von Radiotherapien könnten deren therapeutische Wirksamkeit schmälern. Eine selektive Hemmung der pro-metastatischen Strahlenwirkungen würde somit vermutlich zu einer Zunahme der therapeutischen Wirksamkeit von Radiotherapien beitragen.

4.3 Lovastatin wirkt als potentieller Inhibitor strahleninduzierter Metastasenbildung *in vivo*

Aus früheren Studien ist bekannt, dass Statine Gewebeschäden (z. B. pro-inflammatorische und pro-fibrotische Strahlenantworten), welche durch die Radiotherapie als akute oder verspätete Nebenwirkungen entstehen verringern (Wang, 2007; Ostrau, 2009; Monceau, 2010). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung von Mäusen mit Lovastatin ausreichend für eine Hemmung der Metastasierung nach Ganzkörperbestrahlung ist. Eine zusätzliche Lovastatin-Nachbehandlung für eine ausgedehnte Periode (14 Tage) hatte weder vorteilhafte noch nachteiligen Effekt hinsichtlich Metastasenbildung.

Bestrahlung der Mäuse vor einer Tumorzell-Injektion zeigte, dass Ganzkörper-Bestrahlung zu einem sog. Trans-Effekt führt, der durch die Strahlenantwort des Normalgewebes entsteht, welche die metastatischen Eigenschaften der Tumorzellen stimuliert. Es ist zu vermuten, dass diese Trans-Effekte auf einer strahleninduzierten

Aktivierung pro-adhäsiver endothelialer Funktionen beruhen. Die Vorbehandlung der Mäuse mit Lovastatin war ausreichend, um diese pro-adhäsiven IR-Antworten des Endotheliums zu blockieren und, demzufolge der IR-vermittelten Tumorzell-Extravasation und Bildung von Lungenmetastasen entgegenzuwirken.

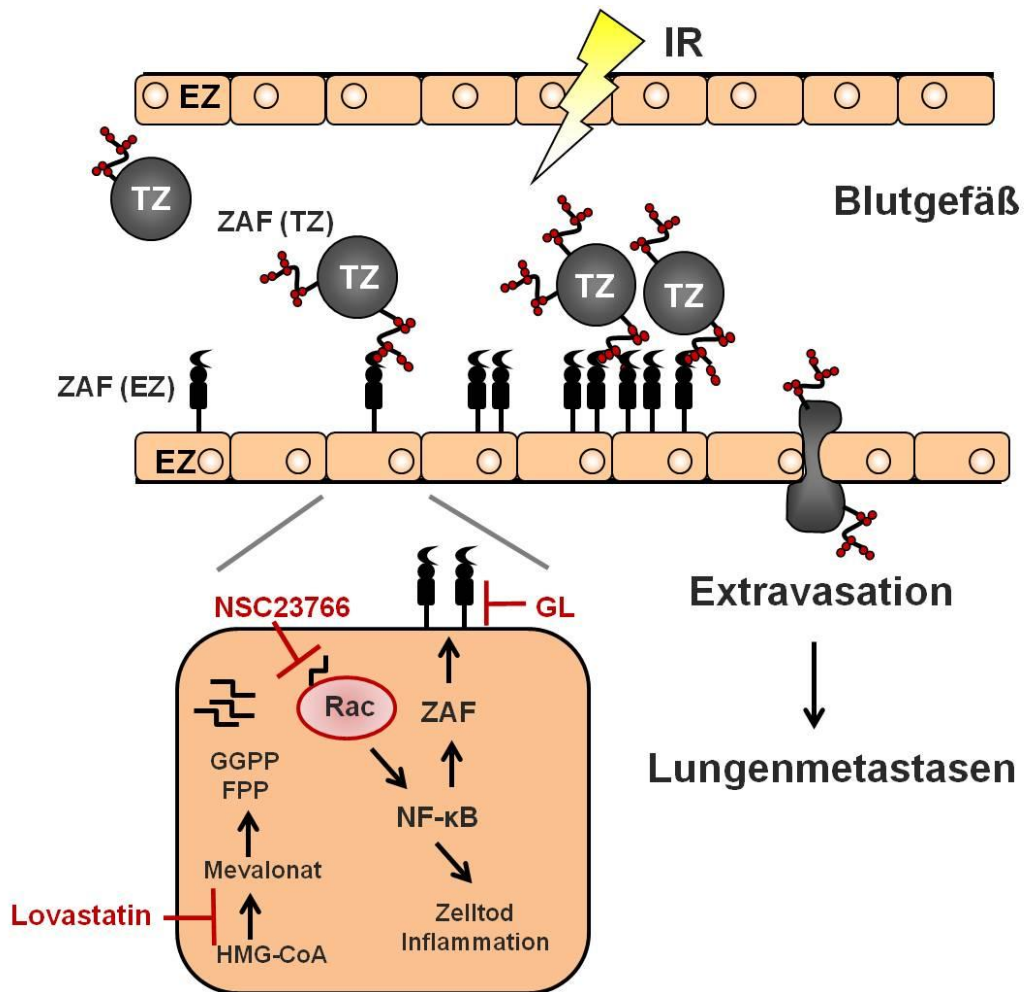
Die im Rag^{2-/-}-Mausmodell beobachteten pro-metastatischen Effekte nach IR konnten mit humanen Karzinomzellen nicht verifiziert werden, da keine der getesteten humanen Tumorzellen hier einen deutlichen strahleninduzierten Effekt zeigten. Um die Relevanz der mit CHO-K1 Zellen beobachteten Effekte für humane Zellsysteme zu überprüfen, wurden humane Kolonkarzinomzellen (HT29) in CB-17 SCID-Mäuse injiziert. In diesem Mausmodell konnte eine IR-induzierte Steigerung der Lungenmetastasierung beobachtet werden, wenngleich der Effekt deutlich geringer ausfiel als im Rag^{2-/-}/CHO-K1-Modell. Ein Grund hierfür könnte die notwendig gewordene Reduktion der Strahlendosis sein. Da SCID-Mäuse strahlensensitiv sind, durch einen Defekt in der DNA-Reparatur (Nicht-homologes End-joining (NHEJ)) (Taccioli, 1998), wurde die zur Ganzkörperbestrahlung dieser Tiere eingesetzte Dosis um fast 50 % auf 2,5 Gy reduziert. Es kann angenommen werden, dass sich die pro-metastatische endotheliale Strahlenantwort dadurch verändert hat und der pro-metastatische Effekt letztendlich abgeschwächt wurde. Trotzdem konnten auch in diesem Modellsystem die im Rag^{2-/-}-Modell erhaltenen Resultate qualitativ vollständig bestätigt werden. Insgesamt zeigen die Resultate somit, dass pro-metastatische Effekte nach IR grundsätzlich auch auf das humane Zellsystem übertragen werden können. Ebenso führte eine Vorbehandlung der SCID-Mäuse mit Lovastatin zu einer deutlichen Reduktion der Bildung von Lungenmetastasen nach Ganzkörperbestrahlung.

4.4 Modulation von Zelladhäsionsmolekülen zur Verminderung strahleninduzierter Nebeneffekte

E-Selektin und seine Liganden sind essentiell für eine strahleninduzierte Tumorzell-Extravasation und Metastasierung. Daher ist anzunehmen, dass eine strahleninduzierte Tumorzellextravasation durch eine Rac1/NF-κB-abhängige Aktivierung der Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle (u. a. E-Selektin) und entsprechender E-Selektin-Liganden, wie z. B. Sialyl Lewis X-Kohlenhydrate, beeinflusst werden kann. Da Rho-

GTPasen, wie Rac1, als relevante Zielmoleküle von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (z. B. Lovastatin) bekannt sind, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die beobachtete protektive Wirkung von Statinen auf strahleninduzierte Tumorzell-Extravasation und Metastasenbildung aus einer Hemmung der Rac1/NF- κ B-regulierten Hochregulation von E-Selektin resultiert.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit der Nachweis erbracht werden, dass ionisierende Strahlung die Tumorzell-Endothelzell-Interaktionen *in vitro* erhöht und zudem *in vivo* die Wahrscheinlichkeit einer Extravasation zirkulierender tumorigener Zellen und die Ausbildung von Lungenmetastasen verstärkt. In zwei verschiedenen Mausmodellen führte eine Ganzkörperbestrahlung zu einer Stimulation der Tumorzell-Extravasation von zirkulierenden murinen und humanen Tumorzellen und daraus folgend zu einer verstärkten Ausbildung von Lungenmetastasen. Dieser Effekt scheint vor allem auf einer Rac1-abhängigen Hochregulation von endothelialen Adhäsionsfaktoren zu beruhen. Allerdings sind auch tumorzellenspezifische pro-adhäsive Faktoren durch Strahlung induzierbar. Da eine Bestrahlung von Mäusen vor Tumorzellinjektion ausreichend war um Metastasierungsprozesse *in vivo* zu stimulieren, kann davon ausgegangen werden, dass auch eine alleinige Bestrahlung von Normalgewebe (z. B. Beispiel bei prophylaktischen Therapieformen) ausreichend ist, um Metastasierung zu fördern. Die als Lipidsenker weit verbreiteten Statine stellen eine geeignete pharmakologische Substanzklasse dar, mit der solchen pro-metastatischen Strahleneffekten entgegen gewirkt werden kann. Die Frage, inwieweit Statine die therapeutische Wirksamkeit von Strahlentherapien weiter verbessern könnten, indem sie unerwünschte pro-metastatische Effekte verringern, kann letztendlich nur in retrospektiven oder prospektiven klinischen Studien geklärt werden.



Modell 1: Pharmakologische Strategien zur Prophylaxe von unerwünschten Nebenwirkungen wie Tumorzell-Extravasation und Metastasierung nach ionisierender Strahlung.

Die Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf Endothelzellen (EZ) und Tumorzellen (TZ) wird durch ionisierende Strahlung gefördert, dies führt zu einer Steigerung der Tumorzell-Endothelzell-Adhäsion und darausfolgend der Extravasation von Tumorzellen in umliegendes Gewebe. Durch die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor (Lovastatin)-abhängige Hemmung der Rac1-regulierten NF-κB-Aktivierung kann die IR-induzierte endotheliale Expression von Zelladhäsionsmolekülen spezifisch abgeschwächt werden. Dies führt zu einer Hemmung der Adhäsion von Tumorzellen und somit der Extravasation und anschließenden Metastasierung. Die strahleninduzierte Metastasierung kann auch durch gezielte Hemmung von Rac1 mit NSC23766, sowie einem Sialyl Lewis X-Mimetikum (Glycyrrhizin) reduziert werden.

EZ: Endothelzelle; TZ: Tumorzelle; ZAF: Zelladhäsionsfaktoren; GGPP: Geranylgeranylpyrophosphat; FPP: Farnesylpyrophosphat; GL: Glycyrrhizin; IR: Ionizing Radiation.

5. Zusammenfassung

Exposition von Endothelzellen mit ionisierender Strahlung (IR) oder Behandlung mit inflammatorischen Zytokinen (z. B. $\text{TNF}\alpha$) induziert über eine Rho-GTPasen abhängige NF- κ B-Aktivierung die Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle, u. a. auch von E-Selektin. E-Selektin vermittelt die Adhäsion von Tumorzellen (TC) an Endothelzellen und ist daher vermutlich an der Extravasation von zirkulierenden Tumorzellen beteiligt. HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine), welche eine breite klinische Anwendung als Lipidsenker erfahren, sind in der Lage, Rho-GTPasen und die durch sie vermittelten Signalwege zu hemmen. Daher sollten Statine wie Lovastatin auch Zell-Zell-Adhäsionsvorgänge beeinflussen. Die vorliegende Arbeit widmet sich den Mechanismen, mit denen IR und $\text{TNF}\alpha$ in Endothel- und/oder Tumorzellen pro-adhäsive Faktoren induzieren können und ob diese Effekte durch Lovastatin beeinflussbar sind. Zu diesem Zweck wurde mittels eines ELISA-basierenden Zelladhäsions-Assays die Auswirkung von IR und $\text{TNF}\alpha$ auf Zell-Zell-Kontakte zwischen humanen Tumorzellen (u. a. Kolonkarzinomzellen (HT29)) und humanen, venösen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) analysiert. Zudem wurden die Effekte einer Lovastatinvorbehandlung von TC und/oder HUVEC auf TC-HUVEC-Adhäsion untersucht. Des Weiteren wurden die Wirkungen des sLe^x-Mimetikums Glycyrrhizin und des Rac1-spezifischen „small-molecule“ Inhibitors NSC23766 auf TC-HUVEC-Adhäsion überprüft. Zusätzlich wurde die strahleninduzierbare mRNA-Expression von diversen Zelladhäsionsmolekülen, Metastasierungsfaktoren und DNA-Reparatur-Genen mittels qRT-PCR (Real-Time Analysen) quantitativ erfasst. Um die erhaltenen *in vitro* Ergebnisse auch *in vivo* zu bestätigen, untersuchten wir den Effekt einer Ganzkörperbestrahlung (TBI) von BALB/c-Mäusen auf die Expression von pro-adhäsiven Faktoren. Zur Analyse der Tumorzell-Extravasation wurden Tumorzellen in die laterale Schwanzvene immundefizienter Mäuse injiziert und anschließend eine Ganzkörperbestrahlung durchgeführt (4 Gy). Nach einer Wartezeit von 4 Wochen wurde ein erhöhtes Auftreten von Lungenmetastasen beobachtet, welches durch Vorbehandlung der Tiere mit Statinen, NSC23766 oder Glycyrrhizin blockiert werden konnte. Zusammenfassend konnte somit ein Einfluss von IR auf die Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle *in vitro* und auf die Extravasation zirkulierender Tumorzellen *in vivo* festgestellt werden. Diese pro-

metastatischen Strahleneffekte konnten durch pharmakologische Hemmung Rho-regulierter Signalwege abgeschwächt werden.

Exposure of endothelial cells with ionizing radiation (IR) or treatment with inflammatory cytokines (e. g. $\text{TNF}\alpha$) induces a Rho-GTPase and NF- κ B dependent activation of the expression of various cell adhesion molecules, including E-selectin. E-selectin mediates the adhesion of tumor cells (TC) to endothelial cells and is probably involved in the extravasation step of circulating tumor cells. HMG-CoA reductase inhibitors (e. g. lovastatin) inhibit the function of Rho-GTPases and thus are anticipated to attenuate Rho-regulated cell-cell-adhesion as well. This study focuses on the influence of IR and $\text{TNF}\alpha$ on the expression of endothelial- and/or tumor cell-specific pro-adhesive factors and whether these effects are influenced by lovastatin. To this end, the effect of IR and $\text{TNF}\alpha$ on cell-cell-interactions between human colon carcinoma cells (HT29) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was investigated using an ELISA-based cell adhesion-assay. Moreover, the influence of pre-treatment with lovastatin and other types of inhibitors on HUVEC-HT29 adhesion was monitored. Additionally, we investigated the effect of lovastatin on mRNA expression level of different cell adhesion molecules, metastatic factors and DNA-repair genes upon radiation exposure by qRT-PCR. To scrutinize the *in vivo* relevance of the data obtained, we investigated the effect of total body irradiation (TBI) on the mRNA expression of pro-adhesive factors in BALB/c mice. To analyze tumor cell extravasation, tumor cells were injected into the lateral tail vein of immunodeficient mice, followed by total body irradiation (TBI, 4 Gy). After four weeks a large increase of lung metastases was monitored, which could be blocked by pretreatment of the mice with lovastatin, the Rac1-specific small-molecule inhibitor NSC23766 as well as the sLe^x-mimetic glycyrrhizin. Summarizing, we provide evidence, that irradiation promotes upregulation of different cell adhesion molecules *in vitro* and stimulates extravasation of circulating tumor cells *in vivo*. These pro-metastatic radiation effects could be attenuated by pharmacological inhibition of Rho-regulated signaling.

Literaturverzeichnis

- Abati A., and Liotta L. A. (1996). Looking forward in diagnostic pathology: the molecular superhighway. *Cancer* 78, 1-3.
- Aberle H., Schwartz I., and Kemler R. (1996). Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J. Cell Biochem.* 61, 514-523.
- Agemy L., Harmelin A., Waks T., Leibovitch I., Rabin T., Pfeffer M., and Eshhar Z. (2008). Irradiation enhances the metastatic potential of prostatic small cell carcinoma xenografts. *The Prostate* 68, 530-539.
- Ahamed A., Tsurumi S., Ozaki M., and Amakawa T. (2001). An artificial sweetener stimulates the sweet taste in insect: dual effects of glycyrrhizin in *Phormia regina*. *Chem. Senses* 26, 507-515.
- Albelda S. M., and Buck C. A. (2001). Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 11, 2868-2880.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Watson J. D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. Published by Garland Publishing, a member of the Taylor & Francis Group.
- Al-Mehdi A. B., Tozawa K., Fisher A. B., Shientag L., Lee A., and Muschel R. J. (2000). Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat. Med.* 6, 100-102.
- Alon R., Feizi T., Yuen C. T., Fuhlbrigge R. C., and Springer T. A. (1995). Glycolipid ligands for selectins support leukocyte tethering and rolling under physiologic flow conditions. *J. Immunol.* 154, 5356-5366.
- Asano T., Ishihara K., Morota T., Takeda S., and Aburada M. (2003). Permeability of the flavonoids liquiritigenin and its glycosides in licorice roots and davidigenin, a hydrogenated metabolite of liquiritigenin, using human intestinal cell line Caco-2. *J. Ethnopharmacol.* 89, 285-289.
- Asmuth von E. J., Smeets E. F., Ginsel L.A., Onderwater J. J., Leeuwenberg J. F., and Buurman W. A. (1992). Evidence for endocytosis of E-selectin in human endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* 22, 2519-2526.
- Baeuerle P. A., and Baltimore D. (1996). NF- κ B: ten years after. *Cell* 87, 13-20.
- Baichwal V. R., and Baeuerle P. (1997). Apoptosis: Activate NF- κ B or die? *Current Biol.* 7, R94-96.
- Baldwin A. S. (1996). The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annual Rev. Immunol.* 14, 649-683.
- Baltina L. A. (2003). Chemical modification of glycyrrhizic acid as a route to new bioactive compounds for medicine. *Current Med. Chem.* 10, 155-171.
- Baluna R., Eng T., and Charles T. (2006). Adhesion Molecules in Radiotherapy. *Radiation Research* 166, 819-831.
- Beg A. A., Finco T. S., Nantermet P. V., and Baldwin A. S. (1993). Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I κ B alpha: a mechanism for NF- κ B activation. *Mol. Cell Biol.* 13, 3301-3310.

- Berg E. L., Robinson M. K., Mansson O., Butcher E. C., and Magnani J. L. (1991). A carbohydrate domain common to both sialyl Le (a) and sialyl Le (X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J. Biol. Chem.* 266, 14869-14872.
- Bevilacqua M., Butcher E., Furie B., Gallatin M., Gimbrone M., Harlan J., Kishimoto K., Lasky L., and McEver R. (1991). Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell* 67, 233.
- Bevilacqua M. P., Pober J. S., Mendrick D. L., Cotran D. S., and Gimbrone M. A. Junior (1987). Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9238-9242.
- Bevilacqua M. P., Stengelin S., Gimbrone M. A. Junior, and Seed B. (1989). Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243, 1160-1165.
- Bevilacqua M. P., and Nelson R. M. (1993). Selectins. *J. Clin. Invest.* 91, 379-87.
- Birchmeier W., and Behrens J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formations of cell functions and the prevention of invasiveness. *Biochim. Biophys. Acta Review* 1198, 11-26.
- Billroth A. T. (1878). *The New Sydenham Society.*
- Bloemen P. G., van den Tweel M. C., Henricks P. A., Engels F., Wagenaar S. S., Rutten A. A., and Nijkamp F. P. (1993). Expression and modulation of adhesion molecules on human bronchial epithelial cells. *AM J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9, 586-593.
- Bonizzi G., and Karin M. (2004). The two NF-kappa B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25, 280-288.
- Bourne H. R., Wrischnik L., and Kenyon C. (1990). Ras proteins. Some signal developments. *Nature* 348, 678-679.
- Bourne H. R., Sanders D. A., and McCormick F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348, 125-132.
- Bowie A. G., Moynagh P. N., and O'Neill L. A. (1997). Lipid peroxidation is involved in the activation of NF-kappa B by tumor necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. Lack of involvement of H₂O₂ in NF-kappa B activation by either cytokine in both primary and transformed endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 25941-25950.
- Brach M. A., Hass R., Sherman M. L., Gunji H., Weichselbaum R., and Kufe D. (1991). Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B. *J. Clin. Invest.* 88, 691-695.
- Brown P. D., Asher A. L., and Farace E. (2008). Adjuvant whole brain radiotherapy: strong emotions decide but rational studies are needed. *Int. J. Radiat. Incol. Biol. Phys.* 70, 1305-1309.
- Camphausen K., Moses M. A., Beecken W. D., Khan M. K., Folkman J., and O'Reilly M. S. (2001). Radiation therapy to a primary tumor accelerates metastatic growth in mice. *Cancer Res.* 61, 2207-2211.
- Cavallaro U., and Christoferi G. (2004). Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim. Biophys. Acta* 1552, 39-45.

- Chambers A. F., Groom A. C., and McDonald I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563-572.
- Chou K. C. (1995). The convergence-divergence duality in lectin domains of selectin family and its implications. *FEBS Lett.* 363, 123-126.
- Christofori G and Semb H (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* 24, 73-76.
- Chung Y. L., Jian J. J., Cheng S. H., Tsai S. Y., Chuang V. P., Soong T., Lin Y. M., and Horng C. F. (2006). Sublethal irradiation induces vascular endothelial growth factor and promotes growth of hepatoma cells: implications for radiotherapie of hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 12, 2706-2715.
- Courtois G., and Israael A. (2000). NF-kappa B defects in humans: the NEMO/incontinentia pigmenti connection. *Science STKE* 2000, PE1.
- De Grendele H., Estess P., and Siegelman M. (1997). Requirements for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 278, 672-675.
- De la Monte S. M., Hutchins G. M., and Moore G. W. (1988). Altered metastatic behavior of small cell of the lung after chemotherapie and radiation. *Cancer* 61, 2176-2182.
- De Leeuw H. P., Wijers-Koster P. M., van Mourik J. A., and Voorberg J. (1999). Small GTP-binding protein RalA associates with Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Thromb. Haemost.* 82, 1177-81.
- Dimitroff C. J., Lee J. Y., Rafii S., Fuhlbrigge R. C., and Sackstein R. (2001). CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells. *J. Cell Biol.* 153, 1277-1286.
- Dixit V., and Mak T. W. (2002). NF-kappa B signaling. Many roads lead to Madrid. *Cell* 111, 615-619.
- D'Souza-Schorey C., Boshans R. L., McDonough M., Stahl P. D., and Van Aelst L. (1997). A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J.* 16, 5445-5454.
- Dvorsky R, and Ahmadian M. R. (2004). Always lok on the bride site of Rho: structural implications for a conserved intermolecular interface. *EMBO Rep.* 5, 1130-1136.
- Eble J. A. (2001). The molecular basis of integrin-extracellular matrix-interactions. *Osteoarthritis Cartilage* 9, 131-140.
- Elices M. J., Osborn L., Takada Y., Crouse C., Luhowskij S., Hemler M. E., and Lobb R. R. (1990). VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60, 577-584.
- Endo A., Kuroda M., and Tsujita Y. (1976). ML-236A, ML-236B and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 29, 1346-1348.
- Endo A. (1988). Chemistry, biochemistry, and pharmacology of HMG-CoA reductase inhibitors. *Klin. Wochenschr.* 66, 421-427.
- Engelhardt B., and Wolburg H. (2004). Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur. J. Immunol.* 34, 2955-2963.

- Etienne-Manneville S., and Hall A. (2002). Rho-GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Fidler I. J. (2002). Critical determinants of metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 12, 89-96.
- Fidler I. J. (2008). The seed and soil hypothesis revisited. *The Lancet Oncology* 8, 808.
- Fisher E. R., and Fisher B. (1969). Effects of x-irradiation on parameters of tumor growth, histology, and ultrastructure. *Cancer* 24, 39-55.
- Foxall C., Watson S. R., Dowbenko D., Fennie C., Lasky L. A., Kiso M., Hasegawa A., Asa D., and Brandley B. K. (1992). The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *J. Cell Biol.* 117, 895-902.
- Fritz G., Brachetti C., and Kaina B. (2003). Lovastatin causes sensitization of HeLa cells to ionizing radiation-induced apoptosis by abrogation of G2 blockage. *Int. J. Radiat. Biol.* 79, 601-610.
- Fritz G. (2009). Targeting the mevalonate pathway for improved anticancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* 9, 626-638.
- Fu Y., Hsieh T. C., Guo J., Kunicki J., Lee M. Y., Darzynkiewicz Z., and Wu J. M. (2004). Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 263-270.
- Gallatin W. M., Weissman I. L., and Butcher E. C. (1983). A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 304, 30-34.
- Gaugler M. H., Squiban C., van der Meeren A., Bertho J. M., Vandamme A., and Mouthon M. A. (1997). Late and persistent upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.* 72, 201-209.
- Garcia-Ranea J. A., and Valencia A. (1998). Distribution and functional diversification of the ras superfamily in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 434, 219-225.
- Gao Y., Dickerson J. B., Guo F., Zheng J. and Zheng Y. (2004). Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *PNAS* 101, 7618-7626.
- Guo W., and Giancotti F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Biol.* 5, 816-826.
- Ghosh S., and Karin M. (2002). Missing pieces in the NF-kappa B puzzle. *Cell* 109, Suppl: S81-96.
- Gout S., Morin C., Houle F., and Hout J. (2006). Death receptor-3, a new E-Selectin counter-receptor that confers migration and survival advantages to colon carcinoma cells by triggering p38 and ERK MAPK activation. *Cancer Res.* 66, 9117-9127.
- Hall A. (1990). The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 249, 635-40.
- Hallahan D. E., Kuchibhotla J., and Clark E. (1995). The E-selectin promoter is a novel radiation-induced gene in endothelial cells. *Proceedings American Association for Cancer Research* 36, 605.
- Hallahan D. E., Kuchibhotla J., and Wyble C. (1996). Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium. *Cancer Res.* 56, 5150-5155.

-
- Hallahan D. E., Kuchibhotla J., and Wyble C. (1997). Sialyl Lewis X Mimetics attenuate E-Selectin-mediated Adhesion of Leukocytes to irradiated human endothelial cells. *Radiation Research* 147, 41-47.
- Hallahan D. E., and Virudachalam S. (1997). Ionizing radiation mediates expression of cell adhesion molecules in distinct histological patterns within the lung. *Cancer Res* 57, 2096-2099.
- Hallahan D. E., Virudachalam S., and Kuchibhotla S. (1998). Nuclear Factor kappa B dominant negative genetic constructs inhibit X-ray induction of cell adhesion molecules in the vascular endothelium. *Cancer Res.* 58, 5484-5488.
- Hanahan D., and Weinberg D. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Handa K., Nudelman E. D., Stroud M. R., Shiozawa T., and Hakomori L. (1991). Selectin GMP-140 (CD62; PADGEM) binds to sialosyl-Le(a) and sialosyl-Le(x), and sulfated glycans modulate this binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 1223-1230.
- Hanley W. D., Wirtz D., and Konstantopoulos K. (2004). Distinct kinetic and mechanical properties govern selectin-leukocyte interactions. *J. Cell Sci.* 117, 2503-2511.
- Hanley W. D., Burdick M. M., Konstantopoulos K., and Sackstein R. (2005). CD44 on LS174T colon carcinoma cells possesses E-Selectin ligand activity. *Cancer Res.* 65, 5812-5817.
- Hanley W. D., Napier S. L., Burdick M. M., Schnaar R. L., Sackstein R., and Konstantopoulos K. (2006). Variant isoforms of CD44 are P- and L-selectin ligands on colon carcinoma cells. *FASEB J.* 20, 337-339.
- Hidalgo A., Peired A. J., Wild M. K., Vestweber D., and Frenette P. S. (2007). Complete identification of E-Selectin Ligands on Neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* 26, 477-489.
- Huang W. C., Chan S. T., Yang T. L., Tzeng C. C., Chen C. C. (2004). Inhibition of ICAM-1 gene expression, monocyte adhesion and cancer cell invasion by targeting IKK complex: molecular and functional study of novel alpha-methylene-gamma-butyrolactone derivatives. *Carcinogenesis* 25, 1925-1934.
- Hubbard A. K., and Rothlein R. (2000). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1379-1386.
- Humphries M. J. (2000). Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 311-339.
- Hyang-Mi K., Choi Y. J., Choi J. S., Kang S. W., Bae J. Y., Kang I. J., Jun J. G., Lee S. S., Lim S. S., and Kang Y. H. (2007). Blockade of cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression by licorice isoliquiritigenin through NF-kappa B signal disruption. *Exp. Biol. Med.* 232, 235-245.
- Hynes R. O. (2003). Metastatic potential: generic predisposition of the primary tumor or rare, metastatic variants – or both? *Cell* 113, 821-823.
- Imaizumi N., Monnier Y., Hegi M., Mirimanoff R. O., and Rüegg C. (2010). Radiotherapy suppresses angiogenesis in mice through TGF-betaRI/ALK5-dependent inhibition of endothelial cell sprouting. *PloS One* 5, e11085.
- Ito H., Kubo A., Shigematsu N., and Hashimoto S. (1984). Skin metastases within the previous radiation field after prophylactic postoperative radiotherapy for breast cancer. *Clin. Exp. Metastasis* 2, 235-239.

- Jung J. W., Hwang S. Y., Hwang J. S., Oh E. S., Park S., and Han I. Q. (2007). Ionising radiation induces changes associated with epithelial-mesenchymal transdifferentiation and increased cell motility of A549 lung epithelial cells. *Eur. J. Cancer* 43, 1214-1224.
- Kahn F. M. (2003). *Physics of Radiation Therapy*, 3rd edition, Lippincott W and Wilkins.
- Kaliski A., Maggiorella L., Cengel K. A., Mathe D., Rouffiac V., Opolon P., Lassau N., Bourhis J., and Deutsch E. (2005). Angiogenesis and tumor growth inhibition by a matrix metalloproteinase inhibitor targeting radiation-induced invasion. *Mol. Cancer* 4, 1717-1728.
- Kang J. S., Yoon Y. D., Cho I. J., Han M. H., Lee C. W., Park S. K., and Kim H. M. (2005). Glabridin, an isoflavan from licorice root, inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and improves survival of mice in experimental model of septic shock. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312, 1187-1194.
- Kaplan H. S., and Murphy E. D. (1949). The effect of local roentgen irradiation on the biological behavior of a transplantable mouse carcinoma; increased frequency of pulmonary metastasis. *J. Natl. Cancer Ins.* 9, 407-413.
- Katayama Y., Hidalgo A., Chang J., Peired A., and Frenette P. S. (2005). CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *J. Exp. Med.* 201, 1183-1189.
- Kemler R. (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* 9, 317-321.
- Kikkawa H., Kaihou M., Horaguchi N., Uchida T., Imafuku H., Takiguchi A., Yamazaki Y., Kioke C., Kuruto R., Kakiuchi T., Tsukada H., Takada Y., Matsuura N., and Oku N. (2002). Role of integrin alpha (v) beta3 in the early phase of liver metastasis: PET and IVM analyses. *Clin. Exp. Metastasis* 19, 717-725.
- Kim J. W., Wong C. W., Goldsmith J. D., Song C., Fu W., Allion M. B., Herlyn M., Al-Mehdi A. B., and Muschel R. (2004). Rapid apoptosis in the pulmonary vasculature distinguishes non-metastatic from metastatic melanoma cells. *Cancer Lett.* 213, 203-212.
- Kjoller L., and Hall A. (1999). Signaling to Rho-GTPases. *Exp. Cell Res.* 253, 166-179.
- Kuijpers T. W., Raleigh M., Kavanagh T., Janssen H., Calafat J., Roos D., and Harlan J. C. (1994). Cytokine-activated endothelial cells internalize E-selectin into a lysosomal compartment of vesiculotubular shape. A tubulin-driven process. *J. Immunol.* 152, 5060-5069.
- Kobayashi H., Boelte K. C., and Lin P. C. (2007). Endothelial cell adhesion molecules and cancer progression. *Curr. Med. Chem.* 14, 377-386.
- Koretz K., Schlag P., Boumsell L., and Möller P. (1991). Expression of VLA-alpha 2, VLA-alpha 6, and VLA-beta 1 chains in normal mucosa and adenomas of the colon, and in colon carcinomas and their liver metastases. *Am. J. Pathol.* 138, 741-750.
- Kotovuori P., Tontti E., Pigott R., Shepherd M., Kiso M., Hasegawa A., Renkonen R., Nortamo P., Altieri D. C., and Gahmberg C. G. (1993). The vascular E-selectin binds to the leukocyte integrins CD11/CD18. *Glycobiology* 3, 131-136.
- Kusama T., Mukai M., Tatsuta M., Matsumoto Y., Nakamura H., and Inoue M. (2003). Selective inhibition of cancer cell invasion by a geranylgeranyltransferase-I inhibitor. *Clin. Exp. Metastasis* 20, 561-7.
- Krause T., and Turner G. A. (1999). Are selectins involved in metastasis? *Clin. Exp. Metastasis* 17, 183-192.

-
- Kunkel E. J., and Ley K. (1994). Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling *in vivo*. *Circ. Res.* 79, 1196–1204.
- Lazar T., Gotte M., and Gallwitz D. (1997). Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell? *Trends Biochem. Sci.* 22, 468-72.
- Ledebur H. C., and Parks T. P. (1995). Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. *J. Biol. Chem.* 270, 933-943.
- Lee M., Lee H. J., Seo W. D., Park K. H., and Lee Y. S. (2010). Sialylation of integrin beta1 is involved in radiation-induced adhesion and migration in human colon cancer cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 76, 1528-1536.
- Ley K. (2003). The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol. Med.* 9, 263–268.
- Li N., and Karin M. (1998). Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappa B through two distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13012-13017.
- Liotta L. A., Kleinerman J., and Seidel G. M. (1974). Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res.* 34, 997-1004.
- Liotta L. A. (1992). Cancer cell invasion and metastasis. *Sci. AM* 266, 54-59.
- Liu K., Kasper M., Bierhaus A., Langer S., Peterson I., Muller M., and Trott K. R. (1997). Differential expression of CD44s and CD44v10 proteins and syndecan in normal and irradiated mouse epidermis. *Histochem. Cell Biol.* 107, 159–167.
- Lukashev M. E., and Werb Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* 8, 437-441.
- Madani I., and De Neve W. (2008). Does ionizing radiation stimulate cancer invasion and metastasis? *Bull. Cancer* 95, 292-300.
- May M. J., and Gosh S. (1997). Rel/NF-kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol.* 8, 63-73.
- Matsuura N., Narita T., Hiraiwa N., Hiraiwa M., Murai H., Iwase T., Funahashi H., Imai T., Takagi H., and Kannagi R. (1998). Gene expression of fucosyl- and sialyl-transferases which synthesize sialyl Lewis x, the carbohydrate ligands for E-selectin, in human breast cancer. *Int. J. Oncol.* 12, 1157-1164.
- Merino O. R., Lindberg R. D., and Fletcher R. H. (1977). An analysis of distant metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 40, 145-151.
- Metha J. L. (2003). Pleiotropic effects of statins: how important are they in the prevention of vascular disease? *Endothelium* 10, 3-4.
- Milburn M. V., Liang T., DeVos A., Brünger A., Yamaizumi Z., Nishimura S., and Kim S. (1990). Molecular Switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 939-945.
- Miller A. C., Kariko K., Myers C. E., Clark E. P., and Samid D. (1993). Increased radioresistance of EJ ras-transformed human osteosarcoma cells and its modulation by lovastatin, an inhibitor of p21 ras isoprenylation. *Int. J. Cancer* 53, 302-307.

- Monceau V., Pasinetti N., Schupp C., Pouzoulet F., Opolon P., and Vozenin M. C. (2010). Modulation of the Rho/ROCK Pathway in Heart and Lung after Thorax Irradiation reveals to improve normal tissue toxicity. *Curr. Drug targets* 11, 1395-1404.
- Moore K. L., Stults N. L., Diaz S., Smith D. F., Cummings R. D., Varki A., and McEver R. D. (1992). Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J. Cell Biol.* 118, 445-456.
- Nakayama T., Yamazumi K., Uemura T., Yoshiaki A., and Yakata Y. (2007). X-radiation up-regulates the occurrence and the multiplicity of invasive carcinomas in the intestinal tract of Apc(min/+) mice. *Radiat. Res.* 168, 433-439.
- Nuebel T., Dippold W., Kleinert H., Kaina B., and Fritz G. (2004). Lovastatin inhibits Rho-regulated expression of E-selectin by TNFalpha and attenuates tumor cell adhesion. *FASEB J.* 18, 140-142.
- Nuebel T., Dippold W., Kaina B., and Fritz G. (2006). Ionizing radiation-induced E-selectin gene expression and tumor cell adhesion is inhibited by lovastatin and all-trans retinoic acid. *Carcinogenesis* 25, 1335-1344.
- Ohno M., Nakata H., and Matsuura K. (1980). Enhancement of metastatic pulmonary malignant lymphoma following lung irradiation. *Nihon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 40, 1183-1188.
- Ostrau C., Huelsenbeck J., Herzog M., Schad A., Torzewski M., Lackner K. J., and Fritz G. (2009). Lovastatin attenuates ionizing radiation-induced normal tissue damage *in vivo*. *Radiother. Oncol.* 92, 492-499.
- Pantel K., and Brakenhoff R. H. (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews Cancer* 4, 448-456.
- Parise L. V., and Phillips D. R. (1986). Fibronectin-binding properties of the purified platelet glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.* 261, 14011-14017.
- Park C. M., Park M. J., Kwak H. J., Lee H. C., Kim M. S., Lee S. H., Park I. C., Rhee C. H., and Hong S. I. (2006). Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *Cancer Res.* 66, 8511-8519.
- Paquette B., Baptiste C., Therriault H., Arquin G., Plouffe B., and Lemay R. (2007). *In vitro* irradiation of basement membrane enhances the invasiveness of breast cancer cells. *Br. J. Cancer* 97, 1505-1512.
- Peinado H., Portillo F., and Cano A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 365-375.
- Pignatelli M., and Bodmer W. F. (1990). Integrin cell adhesion molecules and colorectal cancer. *J. Pathol.* 162, 95-97.
- Pignatelli M., Ansari T. W., Gunter P., Liu D., Hirano S., Takeichi M., Klöppel G., and Lemoine N. R. (1994). Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer: correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage. *J. Pathol.* 174, 243-248.
- Podogorsak E. B. (2005). *Special Procedures and Techniques in Radiotherapy*. Int. Atomic Energy Agency.
- Pötter D., and Georg D. (2010). *Die Onkologie*, 2. Auflage Teil 1, 22, 437-468. Springer Medizin Verlag Heidelberg.

- Quast U., and Hoederath A. (1996). Ganzkörperbestrahlung in: Strahlentherapie – Radiologische Onkologie, Springer Verlag Heidelberg.
- Rao B. N., Anderson M. B., Musser J. H., Gilbert J. H., Schaefer M. E., Foxall C., and Brandley B. K. (1994). Sialyl Lewis X mimics derived from a pharmacophore search are selectin inhibitors with anti-inflammatory activity. *J. Biol. Chem.* 269, 19663-19666.
- Recamier J. C. A. (1829). Recherches sur le traitement du cancer.
- Rice G. E., and Bevilacqua M. P. (1989). An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* 246, 1303-1306.
- Ruoslathi E. (1991). Integrins. *J. Clin. Invest.* 87, 1-5.
- Sahai E., and Marshall C. J. (2002). ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat. Cell Biol.* 4, 408-415.
- Saitoh O., Wang W. C., Lotan R., Fukuda M. (1992). Differential glycosylation and cell surface expression of lysosomal membrane glycoproteins in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. *J. Biol. Chem.* 267, 5700-5711.
- Sawada R., Lowe J. B., and Fukuda M. (1993). E-selectin-dependent adhesion efficiency of colonic carcinoma cells is increased by genetic manipulation of their cell surface lysosomal membrane glycoprotein-1 expression levels. *J. Biol. Chem.* 268, 12575-12681.
- Schindler U., and Baichwal V. R. (1994). Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol. Cell Biol.* 14, 5820-5831.
- Sebti S. M., Tkalcovic G. T., and Jani J. P. (1991). Lovastatin, a cholesterol biosynthesis inhibitor, inhibits the growth of human H-ras oncogene transformed cells in nude mice. *Cancer Commun.* 3, 141-147.
- Seftor R. E., Seftor E. A., and Hendrix M. J. (1999). Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion. *Cancer Metastasis Review* 18, 359-375.
- Sen R., and Baltimore D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928.
- Sethi G., Sung B, and Aggarwal B. (2008). Nuclear Factor- κ B Activation: From Bench to bedside. *Exp. Biol. Med.* 1, 21-31.
- Simon S. I., Hu Y., Vestweber D., and Smith C. W. (2000). Neutrophil tethering on E-selectin activates beta 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Immunol.* 164, 4348-4358.
- Somjen D., Katzburg S., Vaya J., Kaye A. M., Hendel D., Posner G. H., and Tamir S. (2004). Estrogenic activity of glabridin and glabrene from licorice roots on human osteoblasts and prepubertal rat skeletal tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 91, 241-246.
- Sofia Vala I., Martins L. R., Imaizumi N., Nunes R. J., Rino J., Kuonen F., Carvalho L. M., Rüegg C., Grillo I. M., Barata J. T., Mareel M., and Santos S. C. (2010). Low doses of ionizing radiation promote tumor growth and metastasis by enhancing angiogenesis. *PLoS One* 5, e11222.
- Springer T. A. (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 827-872.

- Stancovski I., and Baltimore D. (1997). NF-kappa B activation: the I kappa B kinase revealed? *Cell* **91**, 299-302.
- Stoolman L. M., and Rosen S. D. (1983). Possible role for cell-surface carbohydrate-binding molecules in lymphocyte recirculation. *J. Cell Biol.* **96**, 722-729.
- Subramaniam M., Koedam J. A., and Wagner D. D. (1993). Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. *Mol. Cell Biol.* **4**, 791-801.
- Sun S. C., Ganchi P. A., Beraud C., Ballard D. W., and Greene W. C. (1994). Autoregulation of the NF-kappa B transactivator RelA (p65) by multiple cytoplasmic inhibitors containing ankyrin motifs. *PNAS* **4**, 1346-1350.
- Suzuki S. T. (1996). Structural and functional diversity of cadherin superfamily: are new members of cadherin superfamily involved in signal transduction pathway? *J. Cell Biochem.* **61**, 531-542.
- Taccioli Guillermo E., Amatucci A. G., Beamish H. J., Gell D., Xiang X. H., Torres Arzayus M. I., Priestley A., Jackson S. P., Marshak Rothstein A., Jeggo P. A., and Herrera V. L. (1998). Targeted disruption of the catalytic subunit of the DNA-PK gene in mice confers severe combined immunodeficiency and radiosensitivity. *Immunity* **9**, 355-366.
- Talmadge J., and Fidler I. J. (2010). AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis. A Historical Perspective. *Cancer Res.* **70**, 5649-5669.
- Takada A., Ohmori K., Takahashi N., Tsuyuoka K., Yago A., Zenita K., Hasegawa A., and Kannagi R. (1991). Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis X. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 713-719.
- Takai Y., Kaibuchi A., Kikuchi A., Sasaki T., and Shirataki H. (1993). Regulators of small GTPases. *Ciba Found Symp.* **176**, 128-138.
- Takai Y., Sasaki T., and Matozaki Z. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* **81**, 153-208.
- Takeichi M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **251**, 1451-1455.
- Tedder T. F., Steeber D. A., Chen A., and Engel P. (1995). The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* **9**, 866-873.
- Thanos D., and Maniatis T. (1995). NF- κ B: A lesion in family values. *Cell* **80**, 529-532.
- Tomlinson J., Wang J. L., Barsky S. H., Lee M. C., Bischoff J., and Nguyen J. (2000). Human colon cancer cells express multiple glycoprotein ligands for E-selectin. *Int. J. Oncology* **16**, 347-353.
- Trousseau A. (1865). *The New Sydenham Society* **3**, 654-656.
- Van Dyk J. (1999). *The Modern Technology of Radiation Oncology*. Madison WI, Medical Physics Publishing.
- Varki A. (1994). Selectin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7390-7397.
- Varner J. A., and Cheresch D. A. (1996). Integrins and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 724-730.

- Varner J. A., and Cheresch D. A. (1996). Tumor angiogenesis and the role of vascular cell integrin alpha (v) beta3. *Important Adv. Oncol. Review* 69-87.
- Vestweber D. and Blanks J. E. (1999). Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol. Rev.* 79,181–213.
- Wang T., Zhang X., and Li J. J. (2002). The role of NF-kappa B in the regulation of cell stress responses. *Int. Immunopharmacol.* 2, 1509-1520.
- Wang J., and Boerma M. (2007). Simvastatin ameliorates radiation enteropathy development after localized, fractionated irradiation by a protein C-independent mechanism. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 68, 1483-1490.
- Welply J. K., Abbas S. Z., Scudder C., Keene J. L., Broschat C., Casnocha S., Gorka S., Steininger C., Howard S. C., and Schmucke J. J. (1994). Multivalent sialyl Lewis X: potent inhibitors of E-Selectin-mediated cell adhesion; reagent for staining activated endothelial cells. *Glycobiology* 4, 259-265.
- Wennerberg K., and Der C. J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J. Cell Sci.* 117, 1301-1312.
- Wheeler A. P., and Ridley A. J. (2004). Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp. Cell Res.* 301, 43-49.
- Whitley M. Z., Thanos D., Read M. A., Maniatis T., and Collins T. (1994). A striking similarity in the organization of the E-selectin and beta interferon gene promoters. *Mol. Cell Biol.* 14, 6464-6475.
- Wittig B. M., and Kaulen H. (1995). Expression and regulation of the adhesion molecule E-selectin and the ligand Sialyl Lewis X in gastrointestinal carcinoma. *Gastroenterology Suppl.* 108 p.
- Wong C. W., Lee A., Shientag L., Yu L., Dong Y., Kao G., Al-Medhi A. B., Bernhard E. J., and Muschel R. J. (2001). Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res.* 61, 333-338.
- Yamada N., Chung Y. S., Takaskuka S., Arimoto Y., Sawada T., Dohi T., and Sowa M. (1997). Increased Sialyl Lewis A expression and fucosyltransferase activity with aquisition of a high metastatic capacity in a colon cancer cell line. *British J. Cancer* 76, 582-587.
- Yao L., Setiadi H., Xia L., Laszik Z., Taylor F. B., and Mc Ever R. P. (1999). Divergent inducible expression of P-selectin and E-selectin in mice and primates. *Blood* 94, 3820-3828.
- Yednock T. A., Stoolman S. M., and Rosen S. M. (1987). Phosphomannosyl-derivatized beads detect a receptor involved in lymphocyte homing. *Cell Biol.* 104, 713-714.
- Zhao W., and Robbins M. E. (2009). Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implication. *Current Med. Chem.* 16, 130-143.

Veröffentlichungen

Publikationen

“Rac1-regulated endothelial radiation response stimulates extravasation and metastasis that can be blocked by HMG-CoA reductase inhibitors.”

Hamalukić M., Huelsenbeck J., Schad A., Wirtz S., Kaina B., and Fritz G., PloS One 6, e26413, 2011.

“Lovastatin attenuates ionizing radiation-induced normal tissue damage *in vivo*.”

Ostrau C., Huelsenbeck J., **Herzog M.**, Schad A., Torzewski M., Lackner K. J., Fritz G.; Radiother. Oncol. 2009 Sep 92(3), 492-9, 2009.

Tagungsbeiträge

“Effect of ionizing radiation (IR) on tumor cell adhesion *in vitro* and metastasis *in vivo*.”

Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz, 2009.

„Lovastatin as inhibitor of ionizing radiation (IR) – induced adhesion of tumor cells to the endothelium *in vitro* and tumor cell extravasation *in vivo*?“

Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS), Tübingen, 2008.

„Effect of the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin on radiation-induced tumor cell-endothelial cell interactions.“

Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz, 2008.

Poster

“Ionizing radiation-induced normal tissue damage is attenuated by the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin.”

Henninger C., Huelsenbeck J., **Hamalukić M.**, and Fritz G. Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS), Essen, 2009.

„Pleiotropic effects of the lipid-lowering drug lovastatin on ionizing radiation (IR) induced pro-inflammatory and pro-metastatic processes *in vitro* and *in vivo*.“

Herzog M., Ostrau C., Huelsenbeck J., and Fritz G. Wolfsberg Meeting Series, Wolfsberg, Schweiz, 2009.

„Auswirkungen ionisierender Strahlung (IR) und TNF α auf die Adhäsion von humanen Kolonkarzinomzellen an Endothelien.“

Herzog M., Nuebel T., Kaina B., und Fritz G. Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS), Mainz, 2007.

“The complexity of the simple two-component signaling system KdpD/KdpE of *Escherichia coli*.“

Heermann R., Weber A., Lippert M. L., Mayer B., **Herzog M.**, Holpert S., Burdack K., and Jung K. Second FEMS Congress of European Microbiologists, Madrid, 2006.

“Regulation of K⁺-homeostasis in *Escherichia coli*.“

Heermann R., **Herzog M.**, Lippert M. L., Weber A., Mayer B., Burdack K., Holpert S., and Jung K. Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Jena, 2006.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Die vorgelegte Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Dreieich-Sprendlingen, ___ Februar 2013

Melanie Herzog

