

**Durch Nikotin verursachte Änderungen der Genexpression
in Brustkrebszelllinien:
Einfluss von Flotillinen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Kötting, Natalie
aus Kirchen

Gießen 2019

Aus dem Biochemischen Institut,
unter der Leitung von Prof. Dr. Lienhard Schmitz,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Ritva Tikkanen
2. Gutachter: Prof. Dr. Katrin Susanne Lips

Tag der Disputation: 05.02.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Familie der Lipid-Raft assoziierten Flotillin-Proteine	1
1.1.1	Vorkommen.....	1
1.1.2	Struktur.....	2
1.1.3	Funktion	2
1.1.3.1	Die Rolle der Flotilline in der Karzinogenese.....	3
1.2	Der programmierte Zelltod: Apoptose	4
1.2.1	Der extrinsische Apoptoseweg.....	5
1.2.2	Der intrinsische Apoptoseweg	6
1.3	Muskarinische und nikotinische Acetylcholinrezeptoren	7
1.4	Die Rolle von Nikotin in der Tumorgenese	9
1.5	Ziele der Studie	10
2	Material	11
2.1	Materialien und Geräte.....	11
2.2	Chemikalien und Reagenzien.....	12
2.3	Puffer und Lösungen	14
2.4	Synthetische Primer.....	15
2.5	Antikörper	15
2.5.1	Primärantikörper.....	16
2.5.2	Sekundärantikörper	16
2.6	Humane Zelllinien.....	16
2.7	Software und Bildbearbeitung.....	17
3	Methoden	18
3.1	Zellbiologische Standardmethoden	18

3.1.1	Kultivierung humaner Zelllinien.....	18
3.1.2	Stimulation humaner Zelllinien.....	18
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	19
3.2.1	RNA Isolierung	19
3.2.2	Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometrie	19
3.2.3	Reverse Transkription	20
3.2.4	Quantitative Real-Time-PCR	20
3.3	Biochemische Methoden	21
3.3.1	Herstellung von Proteinlysaten aus MCF-7 und MCF10A Zellen.....	21
3.3.2	SDS-PAGE und Western Blot.....	21
3.3.3	MTT-Test	22
4	Ergebnisse.....	23
4.1	Nikotinstimulation der MCF-7 Wildtypzellen: qPCR Ergebnisse.....	23
4.2	MCF-7: STS Zeitreihe.....	27
4.2.1	Fotodokumentation.....	27
4.2.2	Western Blot Ergebnisse der STS Zeitreihe.....	29
4.3	MCF-7 Knockdown-Zellen	30
4.4	MTT Test.....	32
4.5	MCF 10A: STS Zeitreihe	35
4.5.1	Fotodokumentation.....	35
4.5.2	Western Blot Ergebnisse der STS Zeitreihe	37
4.6	MCF10A: Knockdown-Zellen	37
5	Diskussion.....	40
5.1	Nikotin verursachte Änderungen der Genexpression in Brustkrebszellen.....	41
5.2	Einfluss von Flotillinen auf die Überlebensrate von Brustkrebszellen	42
5.3	Ausblick	43
6	Zusammenfassung.....	44

7	Summary	45
8	Abkürzungsverzeichnis	46
9	Abbildungsverzeichnis	48
10	Tabellenverzeichnis	49
11	Literaturverzeichnis	50
12	Ehrenwörtliche Erklärung	62
13	Danksagung	63

1 Einleitung

1.1 Die Familie der Lipid-Raft assoziierten Flotillin-Proteine

Flotilline sind hoch-konservierte, ubiquitär exprimierte Proteine, welche mit speziellen Mikrodomänen der Zellmembran, sogenannten Lipid Rafts, assoziiert sind. Diese beschreiben geordnete, dynamisch fluktuierende Nanostrukturen, die zu einem großen Teil aus Cholesterol und Glycosphingolipiden bestehen^{1,2}. Zur Familie der Flotilline gehören die homologen Proteine Flotillin-1 und Flotillin-2, welche ihre Bezeichnung aufgrund ihrer Eigenschaft erhielten, in unlöslichen Membranpräparationen muriner Lungenzellen zu flotieren³. Ursprünglich wurden Flotilline jedoch während der Regeneration neuronaler Zellen nach Sehnervläsion des Goldfisches entdeckt, wodurch sie zusätzlich als „Reggies“ bezeichnet werden⁴. Dabei entspricht Reggie-1 allerdings Flotillin-2, während Reggie-2 mit Flotillin-1 identisch ist.

1.1.1 Vorkommen

Flotilline weisen eine ubiquitäre Verbreitung auf. Sie werden nicht nur in allen Säugtieren exprimiert, sondern konnten auch in Pflanzen, Bakterien und Pilzen nachgewiesen werden⁵. Obwohl Flotillin-1 und Flotillin-2 von unterschiedlichen Genen kodiert werden, zeichnen sie sich durch eine hohe Sequenzhomologie auf mRNA Level (50%) und Proteinebene (44%) aus^{6,7}. Daneben konnte auch eine hohe Ähnlichkeit zwischen den Spezies festgestellt werden. So teilen humanes und murines Flotillin-1 beispielsweise eine zu über 98% identische Aminosäuresequenz⁵. Auch Vertebraten und Invertebraten weisen eine Similarität von über 60% auf^{7,8}. Flotilline zeigen zudem eine ubiquitäre Gewebeverteilung und konnten nahezu in allen Zelltypen nachgewiesen werden. Dabei werden sie verstärkt in Gehirn, Herz, Lunge und Plazenta exprimiert, weniger in Pankreas und Leber^{5,9}. Es ist jedoch zu beachten, dass die Flotillin-Expression der Transkriptionsregulation unterliegt und durch verschiedene Transkriptionsfaktoren beeinflusst und abgestimmt werden kann¹⁰. Obwohl Flotilline in den meisten Zelltypen hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert sind, weisen sie eine dynamische subzelluläre Verteilung auf, die von Zelldifferenzierung und Zelltyp abhängt¹¹. Somit konnten Flotilline auch in intrazellulären (Golgi-Apparat¹², Zellkern¹³) und vesikulären Strukturen (Lysosomen¹⁴, Endosomen¹⁴ und Exosomen¹⁵) nachgewiesen werden.

1.1.2 Struktur

Flotilline gehören zur SPFH Proteinfamilie, das heißt sie enthalten eine N-terminale Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflK/C Domäne^{16,17}, welche auch als Prohibitin Homologie-Domäne (PHB) bezeichnet wird. Diese wurde erstmals in Stomatin nachgewiesen und ist in diversen pro- und eukaryotischen Membranproteinen wiederzufinden^{7,18}. Daneben weisen Flotilline in dieser Region Myristylierungen und Palmitoylierungen^{19,20} auf. Diese Lipidmodifikationen ermöglichen deren Membranassoziation und Integration in Lipid Rafts^{11,19}. Charakteristisch für die C-terminale Region ist die Flotillin-Domäne, bestehend aus Alanin- und Glutamat Wiederholungssequenzen, welche verantwortlich für die Ausbildung von Homo- und Heterooligomeren ist²¹. In siRNA (small interfering RNA) Experimenten konnte nach Depletion von Flotillin-1 oder -2 eine verminderte Expression des jeweils anderen Flotillins festgestellt werden²¹, welches für eine gegenseitige Stabilisierung der Flotilline spricht. Flotillin-1 scheint dabei jedoch stärker von der Anwesenheit des Flotillin-2 abhängig zu sein als umgekehrt, da eine Depletion von Flotillin-1 eine unmerkliche Reduktion von Flotillin-2 hervorruft, während Flotillin-2 depletierte Zellen eine verstärkte Reduktion von Flotillin-1 aufweisen²⁰⁻²².

1.1.3 Funktion

Flotilline werden mit einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie der Zell-Adhäsion und Zellmigration, der T-Zell Aktivierung, dem axonalen Wachstum und der Regulation von Membrantransportprozessen wie Endo-, Exozytose und Phagozytose assoziiert^{20,22-25}. Darüber hinaus sind Flotilline an verschiedenen Wachstumsfaktor-Signalwegen wie zum Beispiel der FGFR- (Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor), IGFR- (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Rezeptor) und EGFR- (Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor) Signaltransduktion beteiligt^{22,26,27}. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass nach EGF-Stimulierung eine Größenzunahme der Flotillin-Oligomere erfolgt und eine durch Src-Kinasen vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung der Flotilline stattfindet, wodurch diese von der Plasmamembran in späte Endosomen endozytiert werden^{22,24,28}. Darüber hinaus fungiert Flotillin-1 als Gerüstprotein im klassischen MAP-Kinase-Signalweg, indem es direkt mit verschiedenen Kinasen wie c-Raf, MEK1/2 und ERK1/2 interagiert²². Die Abwesenheit von Flotillin-1 resultiert daher in einer Abschwächung der MAPK Signalkaskade, während Flotillin-2 vermutlich als negativer Regulator der MAPK Signaltransduktion wirkt und gegensätzliche Effekte erzielt. So konnte in Flotillin-2 depletierten Zellen eine zunehmende Aktivität des

ERK1/2 Signalweges sowie eine erhöhte Proliferationsrate festgestellt werden²⁹. Daneben können Flotilline auch mit dem Zell-Überleben und der Apoptose in Verbindung gebracht werden, da nach Abwesenheit von Flotillin-2 eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors Egr1 zu verzeichnen ist, welches wiederum zu einer erhöhten Aktivität des Tumorsuppressorgens p53 führt²⁹. Weiterhin gibt es Erkenntnisse, dass Flotilline eine Rolle in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson spielen^{30,31}. In Diabetes Typ 2 Skelettmuskelzellen konnte außerdem eine erhöhte Flotillin-Expression festgestellt werden, welches wiederum mit einer abgeschwächten Reaktion von Insulin Rezeptoren auf Signalmoleküle in der Insulin Signalkaskade assoziiert werden könnte³².

1.1.3.1 Die Rolle der Flotilline in der Karzinogenese

Diverse Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen Flotillinen und verschiedenen humanen Krebsarten und unterstreichen deren Rolle in der Zellproliferation und Karzinogenese. Hinsichtlich dieser Erkenntnisse wurden Flotilline bereits als mögliches Angriffsziel in der Krebstherapie diskutiert. In humanen Krebszellen wie Kopf-, Nacken- und Magenkrebs, Hepatozellulären Karzinomen, Lungen-Adenokarzinomen und Melanomen konnte beispielsweise eine erhöhte Flotillin-Expression beobachtet werden³³⁻³⁶. Eine Überexpression von Flotillinen konnte zudem mit einer kürzeren Überlebensrate und einer schlechteren Prognose der Patienten assoziiert werden^{33,35,37}. Mehrere Studien zeigen weiterhin einen Zusammenhang zwischen Flotillinen und der Metastasierung von Zellen. In nicht-malignen SB2 Melanomzellen konnte durch Überexpression von Flotillin-2 eine verstärkte Zellproliferation und Metastasenbildung induziert werden³⁶. Diese Zellen zeigten auch eine erhöhte Expression des zu den GPCRs (G-Protein gekoppelte Rezeptoren) gehörenden PAR-1 (Protease-aktivierter Rezeptor-1), welcher häufig mit der Progression von Melanomen assoziiert wird³⁶. Darüber hinaus konnte in einem Brustkrebs-Modell der Maus eine signifikante Reduktion von Lungen-Metastasen nach Flotillin-2 Depletion beobachtet werden³⁸. Weitere Brustkrebs-Studien können einen funktionellen Zusammenhang zwischen der Tumorgenese und Flotillinen belegen. Dabei scheint es von Bedeutung, dass das Gen für Flotillin-2, welches auf dem menschlichen Chromosom 17q11.2 lokalisiert ist, üblicherweise in Brustkrebszellen amplifiziert wird³⁸. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Expressionslevel von Flotillin-1 direkt mit dem Stadium der klinischen TNM Klassifikation und dem Überle-

ben des Patienten korreliert³⁹. Dagegen konnte *in vitro und in vivo* durch Depletion von Flotillin-2 die Proliferation sowie die Tumorigenität von Brustkrebszellen inhibiert werden³⁹. Neuere Studien konnten weiterhin zeigen, dass das *in vitro* Tumorwachstum im Softagar durch Flotillin-Knockdown verlangsamt ist. Eine Überexpression von Flotillinen führte hingegen zu einer Größenzunahme der Kolonien⁴⁰. Frühe Studien belegen zudem, dass Flotillin-2 bei Überexpression von ErbB2 hochreguliert wird⁴¹. ErbB2, welches auch bekannt ist als humaner Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 (Her2), ist eine Rezeptor-Tyrosin Kinase und gehört zur Familie der Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR/ErbB Familie)^{42,43}. In MCF-7 Brustkrebszellen konnte wiederum nach Flotillin-1 Depletion eine Hochregulierung von EGFR und verstärkte Aktivierung der MAPK Signalwege beobachtet werden, während die ErbB2 und ErbB3 Expression nicht beeinflusst wurde⁴⁴. In der gleichen Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass die EGFR Hochregulierung von der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Aktivität (PI3K/Akt) abhängig ist, welche selbst eine entscheidende Rolle in der Zellregulation übernimmt und in Tumoren häufig eine Mutation aufweist⁴⁴⁻⁴⁸. Die PI3K Inhibierung resultierte dagegen in einer reduzierten EGFR Expression⁴⁴. Bevor Flotilline also Anwendung in der Krebstherapie finden, sollten gegensätzliche Effekte wie die Aktivierung bestimmter Wachstumsfaktor-Signalwege und Deregulierung von Zellen nach Abwesenheit von Flotillinen berücksichtigt werden.

1.2 Der programmierte Zelltod: Apoptose

Der Begriff Apoptose wurde erstmals durch *Kerr et al.* im Jahr 1972 eingeführt, um eine morphologische Form des programmierten Zelltods zu beschreiben⁴⁹. Die Apoptose ist ein natürlicher Mechanismus, welcher essentiell für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und die Entwicklung multizellulärer Organismen ist und sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen induziert werden kann⁵⁰. Da die Apoptose in diverse regulatorische Prozesse wie die Differenzierung, Proliferation und Eliminierung defekter Zellen involviert ist, wird deren Dysregulation mit verschiedenen Erkrankungen wie viralen Infektionen, Autoimmunerkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen und Krebs assoziiert⁵¹. Zusätzlich lässt sich die Apoptose von Zellen als Antwort auf verschiedene Chemotherapeutika beobachten. Im Verlauf der Apoptose sind verschiedene morphologische Veränderungen zu verzeichnen. Charakteristisch für die frühe Phase der Apoptose ist die Schrumpfung der Zellen. Zellorga-

nellen und Zytoplasma sind dicht gepackt, und es lässt sich eine Karyopyknose als Folge der Chromatin Kondensation erkennen^{49,50}. Im weiteren Verlauf sind die Fragmentierung des Zellkerns (Karyorrhesis) und die Ausbildung homogener Apoptosekörperchen zu beobachten. Dabei bleibt die Integrität der Plasmamembran erhalten. Die Apoptosekörperchen werden abschließend durch Makrophagen, Parenchymzellen oder neoplastische Zellen phagozytiert^{49,50}. In Kontrast zur Apoptose lässt sich die Nekrose als alternative Form des Zelltods abgrenzen. Diese beschreibt einen Energie-unabhängigen, passiven Prozess, der im Gegensatz zur Apoptose ein großes Areal von Zellen betrifft und durch direkte Schädigung der Zellmembran oder beeinträchtigte Energiezufuhr der Zelle (Nährstoff- und Sauerstoffmangel) ausgelöst wird⁵⁰. Die Nekrose ist charakterisiert durch eine Volumenzunahme der Zelle und Vergrößerung von Zellkern und Zellorganellen. Die Integrität der Plasmamembran geht verloren, wodurch Zellorganellen und Zytoplasma in den Extrazellularraum freigesetzt werden und eine lokale Entzündungsreaktion auslösen^{49,52,53}. Die Apoptose umfasst hingegen einen komplexen Ablauf Energie-abhängiger, molekularer Ereignisse und wird durch zwei Hauptsignalwege kontrolliert, den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg.

1.2.1 Der extrinsische Apoptoseweg

Der extrinsische Weg wird durch Ligandenbindung an sogenannte Todesrezeptoren induziert, welche zur TNF-Rezeptorfamilie (Tumor-Nekrose-Faktor) gehören⁵⁴. Diese zeichnen sich durch eine Cystein-reiche extrazelluläre Domäne und eine zytoplasmatische Todesdomäne (DD)⁵⁵ aus, die an der Signalübertragung von der Zelloberfläche ins Zellinnere beteiligt ist. Zu den bekanntesten Todesrezeptoren gehören TNFR1 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1, Todesrezeptor 1), Fas (CD95, Todesrezeptor 2), TRAILR1 (Tumornekrosefaktor-verwandter-Apoptose-induzierender Ligand, Todesrezeptor 4), TRAILR2 (Todesrezeptor 5) und DR6 (Todesrezeptor 6)⁵⁶. Durch Bindung von Liganden werden zytoplasmatische Adapterproteine aktiviert, welche mit ihren korrespondierenden Todesdomänen an die entsprechenden Rezeptoren binden. Die Bindung des Liganden Fas an den Fas-Rezeptor führt zur Bindung des Adapterproteins FADD (Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne), während die Bindung des TNF-Liganden an den TNF-Rezeptor die Bindung des Adapterproteins TRADD (TNF-Rezeptor-assoziiertes Protein) ermöglicht. Dadurch werden FADD und RIP (Rezeptor interagierendes Protein) rekrutiert. FADD ist weiterhin in der Lage, über seine Todeseffektordomäne (DED) via Dimerisation an die Procaspase-8 zu binden^{50,57}. Durch Ausbildung dieses

Komplexes (death inducing signaling complex, DISC) wird die Procaspase-8 folglich autokatalytisch aktiviert⁵⁸. Die aktive Caspase-8 leitet ihrerseits die weitere Signalkaskade der Apoptose über die Caspase-Kaskade ein.

1.2.2 *Der intrinsische Apoptoseweg*

Der intrinsische Weg wird durch eine Reihe nicht-Rezeptor-vermittelter Stimuli ausgelöst, welche durch intrazelluläre Signale auf die Zelle wirken und wird hauptsächlich mitochondrial initiiert⁵⁰. Negative Signale wie beispielsweise Hypoxie, Hyperthermie, virale Infektionen, freie Radikale oder die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen verursachen Änderungen der mitochondrialen Membran⁵⁰. Dabei ist zunächst eine veränderte Membranpermeabilität zu beobachten, wodurch das Transmembranpotential verloren geht und zu einer Freisetzung proapoptotischer Proteine aus dem Intermembranraum ins Zytosol führt. Zu der ersten Gruppe von Proteinen, die ins Zytosol freigesetzt werden, zählen Cytochrom C, Smac (Second mitochondria-derived activator of caspase) /DIABLO (Direct inhibitor of apoptosis protein (IAP)-binding protein with low PI) und die Serinprotease Htra2/Omi⁵⁹⁻⁶¹. Cytochrom C bindet und aktiviert Apaf-1 (apoptotic peptidase activating factor-1) sowie Procaspase-9, welches in der Bildung eines Apoptosoms resultiert und Caspase-9 aktiviert⁶². Die Caspase-9 aktiviert wiederum ähnlich des extrinsischen Apoptoseweges die Caspase-3, wodurch die Caspase-Kaskade eingeleitet wird. Smac/DIABLO und Htra2/Omi inhibieren ihrerseits die Aktivität der Apoptose-Inhibitoren (IAP)⁶³. Im weiteren Verlauf werden die zweite Gruppe von Proteinen wie der Apoptose-induzierender Faktor (AIF) und verschiedene Endonukleasen aus den Mitochondrien freigesetzt, welche die DNA Fragmentierung und Chromatin Kondensation verursachen^{64,65}.

Diese Vorgänge werden hauptsächlich durch Proteine der Bcl-2 Familie kontrolliert und reguliert⁶⁶. Die Bcl-2 Familie umfasst sowohl pro-apoptotische Proteine wie Bcl-10, Bax und Bad als auch anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xl, Bcl-xs und BAG⁵⁰. Anti-apoptotische Proteine sind dabei vornehmlich in den Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum oder der Kernmembran zu finden⁶⁷, während pro-apoptotische Proteine unter Abwesenheit apoptotischer Stimuli im Zytosol und Zytoskelett präsent sind^{68,69}. Die Steuerung der Apoptose durch die Proteine der Bcl-2 Familie beruht hauptsächlich auf der Regulation der Cytochrom-C Freisetzung und nachfolgender Beeinflussung der Caspase-Aktivität.

Sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Weg der Apoptose enden mit der Exekutionsphase, die durch Aktivierung sogenannter Effektor-Caspasen eingeleitet wird. Die Caspasen (Cystein-abhängige-Aspartat-spezifische Proteasen) gehören zur Gruppe der Cysteinproteasen. Diese werden als inaktive Zymogene exprimiert und proteolytisch aktiviert. Strukturell und funktionell lassen sich drei Gruppen von Caspasen unterscheiden: die inflammatorischen Caspasen, die Initiator-Caspasen und die Effektor-Caspasen⁷⁰. Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7 fungieren als Effektor-Caspasen und werden von den Initiator-Caspasen (Caspase-2, Caspase-8, Caspase-9, Caspase-10) aktiviert. Die Effektor-Caspasen aktivieren wiederum weitere Enzyme wie Endonukleasen und Proteasen, welche die Degradation von Zellkern und Zytoskelett, sowie die Spaltung verschiedener Substrate einschließlich Zytokeratine und PARP (Poly (ADP-ribose) Polymerase) veranlassen, wodurch die morphologischen und biochemischen Veränderungen apoptotischer Zellen zustande kommen^{50,71}.

1.3 Muskarinische und nikotinische Acetylcholinrezeptoren

Acetylcholin ist ein bedeutender Neurotransmitter des zentralen sowie des peripheren Nervensystems. Neben seiner Funktion in neuronalen Systemen spielt Acetylcholin auch eine entscheidende Rolle in nicht-neuronalen Zellen⁷². Das cholinerge System, bestehend aus den synthetisierenden Enzymen, Rezeptoren und dem Signalmolekül Acetylcholin, wird in einer Vielzahl humaner epithelialer Zellen (Atemwege, Epidermis, Verdauungstrakt, Urogenitaltrakt) exprimiert^{72,73}. Weiterhin konnte Acetylcholin in endothelialen und mesothelialen Geweben, Muskel- und Immunzellen nachgewiesen werden⁷³. Durch sein verbreitetes Vorkommen ist nicht-neurales Acetylcholin an wichtigen regulatorischen Prozessen wie Zellproliferation und -differenzierung, Organisation von Zell-Zell Kontakten und Zytoskelett sowie der Aufrechterhaltung der physikalischen Barrierefunktion beteiligt^{73,74}.

Grundsätzlich können zwei Arten von Acetylcholinrezeptoren unterschieden werden, die muskarinischen und nikotinischen Rezeptoren. Die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs)⁷⁵⁻⁷⁷. Diese bestehen aus sieben Transmembrandomänen, welche durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen einschließlich des Amino-Terminus miteinander verknüpft sind. Durch Kopplung an sogenannte G-Proteine (heterotrimere Guanin-Nukleotid-bindende Proteine)⁷⁶ erfolgt die weitere Signaltransduktion und Initiati-

on eines bestimmten Second Messenger Systems. Es konnten insgesamt fünf verschiedene Rezeptorsubtypen (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , M_5) identifiziert werden^{76,78,79}. Diese können wiederum in zwei Klassen eingeteilt werden⁸⁰: Die exzitatorischen Rezeptoren (M_1 , M_3 , M_5) bewirken durch Bindung an Pertussis-Toxin-insensitive G-Proteine einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und die damit einhergehende Aktivierung des membrangebundenen Enzyms Phospholipase C. Dagegen koppeln die inhibierenden Rezeptoren (M_2 , M_4) bevorzugt an Pertussis-Toxin-sensitive G-Proteine und wirken hauptsächlich inhibierend auf die Adenylatcyclase^{81,82}. Darüber hinaus sind mAChRs auch an der Transaktivierung weiterer Rezeptoren wie den Rezeptor-Tyrosinkinasen beteiligt. Dazu gehört beispielsweise der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR). Dieser ist wiederum mit der Aktivierung der MAPK- (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) Kaskade gekoppelt, die in der Aktivierung der ERK1/2- (Extrazellulär regulierte Kinase) MAP- Kinasen kulminiert^{77,83,84}. Als Antwort auf die EGFR/MAPK Aktivierung ist ERK1/2 beispielsweise in der Lage, die Aktivität bestimmter Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen, welche an der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung beteiligt sind^{85,86}.

Im Gegensatz zu den muskarinischen Acetylcholinrezeptoren handelt es sich bei den nikotinischen um ionotrope, ligandengesteuerte Rezeptoren. Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) werden in einer Vielzahl neuronaler und nicht-neuronaler Zellen, Geweben und einigen sensorischen Organsystemen exprimiert^{87,88}. Sie sind unter anderem beteiligt an der Steuerung diverser Wachstumsfaktor- und Mitogen-induzierter Signalkaskaden. Bestehend aus einem Komplex aus fünf Untereinheiten ($\alpha 2$ -10 und $\beta 2$ -4 umfassend), bilden diese Homopentamere (neuronale nAChRs) oder Heteropentamere (muskuläre nAChRs) aus, die sich wiederum zu einem zentralen Ionenkanal zusammensetzen⁸⁹. Die ligandengesteuerten nAChRs ermöglichen den Einstrom von Na^{2+} und Ca^{2+} und den Ausstrom von K^+ - Ionen. In Neuronen führt die Rezeptor-Aktivierung zur Depolarisation der Zellmembran, welches wiederum den Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsgesteuerte Ca^{2+} - Kanäle herbeiführt⁹⁰. In nicht-neuronalen Zellen erfolgt der Ca^{2+} Einstrom durch nAChR-Kanäle und führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch freie Ca^{2+} -Ionen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die beschriebenen nikotinergen Effekte auch ohne Einstrom von Na^{2+} und Ca^{2+} erzielt werden können⁹¹ und der Ablauf von Signalwegen in nicht-neuronalen Zellen sowohl Ionen-gesteuert als auch nicht-ionisch erfolgt⁹⁰. Inwiefern nAChRs mit den Signalmolekülen interagieren, hängt wiederum von Zelltyp und den beteiligten nAChR –

Untereinheiten ab. Nikotinische Acetylcholinrezeptoren sind unter anderem an der Aktivierung der Phospholipase C, PI3K, AKT, Janus Kinase 2 (JAK2), p38 MAPK und der RAS-RAF-MEK-ERK Signalkaskade beteiligt^{90,92-95}. Ähnlich wie mAChRs sind nAChRs ebenfalls in der Lage, eine EGFR Transaktivierung zu induzieren⁸⁸. Die weitläufige Verbreitung nAChRs, einschließlich der Expressierung in Krebszellen^{96,97}, legt deren direkten Zusammenhang mit der Zellproliferation und Tumorprogression nahe⁹⁸.

1.4 Die Rolle von Nikotin in der Tumorgenese

Tabakrauchen verursacht jährlich 4-5 Millionen Todesfälle weltweit und gilt als Hauptrisikofaktor bei der Entstehung und Progression einer Vielzahl humaner Krebsarten^{89,98}. Nikotin, ein Bestandteil von Tabak und hauptverantwortlich für dessen Suchtwirkung, gilt selbst als nicht-konventionelles Kanzerogen^{94,98}. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Nikotin die Zellproliferation, Angiogenese sowie die epithelial-mesenchymale Transition fördert, welches wiederum ein verstärktes Tumor- und Metastasenwachstum zur Folge hat^{89,94,98}. In Neuroblastom- und Endothelzellen konnte nachgewiesen werden, dass die Nikotinexposition zu Änderungen der Genexpression führt^{99,100}. Diese Effekte werden hauptsächlich durch Bindung an nikotinische Acetylcholinrezeptoren ermöglicht. Nikotin imitiert Acetylcholin, indem es als Agonist mit hoher Affinität an Untereinheiten nAChRs bindet^{89,90,98}. Dabei werden, verglichen mit anderen Isoformen, vor allem die $\alpha 7$ nAChRs mit der Progression von Krebs in Verbindung gebracht^{90,98}. Zusätzlich konnte auch eine Hochregulierung $\alpha 9$ nAChRs in Krebszellen beobachtet werden⁸⁹, deren Aktivierung entscheidend für die Initiation der Zellmigration zu sein scheint¹⁰¹. Nikotin ist außerdem in der Lage, die durch DNA Schäden induzierte G1/S Restriktion des Zellzyklus außer Kraft zu setzen, welches die genetische Instabilität von Zellen zur Folge hat¹⁰². In Brustkrebszellen konnte wiederum eine Sensibilisierung der EGFR-vermittelten Signaltransduktion nach Nikotinexposition beobachtet werden, welches das Zellwachstum begünstigt⁹⁴. Darüber hinaus gibt es Erkenntnisse, dass Nikotin die Überlebensrate von Krebszellen steigert und diese vor chemotherapeutischen Agenzien durch Inhibierung der Apoptose schützt^{89,90,103}. Der inhibitorische Effekt des Nikotins auf die Apoptose beruht unter anderem auf der Aktivierung und Phosphorylierung antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2¹⁰⁴, Aktivierung des Akt-Signalweges oder durch Inaktivierung proapoptotischer Proteine wie Bax und Bad^{103,105}. In Brustkrebszellen konnte zudem gezeigt werden, dass Nikotin die Resistenz gegenüber chemotherapeu-

tisch induzierter Apoptose durch vermehrte Transkription von Galectin-3 (anti-apoptotisches β -Galactosid-bindendes Lectin) nach Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 verstärkt⁸⁹. Weiterhin führt Nikotin über den PI3K-Akt-Signalweg zu einer erhöhten Telomerase-Aktivität, wodurch Zelltod und Zellalterung verzögert werden¹⁰⁶. Zusätzlich gibt es Erkenntnisse, dass $\alpha 7$ Subtypen und weitere Subtypen nAChRs an der mitochondrialen Außenmembran nicht-neuronaler Zellen exprimiert werden und deren Aktivierung die Freisetzung von Cytochrom-C und damit den initialen Schritt des intrinsischen Weges der Apoptose inhibiert^{107,108}.

1.5 Ziele der Studie

Aus mehreren Studien geht hervor, dass Nikotin Krebszellen vor Chemotherapie schützen kann und dass Rauchen auch ein Risikofaktor bei solchen Krebserkrankungen ist, wo es keinen unmittelbaren Kontakt der Krebszellen mit Zigarettenrauch gibt. Nikotin führt zu Änderungen der Genexpressionsmuster in Krebszellen, wodurch diese resistenter gegenüber chemotherapeutischen Substanzen werden und eine verbesserte Überlebensrate aufweisen.

In dieser Arbeit soll in malignen MCF-7 Adenokarzinomzellen der Brust sowie nicht-malignen MCF10A Brustepithelzellen untersucht werden, inwiefern die durch Nikotin verursachten Änderungen der Genexpression von den Proteinen der Flotillin-Familie abhängig sind. Dazu werden Nikotin-behandelte Zellen (Kontrollzellen und Flotillin-depletierte Zellen) miteinander verglichen und die Expression ausgewählter Gene gemessen.

Weiterhin sollen die Effekte von Flotillinen und Nikotin auf die Überlebensrate der Krebszellen nach Behandlung mit Chemotherapeutika analysiert werden.

2 Material

2.1 Materialien und Geräte

Tabelle 1: Verwendete Materialien und Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Schwenktisch (WS-10)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen (DE)
Schüttler (Polymax 1040)	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach (DE)
Airflow-Control (EN 14175)	WALDNER Inc., MA (USA)
Heiz-Thermomixer HTMR 131	HLC, Bovenden (DE)
Lichtmikroskop (AE 31)	Motic, Wetzlar (DE)
MonoBloc Chemikalienwaage	Mettler-Toledo GmbH, Giessen (DE)
Zentrifugen:	
Universal 32 R	Hettich, Kirchlengern (DE)
Mikro 22 R	Hettich, Kirchlengern (DE)
Mikro 200 R	Hettich, Kirchlengern (DE)
miniSpin plus	Eppendorf, Hamburg (DE)
Tischzentrifuge	Labnet, Langenfeld (DE)
Gelelektrophorese und Western-Blot:	
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	neoLab, Heidelberg (DE)
SDS-PAGE Kammer	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Spannungsquelle (Electrophoresis Power Supply, EPS 301)	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Blot-Kammer (BioRad)	BioRad Laboratories GmbH, München (DE)
Nitrocellulose-Membran (Whatman® Protran)	Whatman, Dassel (DE)
Entwickler-Maschine (Curix 60)	AGFA, Düsseldorf (DE)

Röntgenfilm (Super RX Fuji medical X-ray Films)	FUJIFILM, Düsseldorf (DE)
Polymerase-Kettenreaktion:	
TPersonal Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen (DE)
BioRad CFX Connect™ Real-Time Sys- tem	BioRad Laboratories GmbH, München (DE)
Zellkultur:	
Sterilbank (Herasafe KS)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot (DE)
Neubauer Zählkammer	Optik Labor, Bad Homburg (DE)

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe (DE)
BioRad Bradford Reagenz	BioRad, München (DE)
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe (DE)
BSA (Bovines Serumalbumin)	GE Healthcare, München (DE)
Chloroform	Roth, Karlsruhe (DE)
Cholera-Toxin	vibrio cholerae, Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
DEPC	AppliChem, Darmstadt (DE)
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s medium)	Life Technologies, Darmstadt (DE)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe (DE)

DNase I	NEB, Frankfurt (DE)
DTT (Dithiothreitol)	AppliChem, Darmstadt (DE)
ECL Western blotting detection reagent	GE Healthcare, München (DE)
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe (DE)
EGF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Essigsäure	Roth, Karlsruhe (DE)
Ethanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt (DE)
FCS (Fötale Kälberserum)	Life Technologies, Darmstadt (DE)
HS (Pferdeserum)	PAA Laboratories
Insulin	Sanofi Aventis
Isopropanol	Roth, Karlsruhe (DE)
iTaq™ Universal SYBR Green Supermix	BioRad Laboratories GmbH, München (DE)
M-MuLV Reverse Transcriptase	NEB, Frankfurt (DE)
MTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Natriumfluorid (NaF)	Fluka, Neu-Ulm (DE)
Nikotin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Penicillin/Streptomycin	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe (DE)
Ponceau S	Appllichem, Darmstadt (DE)
Precision Plus Protein Standard	BioRad, München (DE)
Proteinase Inhibitor Cocktail (PI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Puromycin	Life Technologies, Darmstadt (DE)
Staurosporin	LC Laboratories, Woburn (USA)

TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan)	Roth, Karlsruhe (DE)
Trifast	PEQLAB, Erlangen (DE)
Tris	AppliChem, Darmstadt (DE)
Trypsin	Life Technologies, Darmstadt (DE)

2.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Blockpuffer	1 x TBST (Tris gepufferte Kochsalzlösung & Tween 20) 5% Milchpulver
Blottingpuffer (1x)	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 10% Methanol
Lämmli-Laufpuffer (1x)	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0,1% SDS
Lyse-Puffer (Stürmer)	50 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% NP-40
PBS (1x) (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4)	150 mM NaCl 20 mM NaH ₂ PO ₄
Ponceau Färbelösung	1% Ponceau S 5% Essigsäure
SDS-Ladepuffer (4x)	250 mM Tris-HCl pH 6,8 8% SDS 40% Glycerin 0,2% Bromphenolblau 100 mM DTT 20% β -Mercaptoethanol
Stripping-Lsg. Alkalisch	0,1 M NaOH (pH 12,7)
1 x TBST (Tris gepuffertes Kochsalz & Tween 20)	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl 0,05% Tween 20

2.4 Synthetische Primer

Die für die quantitative Real-Time PCR verwendeten DNA Primer entstammen der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE) und wurden mittels PerlPrimer entworfen. Zugehörige Sequenzen sowie Hybridisierungs-Temperaturen sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: DNA Primer, zugehörige Sequenzen und Annealing-Temperaturen

Gen	Primer forward (5' zu 3')	Primer reverse (5' zu 3')	T _{Annealing} [°C]
Cyclin D1	TCGTGGCCTCTAAGATGAAGGA	CAGCTCCATTTGCAGCAGCTC	60°
Dusp1	GGAGGACAACCACAAGGCAGAC	AGGTAAGCAAGGCAGATGGTGG	60°
Egr1	TTCAACCCTCAGGCGGACAC	GTCTCCACCAGCACCTTCTCGT	60°
Fos	TACTCTCCAAGCGGAGACAGAC	CAGGTCATCAGGGATCTTGCAG	60°
Puma	ACGACCTCAACGCACAGTACGA	AGGGCAGGAGTCCCATGATGAG	60°
P21	TCTTGTACCCTTGTGCCTCGCT	CTTGGAGAAGATCAGCCGGCGT	60°
P53	CACTAAGCGAGCACTGCCCA	CGGAACATCTCGAAGCGCTCAC	60°
Rpl13a	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	60°
Ywhaz	AGGTTGCCGCTGGTGATGAC	GGCCAGACCCAGTCTGATAGGA	60°

2.5 Antikörper

Die für die Western Blots eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sind in den Tabellen 5 und 6 zusammengefasst.

2.5.1 Primärantikörper

Tabelle 5: Die verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung	MG [kDa]	Hersteller
Caspase-3	Kaninchen	1:500	17+35	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
Flotillin-1	Maus	1:1000	47	BD Transduction Labs, Heidelberg (DE)
Flotillin-2	Maus	1:1000	48	BD Transduction Labs, Heidelberg (DE)
GAPDH	Maus	1:10000	37	Abcam, Cambridge (UK)
PARP	Kaninchen	1:1000	89	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)

2.5.2 Sekundärantikörper

Tabelle 6: Die verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Goat anti-mouse-HRP	1:10000	Dako, Hamburg (DE)
Goat anti-rabbit-HRP	1:10000	Dako, Hamburg (DE)

2.6 Humane Zelllinien

Die für die experimentelle Durchführung verwendeten humanen Zelllinien sind unter Angabe des Wachstumsverhaltens und der Referenz in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Humane Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Wachstum	Referenz
MCF-7	Humane Mammakarzinomzellen	adhärent	Soule <i>et al.</i> 1973
MCF10A	Humane Brustepithelzellen	adhärent	Soule <i>et al.</i> 1990

2.7 Software und Bildbearbeitung

Alle Experimente wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Datenverarbeitung erfolgte mit Microsoft Excel. Für die Bildbearbeitung wurden die Programme Paint.NET, Microsoft Office und Microsoft PowerPoint genutzt.

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Standardmethoden

3.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Kultivierung humaner Brustkrebszellen (MCF-7) erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Glukose 4,5 g/l) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS) sowie 1% Penicillin/Streptomycin im Inkubator bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO₂ Gehalt von 8%.

Die humanen Brustepithelzellen (MCF10A) wurden in DMEM/F12-Medium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zusätzlich wurden dem Medium 5% Pferdeserum, 1% Penicillin/Streptomycin, 20 ng/ml EGF, 1 µM Dexamethason, 10 µg/ml Insulin sowie 100 ng/ml Cholera-Toxin hinzugefügt (Tab. 2).

Stabilen Flotillin-Knockdown-Zellen wurde zur Kultivierung zusätzlich 2 µg/ml Puromycin beigefügt^{44,109}.

Für das Splitten der Zellen wurde das Medium zunächst verworfen und es folgte ein Waschschrift mit 5 ml 1x PBS. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin versetzt und 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst hatten, erfolgten die Zugabe von 3 ml Medium und die Resuspension der Zellen. Im Anschluss konnten die Zellen für anschließende Versuche ausgesät oder als Erhaltungskultur angelegt werden.

3.1.2 Stimulation humaner Zelllinien

Die Stimulation erfolgte unter serumfreien Bedingungen, sobald die Zellen eine Konfluenz von etwa 80% erreicht hatten. Es wurden Nikotinkonzentrationen von 10 µM und 100 µM verwendet, die Stimulationsdauer lag zwischen 15 Minuten und 48 Stunden. Als chemotherapeutisches Agens wurde Staurosporin (STS) in einer Konzentration von 1 µM (DMSO Lösung) verwendet. Staurosporin ist ein Proteinkinase-Inhibitor und wird zur Induktion der Apoptose eingesetzt, indem es die Translokation von Bax in die Mitochondrien steuert und zur Freisetzung von Cytochrom-C ins Zytosol führt¹¹⁰. Die Inkubationszeit betrug bis zu 4 Stunden.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA Isolierung

Mit Hilfe der RNA-Isolierung wird eine Analyse der momentanen Zelltätigkeit ermöglicht, da im Moment der Isolierung nur die aktuell transkribierten Gene als RNA vorliegen. Dieser Vorgang wurde entsprechend der *peqGOLD TriFastTMFL*-Methode (peqlab, VWR International GmbH, Erlangen, DE) durchgeführt.

Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, anschließend mit jeweils 800 μ l Trizol versetzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zugabe von Trizol bewirkte eine Lyse der Zellen, wobei die Integrität der RNA erhalten blieb. Nach einer 5 minütigen Einwirkzeit bei Raumtemperatur wurde den Proben 160 μ l Chloroform zugefügt. Nachdem die Proben für 15 Sekunden intensiv geschüttelt und für 3 weitere Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen wurden, folgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 12.000 g und 4°C. Es bildeten sich 3 Phasen, wobei die obere wässrige Phase die RNA enthielt. Diese wurde wiederum in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von 400 μ l Isopropanol und erneuter Zentrifugation für 10 Minuten aus der wässrigen Phase isoliert und wurde anschließend als Pellet am Boden des Eppendorfgefäßes sichtbar. Nach Verwerfen des Überstandes wurden 800 μ l Ethanol (75%) hinzugegeben. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 7500 g für 5 Minuten. Der Überstand wurde erneut verworfen. Dieser Waschschrift konnte nochmals wiederholt werden. Anschließend wurde das Pellet 15 Minuten lang kopfüber luftgetrocknet und in 50 μ l DEPC-Wasser gelöst.

Im Anschluss wurde ein DNA Verdau durchgeführt, um einer Kontamination der RNA mit genomischer DNA vorzubeugen. Dazu wurden 100 μ l bestehend aus 50 μ l RNA-Probe, 10 μ l DNase Reaction Buffer (10x), 1 μ l RQ1 DNase sowie 39 μ l H₂O angesetzt und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2,5 μ l 0,2 M EDTA hinzugegeben und es folgte eine 10 minütige Hitzeinaktivierung der DNase bei 75°C.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometrie

Bei der spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung erfolgte eine Messung der optischen Dichte bei $\lambda = 260$ nm (OD_{260}), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren (DNA/RNA) und $\lambda = 280$ nm (OD_{280}), dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Durch den Quotienten aus OD_{260} und OD_{280} konnte bestimmt werden, ob eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen oder aromatischen Substanzen vorliegt. Bei reiner

RNA sollte das Verhältnis zwischen 1,9-2,2 liegen. Bei Ratiowerten unter 1,6 ist die Probe kontaminiert und die RNA sollte erneut gereinigt werden. Eine OD_{260} von 1 entspricht dabei 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA.

3.2.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription dient der Umschreibung der RNA in DNA. Dieser Schritt ist notwendig, um RNA mit Hilfe der PCR analysieren zu können. Da in der vorliegenden Arbeit eine Messung der Genexpression stattfand, erfolgte die Amplifikation des Genfragments aus seiner mRNA mit Hilfe der sogenannten quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR). Einzelsträngige RNA-Moleküle wurden mit der reversen Transkriptase in ein komplementäres DNA-Molekül (cDNA) umgeschrieben. Somit konnte die entstandene cDNA als Matrize für die PCR eingesetzt werden.

Für die Umschreibung in cDNA wurden die Proben abhängig von ihrer RNA Konzentration mit Wasser verdünnt, sodass letztlich 19,5 μl aus RNA und Wasser zusammengegeben wurden. Weiterhin wurden 1,5 μl Oligo-dT (1 pmol/ μl) Primer hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde bei 72° für 4 Minuten vorinkubiert und dann auf 37°C abgekühlt. Anschließend folgte die Zugabe eines Reaktionsmixes (24 μl je Probe), zusammengesetzt aus 3 μl Oligonukleotiden (dNTP, 10 mM), 0,45 μl BSA (10 mg/ml), 0,50 μl RNase Inhibitor, 4,50 μl RT-Puffer (10x), 0,5 μl Reverse Transkriptase (M-MuLV) und 15,5 μl Wasser. Es folgte eine 2 stündige Inkubation bei 37°C. Danach wurden die Proben für 10 Minuten auf 94°C erhitzt und abschließend auf 4°C heruntergekühlt.

3.2.4 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR ist ein Verfahren zur Quantifizierung von mRNA-Abschnitten für Genexpressionsstudien.

Die quantitative Real-Time PCR wurde mit Hilfe des BioRad CFX Connect™ *Real-Time* Systems durchgeführt. Dazu wurden Primer und cDNA zunächst verdünnt und anschließend ein Mastermix, bestehend aus 5 μl Biorad SYBR Green Supermix und je 0,2 μl Primer forward und Primer reverse pro Probe, zusammen pipettiert. Die Hybridisierungs-Temperaturen der verwendeten Primer-Paare lagen bei 60°C und sind in Tabelle 4 aufgelistet. Es wurden pro Well 5,4 μl des Mastermixes vorgelegt und anschließend 4,6 μl verdünnte cDNA hinzugefügt.

Die Analyse und Quantifizierung der qPCR Produkte erfolgte nach der Δ Ct-Methode. Für die Normalisierung dient das geometrische Mittel der 3 Referenzgene Rpl13a, B2M und Ywhaz¹¹¹.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus MCF-7 und MCF10A Zellen

Für die Proteinanalytik eignet sich die Herstellung von Zelllysaten. Dazu erfolgte zunächst ein Waschgang der Zellen mit 1x PBS. Anschließend wurden die Zellkulturplatten mit jeweils 200 μ l Lysepuffer und Proteinaseinhibitoren (Tab. 2) im Verhältnis 1:100 versetzt und 10 Minuten auf Eis geschwenkt. Die Zellen wurden weiterhin mittels Zellschaber vom Zellkulturgefäß gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine 20 minütige Lyse auf Eis und anschließende Zentrifugation bei 15.000 rpm für 10 Minuten, um lösliche Proteine von den übrigen Zellbestandteilen zu trennen. Das gewonnene Lysat konnte anschließend als Überstand abpipettiert werden. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des BioRad Bradford Reagenz photometrisch bestimmt. Für die Konzentrationsmessung wurden pro Probe je 3 μ l des Lysats, 800 μ l aqua dest. sowie 200 μ l Bradford Reagenz zusammengegeben.

3.3.2 SDS-PAGE und Western Blot

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht eine immunbiochemische Analyse durch Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Dazu wurden die Proben zunächst mit 4x Ladepuffer (Tab. 3) versetzt, bei 95°C 5 Minuten gekocht und somit denaturiert. Das im Ladepuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die Proteine und verleiht ihnen eine negative Ladung, sodass sich diese gegenseitig abstoßen und entsprechend ihrer Größe im Polyacrylamid-Gel auftrennen.

Nachdem das Gel mit den jeweiligen Proben beladen wurde, erfolgt die Gelelektrophorese bei 15-20 mA pro Gel für mindestens eine Stunde.

Im Anschluss erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran, an deren Oberfläche sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen hafteten. Dazu wurde ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes Feld angelegt. Der Transfer wurde bei 400 mA für eine Stunde durchgeführt.

Durch Einfärben der Membran mit Ponceau S (Tab. 3) konnte eine Kontrolle des Transfers erfolgen und die gebundenen Proteine unspezifisch detektiert werden. Nach Entfär-

bung der Membran in 1x TBST wurden die freien Bindungsstellen der Membran durch einen Blockpuffer aus Milchpulver (5%) in 1x TBST über 30 Minuten blockiert und ein Nachweis spezifischer Antigene ermöglicht. Im Anschluss erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers über Nacht bei 4°C.

Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 3x für jeweils 10 Minuten in 1xTBST gewaschen. Danach folgte die Inkubation eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers über 60 Minuten. Die Meerrettichperoxidase (HRP) katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form. Eine Lumineszenz konnte auf diese Weise detektiert werden. Weiterhin folgten erneut 3 Waschschrte mit 1x TBST à 10 Minuten. Die Detektion des Sekundärantikörpers erfolgte durch Zugabe von je 1 ml ECL Western Blotting Detection Reagenz pro Membran für 2 Minuten. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Röntgenfilme entsprechend der Signalstärke zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten aufgelegt und anschließend entwickelt. Mit Hilfe einer alkalischen Stripping-Lösung (Tab. 3) konnte eine weitere Immundetektion der Blots ermöglicht werden. Dazu wurden die Blots zunächst 5 Minuten in der Stripping-Lösung, für weitere 5 Minuten in destilliertem Wasser und zuletzt in TBST gewaschen. Danach erfolgte erneut eine 30 minütige Behandlung mit einem Blockpuffer.

3.3.3 *MTT-Test*

Der MTT-Test ist ein Verfahren zur Messung der Zellproliferation und beruht auf der enzymatischen Umsetzung des wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in ein wasserunlösliches Formazan. Der durch diese Reaktion eintretende Farbumschlag von gelb nach violett kann anschließend photometrisch bestimmt werden.

Dazu wurden mit der Multipette je 25 µl MTT Lösung (5 mg/ml in PBS) in die Kernzonen der Multiwellplatte pipettiert und anschließend für 40 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgeschlagen und 100 µl Lysepuffer (95% Isopropanol/ 5% Ameisensäure) in jedes Loch der Kernzone pipettiert. Nachdem die Multiwellplatte 10 Minuten auf den Schüttler gestellt wurde, erfolgte die photometrische Messung im Tecan-Reader bei 550 nm Wellenlänge gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm.

4 Ergebnisse

4.1 Nikotinstimulation der MCF-7 Wildtypzellen: qPCR Ergebnisse

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden die MCF-7 Wildtypzellen zunächst mit unterschiedlichen Nikotinkonzentrationen (10 μM und 100 μM) für 15 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden, 17 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden behandelt. Nach RNA Isolation und Umschreibung in cDNA erfolgte die Messung der Genexpression mittels quantitativer Real-Time-PCR. Dabei wurden gezielt Gene untersucht, welche entscheidend für die Proliferation und das Überleben von Zellen sind. Da keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten Zellen und Zellen mit niedriger Nikotinkonzentration und kurzer Stimulationsdauer erkennbar waren, wurden die Versuche weiterhin ausschließlich mit einer Konzentration von 100 μM Nikotin und einer Stimulationsdauer von 24 Stunden fortgeführt. Dabei wurde die Aktivität folgender Gene gemessen: p53, p21, CyclinD1, Egr1, Dusp1, Puma und Fos.

p53:

Das Tumorsuppressorgen p53 ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt, indem es als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen steuert, die für die DNA-Reparatur und Apoptose von Bedeutung sind. Bei DNA-Schäden akkumuliert p53 in der Zelle, wodurch Reparaturmechanismen induziert werden und der Zellzyklus unterbrochen wird. Dies wird in erster Linie durch Transaktivierung des Gens p21 ermöglicht. Zudem ist p53 in der Lage, Gene der Bcl-2 Familie, insbesondere das pro-apoptotische Bax-Gen zu aktivieren, welches durch anschließende Cytochrom-C Freisetzung und Induktion der Caspase-Signalkaskade, die Apoptose auslöst. Die Inaktivierung von p53 führt demzufolge zu einer unkontrollierten Zellteilung und Entartung von Zellen. In über 50% aller Tumorerkrankungen lässt sich eine Mutation dieses Gens nachweisen.

p21:

Das Gen p21, auch bekannt als CDK1 (Cyclin dependent kinase) –Inhibitor, ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Als Antwort auf verschiedene Stimuli und Aktivierung durch das Tumorsuppressorgen p53 unterbindet p21 die Zellteilung, indem es die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK1 und CDK2 hemmt¹¹².

Cyclin D1:

Cyclin D1 übernimmt ebenfalls eine entscheidende Rolle im Rahmen des Zellzyklus. Es ist essentiell für den Übergang der G1- in die S-Phase des Zellzyklus, indem es zusammen mit den Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 Komplexe ausbildet, die das Retinoblastom-Protein phosphorylieren und damit inaktivieren¹¹³. Dadurch wird der weitere Ablauf des Zellzyklus gewährleistet.

Egr1:

Egr1 (Early growth response-1) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in die Regulation diverser Gene involviert ist. Zudem spielt Egr1 eine entscheidende Rolle in der Regulation der Zellproliferation, dem Überleben von Zellen und der Apoptose und wird dabei durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine stimuliert.

Dusp1:

Dusp1 gehört zur Familie der dual-spezifischen Phosphatasen, welche in der Lage sind, Aminosäurereste, bevorzugt Serin/Threonin oder Tyrosin, zu dephosphorylieren und damit die Aktivität ihrer Substrate zu modulieren. Somit beeinflussen sie verschiedene Signalwege wie beispielsweise den MAP-Kinase-Weg.

PUMA:

Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis) ist ein pro-apoptotisches Protein, dessen Expression durch den Tumorsuppressor p53 reguliert wird. Durch Bindung an anti-apoptotische Proteine der Bcl-2 Familie wie Bcl-2 und Bcl-xl, wird deren Interaktion mit pro-apoptotischen Proteinen inhibiert. Dies resultiert in der Translokation des pro-apoptotischen Proteins Bax, welches die Apoptose durch Freisetzung von Cytochrom-C aus den Mitochondrien induziert.

Fos:

Das Gen Fos wird mit der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung in Verbindung gebracht. Fos kodiert Proteine, welche zusammen mit Proteinen der Jun Familie den Transkriptionsfaktor-Komplex AP-1 (Activator Protein-1) ausbilden. AP-1 reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression diverser Gene, die am Zellwachstum beteiligt sind.

Nachfolgend sind die qPCR Ergebnisse nach 24-stündiger Nikotinstimulation in Nährmedium im Vergleich zu unstimulierten Zellen dargestellt.

Die Auswertung der qPCR Ergebnisse konnte insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen verzeichnen, die einen alleinigen Effekt des Nikotins auf die Zellproliferation und das Zellüberleben belegen.

In den weiteren Versuchen wurden die Zellen daher zusätzlich mit dem Chemotherapeutikum Staurosporin behandelt, um einen Effekt des Nikotins auf apoptotische Zellen zu untersuchen. Die Auswertung erfolgte hierbei mittels Fotodokumentation und Western Blot Analyse.

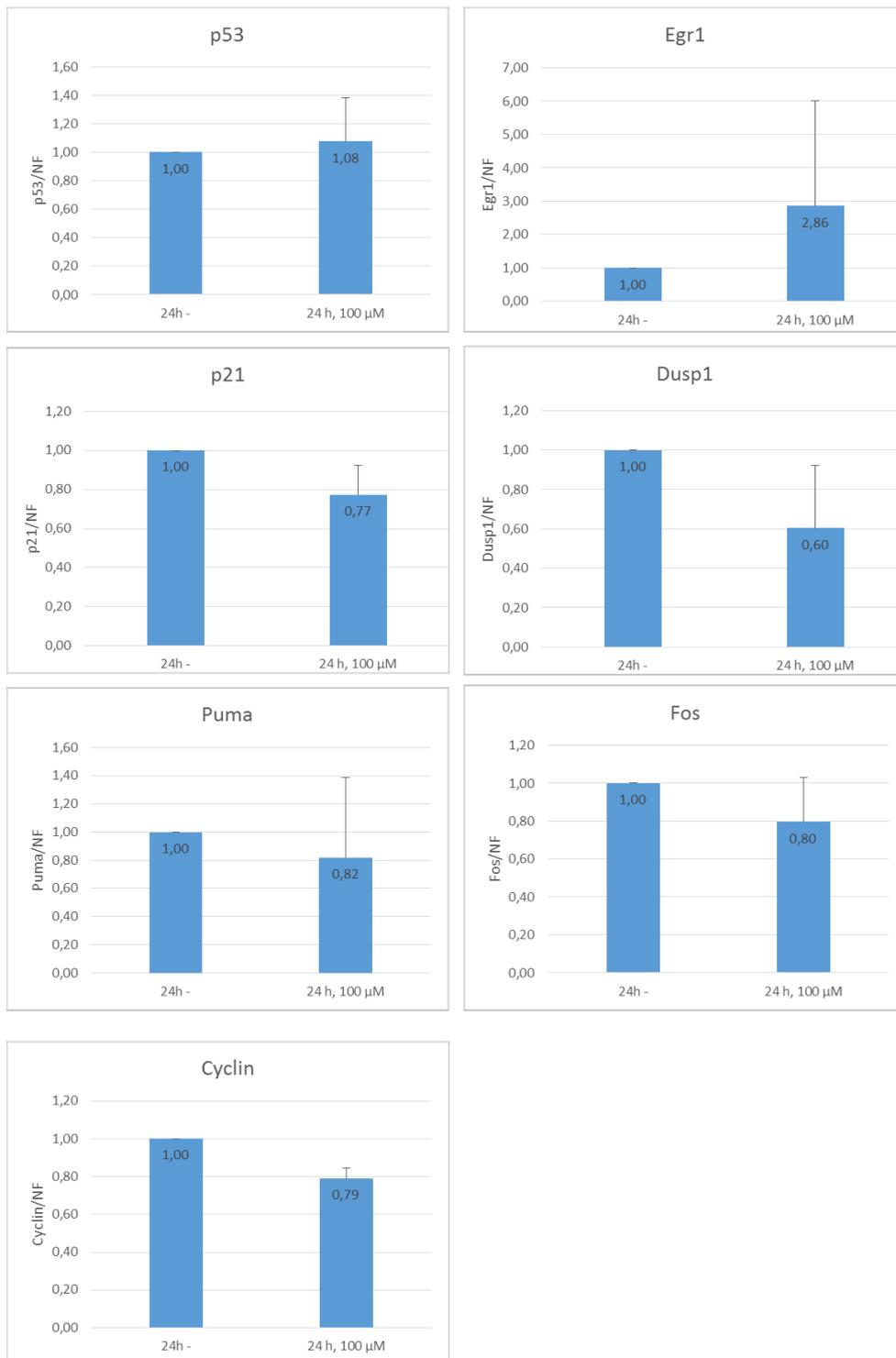


Abbildung 1: Auswertung der qPCR Vorversuche. Dargestellt sind die qPCR Ergebnisse nach 24-stündiger Nikotinstimulation der MCF-7 Wildtypzellen in Nährmedium im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen. Das Säulendiagramm repräsentiert den Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 Versuchen.

4.2 MCF-7: STS Zeitreihe

Zur Bestimmung der Behandlungsdauer des Chemotherapeutikums Staurosporin (STS) wurden die MCF-7 Wildtypzellen zunächst über verschiedene Zeitintervalle mit STS behandelt. Die Ergebnisse der STS Zeitreihe wurden fotodokumentarisch festgehalten (Abb. 2). Zusätzlich wurden die Zellproben für eine Western Blot Analyse vorbereitet (Abb. 3). Weitere Kontrollzellen wurden allein mit dem Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) behandelt, um einen Effekt auf das Zellüberleben auszuschließen.

4.2.1 Fotodokumentation

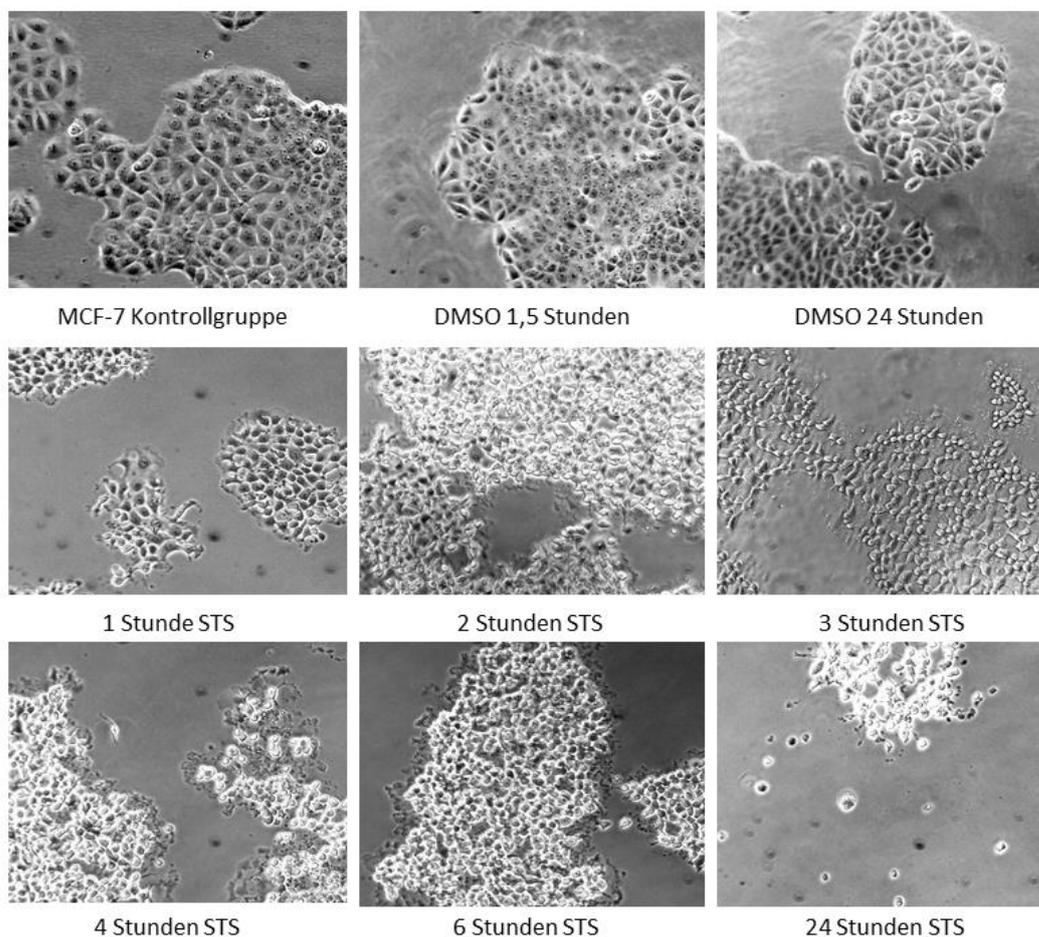


Abbildung 2: Fotodokumentation der STS Zeitreihe behandelter MCF-7 Zellen. Dargestellt sind die Kontrollzellen (mit und ohne DMSO) und die STS behandelten Zellen nach 1, 2, 3, 4, 6 und 24 Stunden.

Die Ausgangssituation zeigt unbehandelte MCF-7 Wildtypzellen. Zellkern und Zytoplasma sind deutlich erkennbar. Die Zellen sind über Zell-Zell-Kontakte verknüpft und bilden einen geschlossenen Zellverband.

Die DMSO-Kontrollzellen sind nach einer Behandlungsdauer von 1,5 und 24 Stunden aufgeführt. Weder nach kurzer noch nach langer Einwirkungszeit ist ein schädigender Effekt des Lösungsmittels festzustellen. Ein Einfluss des DMSO auf das Überleben der Zellen lässt sich somit ausschließen.

Nach einer Behandlungsdauer von einer Stunde sind bereits erste Veränderungen durch die STS-Einwirkung zu erkennen. Der einheitliche Zellverband weist nun Unterbrechungen auf, die Zell-Zellkontakte beginnen sich zu lösen.

Nach 2 Stunden unter STS-Behandlung treten anfängliche Anzeichen apoptotischer Veränderungen auf. Es ist eine Größenabnahme der einzelnen Zellen zu verzeichnen. Aufgrund der Chromatinkondensation sind die Zellkerne dichter gepackt und es ist eine Schrumpfung des Zytoplasmas festzustellen.

Nach 3-4 Stunden verschlechtert sich der Zustand der Zellen zunehmend. Einzelne Zellen dissoziieren vom Zellverband. Weiterhin ist eine verstärkte Lichtreflektion zu erkennen, da sich die adhärennten Zellen vermehrt vom Boden des Zellkulturgefäßes ablösen.

Nach einer 6 stündigen Behandlungsdauer sind die Zellen annähernd vergleichbar mit der Situation nach 4 Stunden. Die Zellen lösen sich vermehrt vom übrigen Zellverband. Die letzte Abbildung zeigt die abschließende Situation der Zellen nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden. Es wird ersichtlich, dass die Zellen nach diesem Zeitraum nicht überlebensfähig sind. Die Zellen haben sich vollständig vom Boden gelöst und der ursprüngliche Zellverband ist nicht mehr existent. Es sind überwiegend vereinzelte Zellfragmente festzustellen.

4.2.2 Western Blot Ergebnisse der STS Zeitreihe

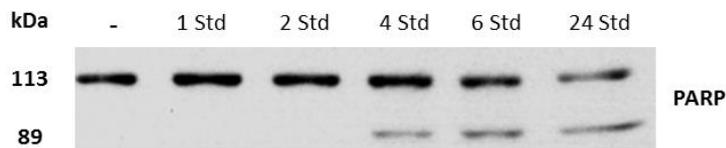


Abbildung 3: Western Blot der STS Zeitreihe.

PARP:

Das Enzym Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) ist in verschiedene zelluläre Prozesse, insbesondere die DNA-Reparatur involviert und trägt damit zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität bei. Bei vorliegenden DNA Brüchen katalysiert PARP ADP-Ribosylierungen nukleärer Proteine einschließlich Histonen. Zudem gilt PARP als Apoptose-Marker-Enzym. Im Verlauf der Apoptose erfolgt die durch Caspase-3 katalysierte proteolytische Spaltung des Proteins mit der Molekülmasse von 113 kDa in Fragmente von 89 kDa und 24 kDa.

In der Abbildung 3 sind die Ergebnisse der Western-Blot Analyse nach STS-Behandlung dargestellt. Das intakte PARP ist als kontinuierliches Bandenmuster bei 113 kDa erkennbar, während das Signal seiner Spaltprodukte bei 89 kDa erscheint. Obwohl die Fotos bereits nach einer Behandlungsdauer von einer Stunde erste Veränderungen der Zellstruktur aufzeigen (Abb. 2), erfolgt die Induktion der Apoptose und die damit einhergehende proteolytische Spaltung erst nach einer Behandlungsdauer von 4 Stunden, wie das Bandenmuster erkennen lässt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die STS-Behandlungsdauer folglich auf 4 Stunden festgelegt.

4.3 MCF-7 Knockdown-Zellen

In den weiteren Versuchen erfolgte die Behandlung der MCF-7 Knockdown-Zellen. Hierbei handelt es sich um siRNA-Plasmid transfizierte Zellen, während die Covi-Zellen mit einer Kontroll-siRNA stabil transfiziert wurden. Von jeder Zelllinie wurden 4 Proben vorbereitet:

1. Kontrollgruppe (-)
2. Stimulation mit 100 μ M Nikotin über 48 Stunden (Nikotin)
3. Behandlung mit 1 μ M STS über 4 Stunden (STS)
4. Stimulation mit 100 μ M Nikotin über 48 Stunden und 1 μ M STS in den letzten 4 Stunden (++)

Flotillin-2 Knockdown-Zellen

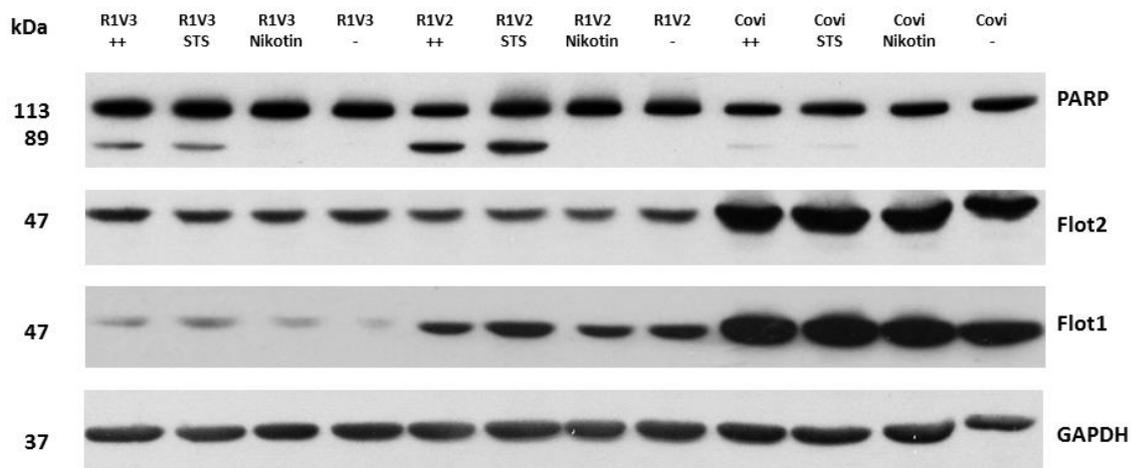


Abbildung 4: Western Blot der MCF-7 Flotillin-2 Knockdown-Zellen. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Western Blot Analyse der Flotillin-2 Knockdown-Zellen (R1V2, R1V3). Die Covi-Zellen sind als Kontrollgruppe aufgeführt. Es wurden 4 verschiedene Antikörper verwendet: GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Ladekontrolle, Flotillin-2 sowie Flotillin-1 und erneut PARP als Apoptose-Marker. Der Vergleich zeigt unstimulierte Zellen (-); Zellen, welche über 48 Stunden mit 100 μ M Nikotin stimuliert wurden (Nikotin); Zellen, welche 4 Stunden mit STS behandelt wurden (STS) und Zellen, welche 48 Stunden mit Nikotin stimuliert und in den letzten 4 Stunden zusätzlich mit STS behandelt wurden (++)

Zunächst ist erkennbar, dass in den STS-behandelten Zellen gespaltenes PARP vorliegt, während dieses Signal bei unbehandelten Zellen ausbleibt (Abb. 4). Der Vergleich der Knockdown-Zellen mit den Kontrollzellen zeigt zudem, dass der Anteil des gespaltenen PARP der Knockdown-Zellen gegenüber dem der Covi-Zellen stark erhöht ist. Dies lässt darauf schließen, dass in Flotillin-2 depletierten Zellen eine verstärkte Apoptose erfolgt, während die Kontrollzellen eine verbesserte Überlebensrate aufzeigen. Der direkte Vergleich unstimulierter und nikotinbehandelter Zellen (++ und STS) zeigt hingegen keinen erkennbaren Unterschied.

Entsprechend des Flotillin-Knockdowns weisen die Covi-Zellen mehr Flotillin-2 als die Knockdown-Zellen auf. Zudem ist eine verminderte Expression von Flotillin-1 in den Flotillin-2 Knockdown-Zellen zu verzeichnen.

Flotillin-1 Knockdown-Zellen

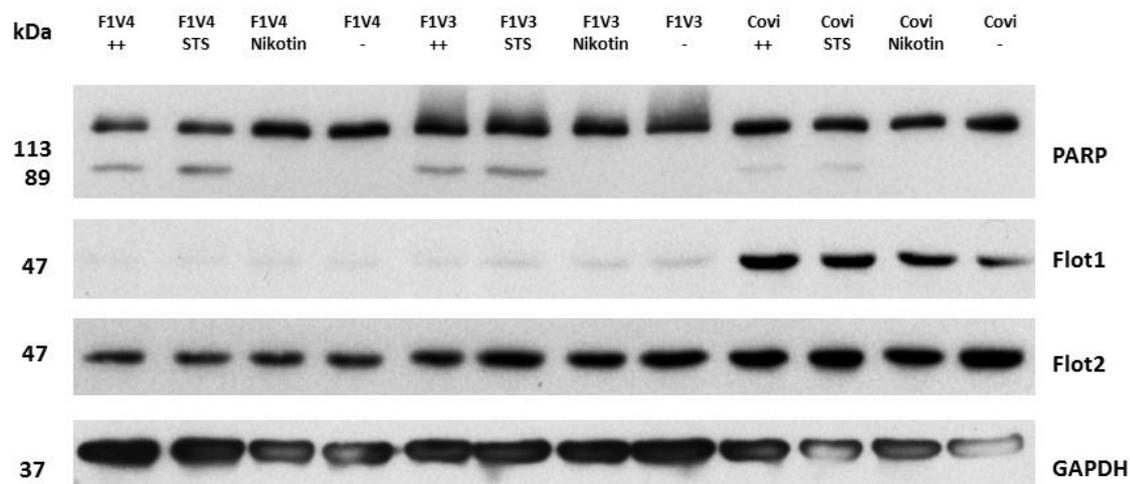


Abbildung 5: Western Blot der MCF-7 Flotillin-1 Knockdown-Zellen. Dargestellt ist das Ergebnis der Western Blot Analyse der Flotillin-1 Knockdown-Zellen (F1V3, F1V4). Es wurden die gleichen Antikörper wie in Abb. 4 verwendet.

Erneut zeigt sich, dass die Flotillin-depletierten Zellen im Vergleich zu den Covi-Zellen einen erhöhten Anteil des gespaltenen PARP aufweisen. Dies führt wiederum zu der Annahme, dass Zellen, welche mehr Flotillin enthalten, besser überleben. Ein protektiver Effekt des Nikotins ist auch hier nicht eindeutig zu verzeichnen.

Als Kontrolle des Knockdowns ist wieder ein höherer Flotillin-1-Anteil in den Covi-Zellen im Vergleich zu den Flotillin-depletierten Zellen festzustellen. Jedoch ist nur eine geringfügige Reduktion des Flotillin-2 in den Flotillin-1 Knockdown-Zellen zu erkennen.

4.4 MTT Test

Zur Durchführung des MTT Tests wurden von allen MCF7-Zellen jeweils 6 Proben vorbereitet. Darunter Kontrollzellen, welche über 48 Stunden lediglich Ethanol erhielten. Weitere Zellen wurden über 48 Stunden mit 10 μM und 100 μM Nikotin stimuliert. Die übrigen Proben wurden in den letzten 4 Stunden zusätzlich mit STS behandelt.

Die photometrische Bestimmung des Farbumschlags von gelb nach violett zur Messung der Zellproliferation konnte keine eindeutigen Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen aufzeigen. Ein protektiver Effekt des Nikotins ist demzufolge auch hier auszuschließen.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Fotodokumentation nach Zugabe von MTT (Abb. 6 und 7). Zunächst sind alle Zellproben ohne STS Stimulation aufgeführt (MTT-Test 1, Abb. 6). Die Situation der Zellen ist annähernd miteinander vergleichbar, unabhängig davon, ob die Zellen mit Nikotin stimuliert oder ausschließlich mit Ethanol behandelt wurden. Auch die unterschiedlichen Nikotinkonzentrationen scheinen sich nicht auf den Zustand der Zellen auszuwirken.

Die nächste Abbildung zeigt die Situation der Zellen nach STS Stimulation (MTT-Test 2, Abb. 7). Im Vergleich zur Ausgangssituation ist der schädigende Effekt des Proteinkinase-Inhibitors sofort ersichtlich. Zudem lässt sich diskutieren, ob der Zustand der Knockdown-Zellen gegenüber dem der Covi-Zellen entsprechend der Western Blot Ergebnisse verschlechtert ist. Der direkte Vergleich der Kontrollzellen und Nikotin-behandelter Zellen zeigt ebenfalls keinen eindeutigen Unterschied.

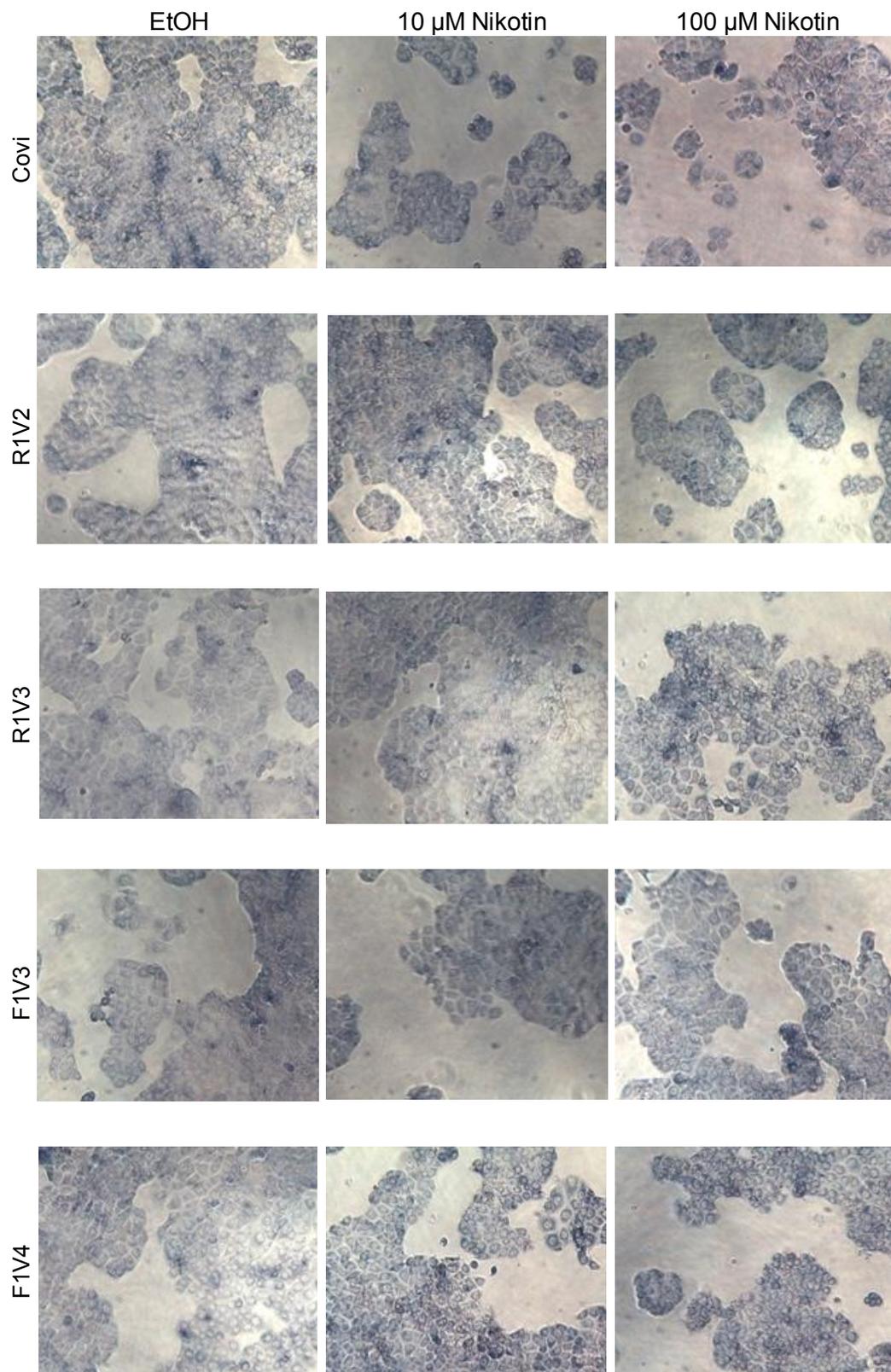


Abbildung 6: Fotodokumentation MTT-Test 1. Dargestellt sind die Kontrollzellen (EtOH) und Nikotin stimulierte Zellen (10 μ M und 100 μ M).

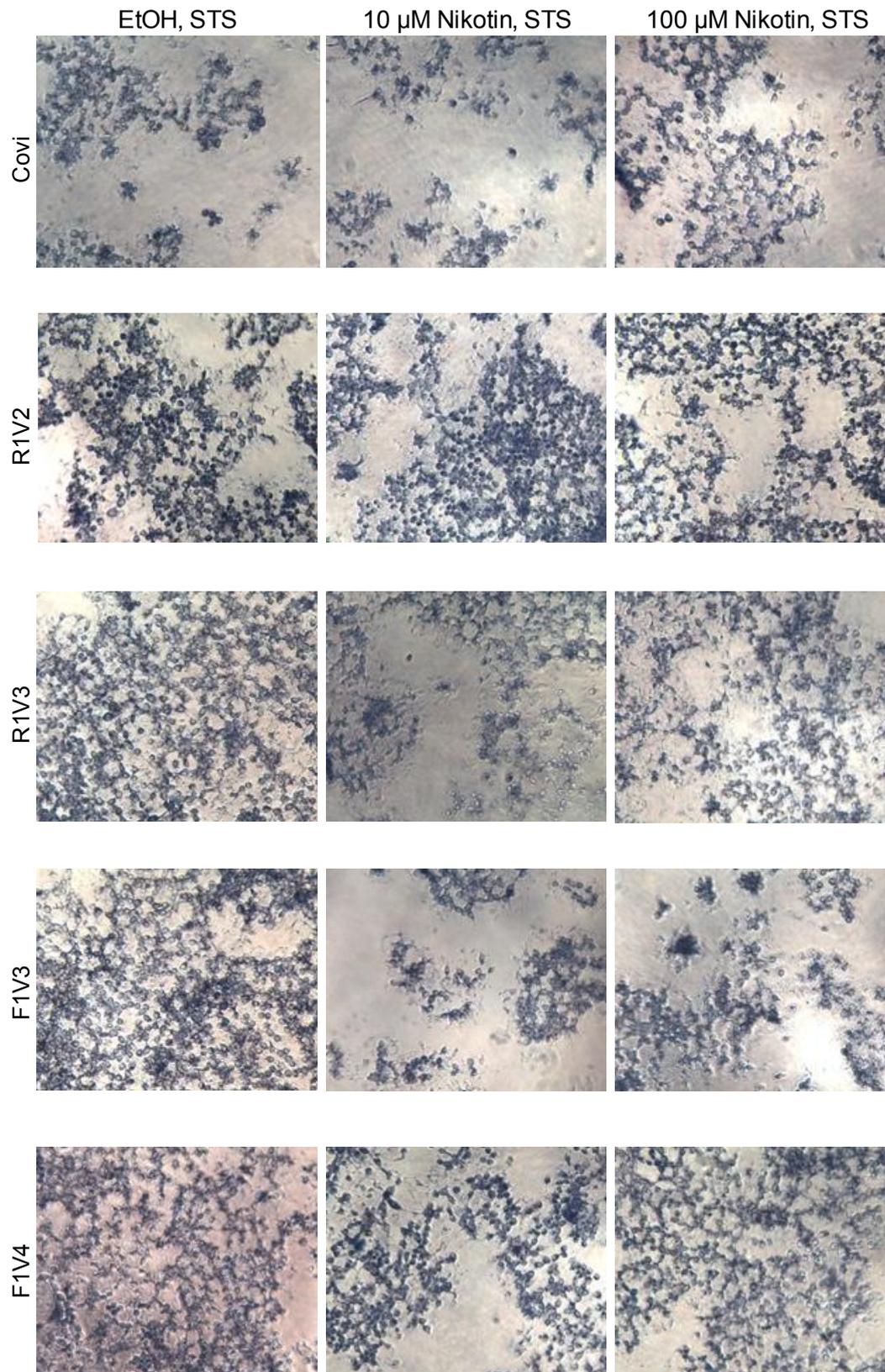


Abbildung 7: Fotodokumentation MTT-Test 2. Dargestellt sind erneut die Kontrollzellen (EtOH) und Nikotin stimulierte Zellen (10 μ M und 100 μ M) jeweils nach 4-stündiger STS Behandlung.

4.5 MCF 10A: STS Zeitreihe

Nach Abschluss der MCF-7 Versuchsreihe wurden die gleichen Experimente mit nicht-malignen MCF10A Brustepithelzellen fortgeführt. Zunächst wurden die Zellen über verschiedene Zeitintervalle mit STS behandelt. Die Stimulationsdauer lag hierbei zwischen 1-4 Stunden. Die Ergebnisse der Zeitreihe wurden erneut fotodokumentarisch festgehalten. Die weitere Auswertung erfolgte ebenfalls mittels Western Blot Analyse.

4.5.1 Fotodokumentation

Die Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse der Fotodokumentation behandelter MCF10A Zellen. Die Kontrollzellen (Covi) sind im Vergleich zu den Knockdown-Zellen (F1V3, R1V2) aufgeführt. Die Ausgangssituation zeigt unstimulierte Zellen (-). Zudem ist der Zustand der Zellen nach zwei Stunden und nach vier Stunden STS-Behandlung dargestellt. Ähnlich wie bei der MCF-7 Zeitreihe sind schon nach kurzer Behandlungsdauer erste Auswirkungen des Staurosporins festzustellen. Nach einer Behandlungsdauer von 4 Stunden sind die Zellen bereits fortschreitend geschädigt. Weiterhin führt der Vergleich der MCF10A Wildtypzellen mit den Knockdown-Zellen erneut zu der Annahme, dass der Zustand Flotillin-depletierter Zellen gegenüber dem der Covi-Zellen verschlechtert ist. Im Verlauf der MCF10A Versuchsreihe zeigte sich zudem, dass die Zellen gegenüber den MCF-7 Zellen anfälliger sind und schneller sterben.

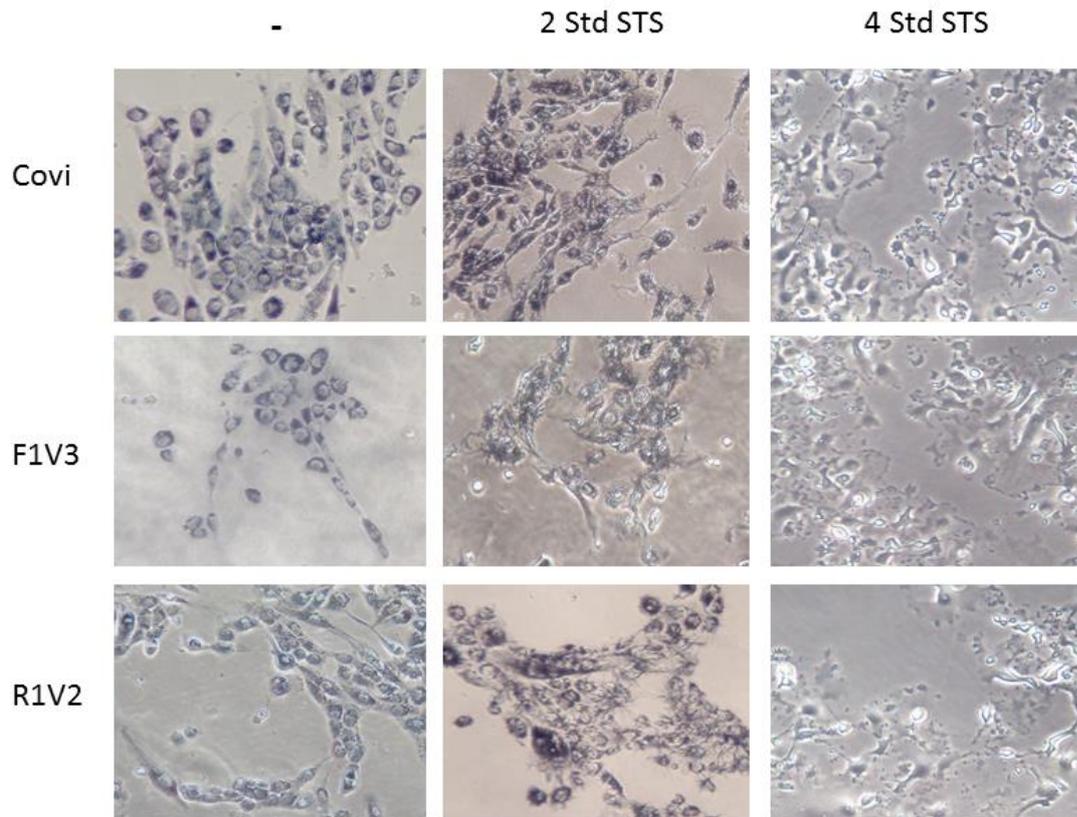


Abbildung 8: Fotodokumentation der STS-Zeitreihe behandelter MCF10A Zellen. Im Vergleich dargestellt sind die Kontrollzellen (Covi), Flotillin-1 Knockdown-Zellen (F1V3) und Flotillin-2 Knockdown-Zellen (R1V2) nach 2-stündiger (2 Std STS) und 4-stündiger STS-Behandlung (4 Std STS) gegenüber unbehandelten Zellen (-).

4.5.2 Western Blot Ergebnisse der STS Zeitreihe

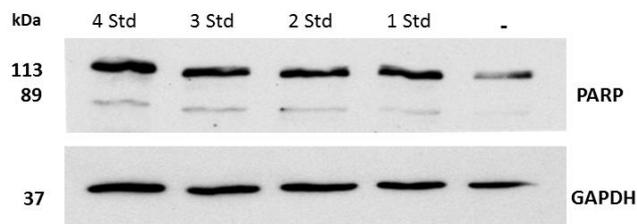


Abbildung 9: Western Blot der STS Zeitreihe von MCF10A Covi-Zellen.

Die Abbildung 9 zeigt das Ergebnis der Western Blot-Analyse der MCF10A Covi-Zellen nach erfolgter STS-Behandlung. Gut erkennbar ist, dass bereits nach 1-stündiger STS-Behandlung eine Proteolyse des PARP als Zeichen der Apoptose erfolgt. Obwohl die MCF10A Zellen verstärkt auf das Chemotherapeutikum reagieren, wurde die STS-Behandlungsdauer nachfolgend erneut auf 4 Stunden festgelegt.

4.6 MCF10A: Knockdown-Zellen

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen die Ergebnisse der MCF10A Western Blot Analyse. Es wurden wieder jeweils 4 Proben vorbereitet:

1. Kontrollzellen (-)
2. Stimulation mit 100 μM Nikotin über 48 Stunden (Nikotin)
3. Behandlung mit 1 μM STS über 4 Stunden (STS)
4. Stimulation mit 100 μM Nikotin über 48 Stunden und 1 μM STS in den letzten 4 Stunden (++)

Es wurden die gleichen Antikörper verwendet wie in der MCF-7 Versuchsreihe.

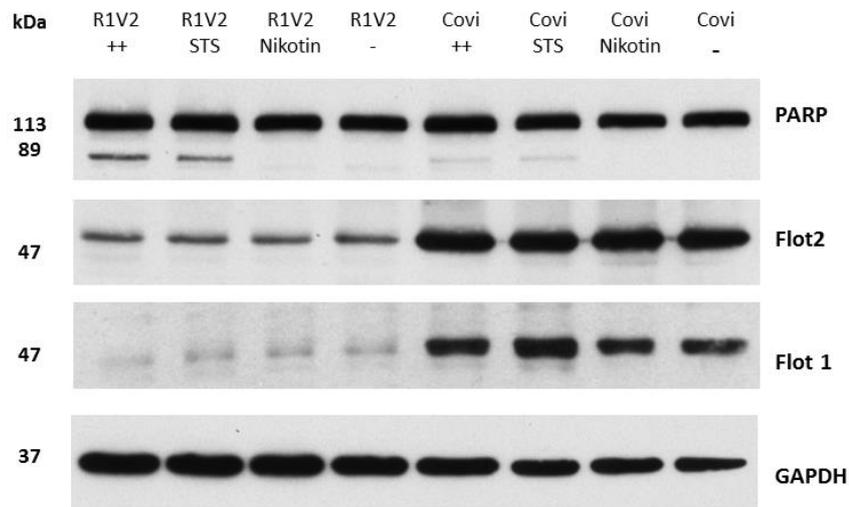
Flotillin-2 Knockdown-Zellen

Abbildung 10: Western Blot der MCF10A Flotillin-2 Knockdown-Zellen. Dargestellt sind die Kontrollzellen (Covi) im Vergleich zu den Flotillin-2 Knockdown-Zellen (R1V2). Die experimentellen Details stimmen mit Abb. 4 und 5 überein.

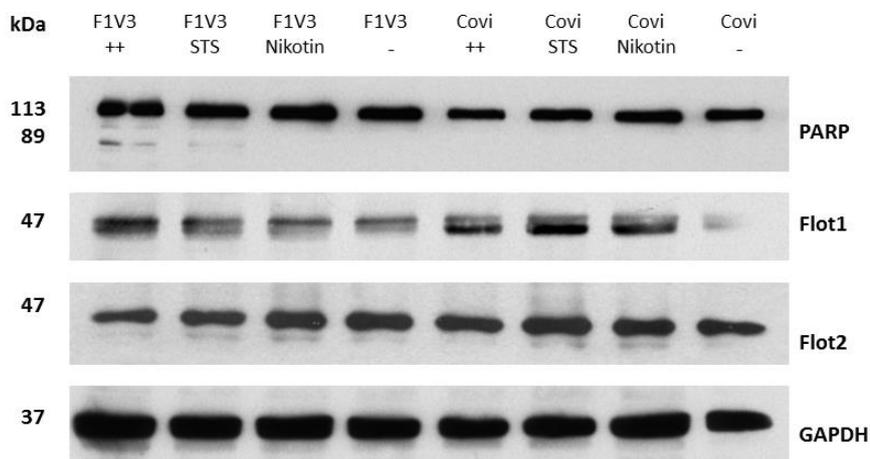
Flotillin-1 Knockdown-Zellen

Abbildung 11: Western Blot der MCF10A Flotillin-1 Knockdown-Zellen. Die verwendeten Antikörper und experimentellen Details sind identisch mit Abb. 4, 5 und 10.

Die Auswertung der Western Blot Ergebnisse Flotillin-1 und Flotillin-2 depletierter Zellen ist vergleichbar mit den Ergebnissen der MCF-7-Versuchsreihe. Anhand der Spaltprodukte von PARP zeigt sich, dass in den Flotillin-Knockdown-Zellen eine ver-

stärkte Apoptose im Vergleich zu den Covi-Zellen abläuft. Erneut ist eine verminderte Expression von Flotillin-1 in Flotillin-2 Knockdown-Zellen festzustellen, während die Flotillin-1 Depletion lediglich eine unmerkliche Reduktion von Flotillin-2 hervorruft. Dies unterstreicht die bereits gewonnenen Erkenntnisse, dass Flotillin-1 stärker von der Anwesenheit des Flotillin-2 abhängig ist als umgekehrt²¹.

Insgesamt lässt sich sagen, dass ein protektiver Effekt des Nikotins in den erfolgten Versuchen nicht nachzuweisen ist. Demgegenüber ist jedoch wiederholt ein Einfluss der Flotilline auf das Überleben der Zellen festzustellen. Flotillin-depletierte Zellen reagieren anfälliger auf das Chemotherapeutikum und sterben schneller, während ein hoher Flotillin-Anteil zu einer verzögerten Apoptose führt, sodass diese vergleichsweise besser überleben.

5 Diskussion

Mehrere Studien zeigen einen Einfluss des Nikotins auf die Genexpression sowie das Überleben von Zellen. Nikotin ist in der Lage, das Wachstum von Tumorzellen und die Metastasenbildung zu fördern und eine Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Agenzien aufzubauen^{89,90,114,115}. Die Interaktion des Nikotins mit nikotinischen Acetylcholinezeptoren ermöglicht unter anderem die Aktivierung intrazellulärer Signalwege, welche häufig in der Regulation der Zelladhäsion, -migration und -invasion involviert sind^{90,114}. Darunter wird Nikotin beispielsweise mit der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt und MAP-Kinase in Verbindung gebracht^{114,116}. Daneben führt Nikotin durch Aktivierung nAChRs zu Änderungen der Genexpression, was wiederum die Regulation des Zellzyklus und der Apoptose beeinflusst⁹⁰. Über $\alpha 9$ nAChR induziert Nikotin beispielsweise die Transkription von Galectin-3, welches seinerseits die Apoptose in Krebszellen supprimiert⁸⁹. Somit ist Nikotin in der Lage, das Überleben von Krebszellen zu verbessern und diese vor chemotherapeutisch induzierter Apoptose zu schützen.

Neben Nikotin werden auch Flotilline vermehrt mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht und deren Überexpression mit einer verstärkten Zellproliferation und Metastasierung von Zellen assoziiert^{34,35,37}. In diesem Zusammenhang konnte zudem ein Einfluss der Flotilline auf die Expression nikotinischer Acetylcholinrezeptoren in Brustkrebszellen belegt werden¹¹⁷. So sind in MCF-7 und MCF-10A Zellen hauptsächlich die nikotinischen Rezeptoren $\alpha 5$ und $\beta 1$ vorhanden. $\beta 1$ scheint dabei in Flotillin-Knockdown-Zellen vermindert zu sein, was wiederum einen Einfluss der Flotilline auf die Transkription nikotinischer Rezeptoren annehmen lässt¹¹⁷.

Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, inwieweit die durch Nikotin verursachten Veränderungen der Genexpression in Brustkrebszellen von den Proteinen der Flotillin-Familie abhängig sind. Weiterhin sollten die Effekte des Nikotins und der Flotilline auf apoptotische Zellen analysiert werden.

5.1 Nikotin verursachte Änderungen der Genexpression in Brustkrebszellen

Zur Untersuchung nikotinbedingter Änderungen der Genexpression in Brustkrebszellen wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Aktivität ausgewählter Proliferationsgene nach Nikotinstimulation mittels qPCR gemessen. Frühere Studien beschreiben bereits, dass Nikotin die Zellproliferation und -migration von Brustkrebszellen fördert und Änderungen der Genexpression induzieren kann^{89,118}. Diese Effekte werden überwiegend durch Aktivierung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren vermittelt. In MCF7 und MCF10A Brustkrebszellen konnten verschiedene Untereinheiten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren nachgewiesen werden. Darunter werden vor allem $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 1$ und $\beta 2$ Untereinheiten nAChRs exprimiert^{117,119,120}. Die Überexpression von $\alpha 7$ nAChRs und $\alpha 9$ nAChRs wird zudem mit der malignen Entartung von Brustepithelzellen, erhöhter Zellproliferation und der Progression von Brustkrebs in Verbindung gebracht^{89,90,98,119,120}. Ein Knockdown von Flotillin-1 und Flotillin-2 führt dabei zur Expressionsminderung der $\beta 1$ und $\beta 4$ Unterheiten nAChRs, sodass davon auszugehen ist, dass die Transkription dieser Rezeptoren von den Flotillinen beeinflusst wird¹¹⁷.

Die vorliegende Arbeit konnte die durch Nikotin beschriebenen Effekte nicht eindeutig belegen. So konnte nach Nikotinexposition kein Einfluss auf die Transkription bestimmter Proliferationsgene nachgewiesen werden. Auch der Vergleich der Kontrollzellen mit nikotinbehandelten Zellen zeigte nach STS Behandlung keine eindeutigen Unterschiede. Dabei ist jedoch die Expressionsminderung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren in Flotillin-Knockdown-Zellen zu berücksichtigen, welche ursächlich für den fehlenden Nikotineffekt in diesen Zellen sein könnte.

Bezugnehmend auf die in dieser Arbeit angewandten Methoden wäre eine Änderung der Inkubationszeiten denkbar. Die Stimulationszeit mit Nikotin lag zwischen 24 und 48 Stunden. Möglicherweise würde eine Kultivierung der Zellen unter Dauernikotinbehandlung Unterschiede zeigen. Weiterhin wäre die Quantifizierung der Western Blot Banden zu erwägen, um den relativen Anteil des gespaltenen Apoptosemarkers nikotin-stimulierter und unstimulierter Zellen nach STS Behandlung vergleichen und auswerten zu können. Da der MTT-Test zur Messung der Zellproliferation keine eindeutigen Unterschiede zwischen nikotinstimulierten und unstimulierten Zellen aufzeigen konnte,

wäre alternativ ein Wundheilungsassay zur Messung der Zellmigration nach Nikotin-stimulation, wie in vergleichbaren Studien⁸⁹, denkbar. Insgesamt konnte ein klarer Effekt des Nikotins auf das Überleben der Zellen unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen jedoch ausgeschlossen werden.

5.2 Einfluss von Flotillinen auf die Überlebensrate von Brustkrebszellen

In der vorliegenden Arbeit konnte wiederholt ein Einfluss der Flotilline auf die Überlebensrate der Brustkrebszellen festgestellt werden. Es zeigte sich, dass ein hoher Flotillin-Anteil protektiv auf die Brustkrebszellen wirkt. Demgegenüber reagierten die Flotillin-Knockdown-Zellen anfälliger auf den Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin. Sowohl die malignen MCF-7 Knockdown-Zellen als auch nicht-malignen MCF10A Knockdown-Zellen wiesen nach STS Behandlung einen erhöhten Anteil des gespaltenen Apoptosemarkers PARP im Vergleich zu den Kontrollzellen auf (vgl. Abschnitt 4.3 und 4.6).

Diese Ergebnisse knüpfen an frühere Studien an, welche bereits eine erhöhte Sensibilität Flotillin-depletierter Zellen auf chemotherapeutische Agenzien belegen konnten¹²¹. In humanen Keratinozyten (HaCaT) und humanen Zervixkarzinom Zellen (HeLa) war nach STS Behandlung Flotillin-depletierter Zellen beispielsweise ein erhöhter Anteil des gespaltenen Apoptosemarkers Caspase-3 im Vergleich zu den Kontrollzellen festzustellen. In MCF-7 Zellen konnte ein erhöhter Anteil eines weiteren Apoptosemarkers (Spaltfragment des Proteins GGA3) detektiert werden. Auch die Anwendung weiterer Chemotherapeutika konnte vergleichbare Ergebnisse aufzeigen. Die Neuroblastomzellen shRNA Flotillin-1 und shRNA Flotillin-2 wiesen eine erhöhte Sensitivität gegenüber den Chemotherapeutika Doxorubicin und Carboplatin im Vergleich zu den SH-SY5Y Kontrollzellen auf. Auch nach Behandlung mit dem Zytostatikum Paclitaxel war in den Kontrollzellen im Vergleich zu den Flotillin-Knockdown-Zellen eine verzögerte Apoptose festzustellen¹²¹. Somit scheinen Flotilline entscheidend für das Überleben von Zellen zu sein. Flotillin-depletierete Zellen weisen wiederum eine vergleichsweise geringe Resistenz gegenüber Chemotherapeutika auf. Ursächlich hierfür scheint die Deregulation anti-apoptotischer Proteine sowie Inaktivierung bestimmter Signalwege, wie beispielsweise den Akt und MAPK/ERK Signalweg unter Abwesenheit von Flotillinen zu sein^{29,86,121}. Die Überexpression von Flotillinen wird zudem vermehrt mit der Tumorge-

nese verschiedener Krebsarten assoziiert³⁴⁻³⁷, dessen Ursache noch nicht ausreichend geklärt ist.

Demzufolge sind Flotilline im Rahmen der Krebstherapie von besonderem Interesse. Eine gezielte Beeinflussung der Flotillin-Funktion könnte beispielsweise die Sensitivität von Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika erhöhen und den Behandlungserfolg somit verbessern.

5.3 Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert erste Hinweise auf Flotillin-verursachte Veränderungen apoptotischer Zellen. Während die beschriebenen Versuche ausschließlich mit Flotillin-Knockdown-Zellen durchgeführt wurden, ist weiterhin zu überlegen, Untersuchungen in komplett Flotillin-freien Systemen durchzuführen. Flotillin-lose Zellen lagen zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit nicht vor, jedoch sind diese mittels CRISPR/Cas mittlerweile relativ leicht herzustellen. Mithilfe dieser Methode des Genome Editings lassen sich bestimmte DNA Sequenzen gezielt modifizieren. Dabei wäre von Interesse, inwieweit sich das vollständige Fehlen von Flotillinen auf das Überleben der Zellen auswirkt. Aus nicht publizierten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe geht bereits hervor, dass Flotillin-lose Zellen nach STS Behandlung im Vergleich zu den Kontrollzellen wesentlich schneller sterben. Im lebenden Gesamtorganismus werden diese Veränderungen jedoch durch kompensatorische Effekte ausgeglichen.

Zudem ist eine systematische Vorgehensweise anzudenken, welche beispielsweise eine genauere Untersuchung von DNA-Reparaturenzymen oder Mitochondrien umfasst. Daran anknüpfend ist statt des Proteinkinase-Inhibitors Staurosporin, welcher ein vergleichsweise breites Wirkspektrum besitzt, die Anwendung von alternativen Chemotherapeutika mit spezifischer Wirkung zu erwägen.

6 Zusammenfassung

Nikotin gilt als Risikofaktor bei der Entstehung und Progression verschiedener humaner Krebsarten. Mehrere Studien beschreiben, dass Nikotin zu Änderungen der Genexpression in Krebszellen führt, wodurch diese resistenter gegenüber chemotherapeutischen Substanzen werden und eine verbesserte Überlebensrate aufweisen. Neben Nikotin werden auch Flotilline vermehrt mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht und deren Überexpression mit der Metastasierung von Zellen sowie einer schlechteren Überlebensprognose assoziiert.

Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, inwiefern die durch Nikotin verursachten Änderungen der Genexpression von den Proteinen der Flotillin-Familie abhängig sind. Dazu wurde mittels quantitativer *Real-Time*-Polymerase-Kettenreaktion die Genexpression ausgewählter Gene nach Nikotinstimulation gemessen. In malignen MCF-7 Adenokarzinomzellen der Brust und nicht-malignen MCF10A Brustepithelzellen wurde der Einfluss des Nikotins und der Flotilline auf Apoptose nach Staurosporin Behandlung untersucht und mittels Western Blot analysiert.

Insgesamt konnte kein eindeutiger Effekt des Nikotins unter den in dieser Arbeit vorliegenden Bedingungen belegt werden. Hingegen war wiederholt ein Einfluss der Flotilline auf das Überleben der Krebszellen festzustellen. Sowohl in malignen als auch nicht-malignen Brustkrebszelllinien zeigte sich, dass Flotillin-depletierte Zellen anfälliger auf Staurosporin reagieren und schneller sterben. Im Vergleich dazu verzögerte die Expression von Flotillinen die Apoptose, sodass diese Zellen besser überleben.

Die vorliegende Arbeit liefert erste Hinweise auf Flotillin-verursachte Änderungen apoptotischer Zellen. Diese Effekte sind dadurch zu erklären, dass unter Abwesenheit von Flotillinen die Aktivität zellproliferativer Signalwege (wie z.B. der PI3K/Akt Signalweg) reduziert wird und eine Deregulation anti-apoptotischer Proteine erfolgt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Fehlen von Flotillinen die Sensitivität der Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika erhöht. Dieses Erkenntnis könnte zukünftig in der Krebstherapie von Bedeutung sein, da eine gezielte Beeinflussung von Flotillinen den Behandlungserfolg positiv beeinflussen könnte.

7 Summary

Nicotine has been shown to promote cell proliferation and progression of various types of human cancer. Furthermore, nicotine is known to alter gene expression in cancer cells and abrogate the effect of chemotherapeutic agents by inhibiting apoptotic cell death. Besides nicotine, flotillins are also linked to tumorigenesis, and their overexpression is associated with metastasis formation and a poor survival prognosis.

The aim of this study was to investigate how the effects of nicotine are dependent on flotillin function. After nicotine stimulation, gene expression was analyzed by quantitative real time polymerase chain reaction. In malignant MCF-7 and non-malignant MCF10A breast cancer cells, the influence of flotillins and nicotine on apoptosis was examined after staurosporine treatment and analyzed by western blot.

Whereas a nicotine-dependent effect on the breast cancer cells could not be clearly demonstrated, it could be shown that flotillins have an influence on cell survival. In both malignant and non-malignant breast cancer cell lines, it was shown that flotillin-depleted cells are more susceptible to staurosporine and die faster. In contrast, control cells showed a higher resistance to chemotherapeutic-induced apoptosis and survived longer.

The present work underlines the flotillin-dependent effects on apoptotic cells. These effects can be explained by deregulation of signaling pathways that are important for cell proliferation upon flotillin depletion (such as the PI3K/Akt signaling pathway), resulting in inhibition of anti-apoptotic proteins.

In conclusion, the absence of flotillins increases the sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic substances. In the future, these findings could be important in cancer therapy, and modulation of flotillins might improve the success of chemotherapeutic treatment.

8 Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholin-Rezeptor
cDNA	Komplementäre DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
FGFR	Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor
Flot-1	Flotillin-1
Flot-2	Flotillin-2
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPCR	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor
HRP	Meerrettichperoxidase
HS	Pferdeserum
IGFR	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Rezeptor
kDa	Kilodalton
mAChR	Muskarinischer Acetylcholinrezeptor
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
nAChR	Nikotinischer Acetylcholinrezeptor
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PARP	Poly-(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PHB	Prohibitin-Homologie-Domäne
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
RIP	Rezeptor interagierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure

STS	Staurosporin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAILR	Tumornekrosefaktor-verwandter-Apoptose-induzierender-Ligand

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Auswertung der qPCR Vorversuche.....	26
Abbildung 2: Fotodokumentation der STS Zeitreihe stimulierter MCF-7 Zellen	27
Abbildung 3: Western Blot der STS Zeitreihe.....	29
Abbildung 4: Western Blot der MCF-7 Flotillin-2 Knockdown-Zellen.	30
Abbildung 5: Western Blot der MCF-7 Flotillin-1 Knockdown-Zellen.	31
Abbildung 6: Fotodokumentation MTT-Test 1	33
Abbildung 7: Fotodokumentation MTT-Test 2.	34
Abbildung 8: Fotodokumentation der STS-Zeitreihe stimulierter MCF10A Zellen.	36
Abbildung 9: Western Blot der STS Zeitreihe von MCF10A Covi-Zellen	37
Abbildung 10: Western Blot der MCF10A Flotillin-2 Knockdown-Zellen.	38
Abbildung 11: Western Blot der MCF10A Flotillin-1 Knockdown-Zellen.	38

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Materialien und Laborgeräte	11
Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien	12
Tabelle 3: Puffer und Lösungen	14
Tabelle 4: DNA Primer, zugehörige Sequenzen und Annealing-Temperaturen	15
Tabelle 5: Die verwendeten Primärantikörper	16
Tabelle 6: Die verwendeten Sekundärantikörper	16
Tabelle 7: Humane Zelllinien	16

11 Literaturverzeichnis

1. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572 (1997).
2. Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science (New York, N.Y.)* **327**, 46–50 (2010).
3. Bickel, P. E. *et al.* Flotillin and Epidermal Surface Antigen Define a New Family of Caveolae-associated Integral Membrane Proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 13793–13802 (1997).
4. Schulte, T., Paschke, K. A., Laessing, U., Lottspeich, F. & Stuermer, C. A. Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development (Cambridge, England)* **124**, 577–587 (1997).
5. Edgar, A. J. & Polak, J. M. Flotillin-1: gene structure: cDNA cloning from human lung and the identification of alternative polyadenylation signals. *The international journal of biochemistry & cell biology* **33**, 53–64 (2001).
6. Banning, A., Tomasovic, A. & Tikkanen, R. Functional aspects of membrane association of reggie/flotillin proteins. *Current protein & peptide science* **12**, 725–735 (2011).
7. Banning, A., Kurrle, N., Meister, M. & Tikkanen, R. Flotillins in receptor tyrosine kinase signaling and cancer. *Cells* **3**, 129–149 (2014).
8. Málaga-Trillo, E., Laessing, U., Lang, D. M., Meyer, A. & Stuermer, C. A. O. Evolution of duplicated reggie genes in zebrafish and goldfish. *Journal of molecular evolution* **54**, 235–245 (2002).
9. Glebov, O. O., Bright, N. A. & Nichols, B. J. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nature cell biology* **8**, 46–54 (2006).
10. Banning, A., Ockenga, W., Finger, F., Siebrasse, P. & Tikkanen, R. Transcriptional Regulation of Flotillins by the Extracellularly Regulated Kinases and Retinoid X Receptor Complexes. *PLOS ONE* **7**, e45514 (2012).

11. Liu, J., Deyoung, S. M., Zhang, M., Dold, L. H. & Saltiel, A. R. The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* **280**, 16125–16134 (2005).
12. Gkantiragas, I. *et al.* Spingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Molecular biology of the cell* **12**, 1819–1833 (2001).
13. Santamaria, A. *et al.* PTOV-1, a novel protein overexpressed in prostate cancer, shuttles between the cytoplasm and the nucleus and promotes entry into the S phase of the cell division cycle. *The American journal of pathology* **162**, 897–905 (2003).
14. Stuermer, C. A. *et al.* Glycosylphosphatidyl Inositol-anchored Proteins and fyn Kinase Assemble in Noncaveolar Plasma Membrane Microdomains Defined by Reggie-1 and -2. *Molecular biology of the cell* **12**, 3031–3045 (2001).
15. Gassart, A. de, Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G. & Vidal, M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* **102**, 4336–4344 (2003).
16. Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A. O. & Málaga-Trillo, E. Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins. Convergent evolution of the SPFH domain. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **63**, 343–357 (2006).
17. Browman, D. T., Hoegg, M. B. & Robbins, S. M. The SPFH domain-containing proteins. More than lipid raft markers. *Trends in cell biology* **17**, 394–402 (2007).
18. Tavernarakis, N., Driscoll, M. & Kyripides, N. C. The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends in biochemical sciences* **24**, 425–427 (1999).
19. Morrow, I. C. *et al.* Flotillin-1/Reggie-2 Traffics to Surface Raft Domains via a Novel Golgi-independent Pathway IDENTIFICATION OF A NOVEL MEMBRANE TARGETING DOMAIN AND A ROLE FOR PALMITOYLATION. *J. Biol. Chem.* **277**, 48834–48841 (2002).
20. Neumann-Giesen, C. *et al.* Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2. Role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *The Biochemical journal* **378**, 509–518 (2004).
21. Solis, G. P. *et al.* Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. *Biochemical Journal* **403**, 313–322 (2007).

22. Amaddii, M. *et al.* Flotillin-1/reggie-2 protein plays dual role in activation of receptor-tyrosine kinase/mitogen-activated protein kinase signaling. *The Journal of biological chemistry* **287**, 7265–7278 (2012).
23. Dermine, J.-F. *et al.* Flotillin-1-enriched Lipid Raft Domains Accumulate on Maturing Phagosomes. *J. Biol. Chem.* **276**, 18507–18512 (2001).
24. Neumann-Giesen, C., Fernow, I., Amaddii, M. & Tikkanen, R. Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton. *Journal of cell science* **120**, 395–406 (2007).
25. Babuke, T. & Tikkanen, R. Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *European journal of cell biology* **86**, 525–532 (2007).
26. Tomasovic, A., Traub, S. & Tikkanen, R. Molecular networks in FGF signaling. Flotillin-1 and cbl-associated protein compete for the binding to fibroblast growth factor receptor substrate 2. *PloS one* **7**, e29739 (2012).
27. Baumann, C. A. *et al.* CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* **407**, 202–207 (2000).
28. Babuke, T. *et al.* Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis. *Cellular signalling* **21**, 1287–1297 (2009).
29. Banning, A., Regenbrecht, C. R. A. & Tikkanen, R. Increased activity of mitogen activated protein kinase pathway in flotillin-2 knockout mouse model. *Cellular signalling* **26**, 198–207 (2014).
30. Kokubo, H., Lemere, C. A. & Yamaguchi, H. Localization of flotillins in human brain and their accumulation with the progression of Alzheimer's disease pathology. *Neuroscience Letters* **290**, 93–96 (2000).
31. Zhao, F., Zhang, J., Liu, Y.-S., Li, L. & He, Y.-L. Research advances on flotillins. *Virology Journal* **8**, 479 (2011).
32. James, D. J. *et al.* Skeletal Muscle of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats Exhibits Reduced Insulin-Stimulated Glucose Transport and Elevated Levels of Caveolin and Flotillin. *Diabetes* **50**, 2148–2156 (2001).

33. Rickman, D. S. *et al.* Prediction of future metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays. *Oncogene* **27**, 6607–6622 (2008).
34. Zhang, S.-H. *et al.* High Expression of FLOT1 Is Associated with Progression and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *PloS one* **8**, e64709 (2013).
35. Zhu, Z. *et al.* Flotillin2 Expression Correlates with HER2 Levels and Poor Prognosis in Gastric Cancer. *PloS one* **8**, e62365 (2013).
36. Hazarika, P. *et al.* Up-regulation of Flotillin-2 is associated with melanoma progression and modulates expression of the thrombin receptor protease activated receptor 1. *Cancer research* **64**, 7361–7369 (2004).
37. Wang, X. *et al.* Flotillin-2 is associated with breast cancer progression and poor survival outcomes. *Journal of translational medicine* **11**, 190 (2013).
38. Berger, T. *et al.* Flotillin-2 deficiency leads to reduced lung metastases in a mouse breast cancer model. *Oncogene* **32**, 4989–4994 (2013).
39. Lin, C. *et al.* Knockdown of FLOT1 impairs cell proliferation and tumorigenicity in breast cancer through upregulation of FOXO3a. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 3089–3099 (2011).
40. Banning, A. *et al.* Flotillins Regulate Focal Adhesions by Interacting with α -Actinin and by Influencing the Activation of Focal Adhesion Kinase. *Cells* **7** (2018).
41. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
42. Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 127–137 (2001).
43. Yarden, Y. & Pines, G. The ERBB network. At last, cancer therapy meets systems biology. *Nature reviews. Cancer* **12**, 553–563 (2012).
44. Kurrle, N. *et al.* Phosphatidylinositol 3-Kinase dependent upregulation of the epidermal growth factor receptor upon Flotillin-1 depletion in breast cancer cells. *BMC cancer* **13**, 575 (2013).

45. Hemmings, B. A. & Restuccia, D. F. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**, a011189 (2012).
46. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261–1274 (2007).
47. Samuels, Y. & Velculescu, V. E. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **3**, 1221–1224 (2004).
48. Samuels, Y. *et al.* High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science (New York, N.Y.)* **304**, 554 (2004).
49. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**, 239–257 (1972).
50. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* **35**, 495–516 (2007).
51. Fadeel, B., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochemical and biophysical research communications* **266**, 699–717 (1999).
52. Trump, B. F., Berezsky, I. K., Chang, S. H. & Phelps, P. C. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicologic pathology* **25**, 82–88 (1997).
53. Majno, G. & Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology* **146**, 3–15 (1995).
54. Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. The TNF and TNF receptor super-families: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487–501 (2001).
55. Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N.Y.)* **281**, 1305–1308 (1998).
56. Lavrik, I., Golks, A. & Krammer, P. H. Death receptor signaling. *Journal of cell science* **118**, 265–267 (2005).
57. Fulda, S. & Debatin, K.-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anti-cancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798–4811 (2006).

58. Kischkel, F. C. *et al.* Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal* **14**, 5579–5588 (1995).
59. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33–42 (2000).
60. Garrido, C. *et al.* Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell death and differentiation* **13**, 1423–1433 (2006).
61. van Loo, G. *et al.* The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell death and differentiation* **9**, 20–26 (2002).
62. Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M. & Martin, S. J. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO journal* **23**, 2134–2145 (2004).
63. Schimmer, A. D. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer research* **64**, 7183–7190 (2004).
64. Joza, N. *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549–554 (2001).
65. Li, L. Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95–99 (2001).
66. Cory, S. & Adams, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews. Cancer* **2**, 647–656 (2002).
67. Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**, 334–336 (1990).
68. Hsu, Y. T., Wolter, K. G. & Youle, R. J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 3668–3672 (1997).

69. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. & Korsmeyer, S. J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**, 619–628 (1996).
70. Lavrik, I. N., Golks, A. & Krammer, P. H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *The Journal of clinical investigation* **115**, 2665–2672 (2005).
71. Slee, E. A., Adrain, C. & Martin, S. J. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **276**, 7320–7326 (2001).
72. Wessler, I., Kirkpatrick, C. J. & Racké, K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems. Expression and function in humans. *Pharmacology & Therapeutics* **77**, 59–79 (1998).
73. Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., Unger, R. & Kirkpatrick, C. J. The non-neuronal cholinergic system in humans. Expression, function and pathophysiology. *Life Sciences* **72**, 2055–2061 (2003).
74. Wessler, I. & Kirkpatrick, C. J. Acetylcholine beyond neurons. The non-neuronal cholinergic system in humans. *British journal of pharmacology* **154**, 1558–1571 (2008).
75. Wess, J. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Critical reviews in neurobiology* **10**, 69–99 (1996).
76. Caulfield, M. P. & Birdsall, N. J. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacological reviews* **50**, 279–290 (1998).
77. Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C. & Ullrich, A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379**, 557–560 (1996).
78. Bonner, T., Buckley, N., Young, A. & Brann, M. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* **237**, 527–532 (1987).
79. Bonner, T. I., Young, A. C., Bran, M. R. & Buckley, N. J. Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* **1**, 403–410 (1988).

80. Jones, S. V., Heilman, C. J. & Brann, M. R. Functional responses of cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Molecular pharmacology* **40**, 242–247 (1991).
81. Nahorski, S. R., Tobin, A. B. & Willars, G. B. Muscarinic M3 receptor coupling and regulation. *Life Sciences* **60**, 1039–1045 (1997).
82. Alea, M. P., Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Fuxe, K. & Garriga, P. Differential expression of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in Jurkat cells and their signaling. *Journal of neuroimmunology* **237**, 13–22 (2011).
83. Daub, H., Wallasch, C., Lanckenau, A., Herrlich, A. & Ullrich, A. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *The EMBO journal* **16**, 7032–7044 (1997).
84. Luttrell, L. M., Della Rocca, G. J., van Biesen, T., Luttrell, D. K. & Lefkowitz, R. J. G $\beta\gamma$ Subunits Mediate Src-dependent Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor A SCAFFOLD FOR G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR-MEDIATED Ras ACTIVATION. *J. Biol. Chem.* **272**, 4637–4644 (1997).
85. Yoon, S. & Seger, R. The extracellular signal-regulated kinase. Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors (Chur, Switzerland)* **24**, 21–44 (2006).
86. Meister, M., Tomasovic, A., Banning, A. & Tikkanen, R. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins. A Recount. *International journal of molecular sciences* **14**, 4854–4884 (2013).
87. Lukas, R. J. *et al.* International Union of Pharmacology. XX. Current Status of the Nomenclature for Nicotinic Acetylcholine Receptors and Their Subunits. *Pharmacol Rev* **51**, 397–401 (1999).
88. Jaldety, Y. *et al.* Sperm epidermal growth factor receptor (EGFR) mediates $\alpha 7$ acetylcholine receptor (AChR) activation to promote fertilization. *The Journal of biological chemistry* **287**, 22328–22340 (2012).
89. Guha, P. *et al.* Nicotine promotes apoptosis resistance of breast cancer cells and enrichment of side population cells with cancer stem cell-like properties via a signaling cascade involving galectin-3, $\alpha 9$ nicotinic acetylcholine receptor and STAT3. *Breast cancer research and treatment* **145**, 5–22 (2014).

90. Grando, S. A. Connections of nicotine to cancer. *Nature Reviews Cancer* **14**, 419 (2014).
91. Sorimachi, M., Nishimura, S. & Yamagami, K. Inability of Ca²⁺ influx through nicotinic ACh receptor channels to stimulate catecholamine secretion in bovine adrenal chromaffin cells: studies with fura-2 and SBFI microfluorometry. *The Japanese journal of physiology* **44**, 343–356 (1994).
92. Carlisle, D. L. *et al.* Nicotine activates cell-signaling pathways through muscle-type and neuronal nicotinic acetylcholine receptors in non-small cell lung cancer cells. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* **20**, 629–641 (2007).
93. Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., Jolkovsky, D. L., Pinkerton, K. E. & Grando, S. A. Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of alpha7 nicotinic receptor in oral keratinocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**, 2093–2101 (2006).
94. Nishioka, T. *et al.* Sensitization of epithelial growth factor receptors by nicotine exposure to promote breast cancer cell growth. *Breast cancer research : BCR* **13**, R113 (2011).
95. Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., Jolkovsky, D. L., Pinkerton, K. E. & Grando, S. A. Receptor-mediated tobacco toxicity: acceleration of sequential expression of alpha5 and alpha7 nicotinic receptor subunits in oral keratinocytes exposed to cigarette smoke. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**, 1356–1368 (2008).
96. Maneckjee, R. & Minna, J. D. Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *PNAS* **87**, 3294–3298 (1990).
97. Schuller, H. M., Plummer, H. K. & Jull, B. A. Receptor-mediated effects of nicotine and its nitrosated derivative NNK on pulmonary neuroendocrine cells. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* **270**, 51–58 (2003).
98. Singh, S., Pillai, S. & Chellappan, S. Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis. *Journal of oncology* **2011**, 456743 (2011).

99. Dunckley, T. & Lukas, R. J. Nicotinic modulation of gene expression in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain research* **1116**, 39–49 (2006).
100. Zhang, S., Day, I. N. & Ye, S. Microarray analysis of nicotine-induced changes in gene expression in endothelial cells. *Physiological genomics* **5**, 187–192 (2001).
101. Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Vetter, D. E. & Grando, S. A. Central role of alpha9 acetylcholine receptor in coordinating keratinocyte adhesion and motility at the initiation of epithelialization. *Experimental cell research* **313**, 3542–3555 (2007).
102. Nishioka, T. *et al.* Nicotine Overrides DNA Damage-Induced G1/S Restriction in Lung Cells. *PLOS ONE* **6**, e18619 (2011).
103. Dasgupta, P. *et al.* Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and survivin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6332–6337 (2006).
104. Mai, H., May, W. S., Gao, F., Jin, Z. & Deng, X. A functional role for nicotine in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **278**, 1886–1891 (2003).
105. Jin, Z., Gao, F., Flagg, T. & Deng, X. Nicotine induces multi-site phosphorylation of Bad in association with suppression of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **279**, 23837–23844 (2004).
106. Junhui, Z. *et al.* Nicotine-reduced endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity via the PI3K/Akt pathway. *Cytotherapy* **11**, 485–491 (2009).
107. Gergalova, G. *et al.* Mitochondria express alpha7 nicotinic acetylcholine receptors to regulate Ca²⁺ accumulation and cytochrome c release: study on isolated mitochondria. *PloS one* **7**, e31361 (2012).
108. Kalashnyk, O. M., Gergalova, G. L., Komisarenko, S. V. & Skok, M. V. Intracellular localization of nicotinic acetylcholine receptors in human cell lines. *Life Sciences* **91**, 1033–1037 (2012).
109. Kurrle, N. *et al.* Flotillins directly interact with γ -catenin and regulate epithelial cell-cell adhesion. *PloS one* **8**, e84393 (2013).

110. Xue, L.-y., Chiu, S.-m. & Oleinick, N. L. Staurosporine-induced death of MCF-7 human breast cancer cells. A distinction between caspase-3-dependent steps of apoptosis and the critical lethal lesions. *Experimental cell research* **283**, 135–145 (2003).
111. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**, research0034.1-research0034.11 (2002).
112. Abbas, T. & Dutta, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature reviews. Cancer* **9**, 400–414 (2009).
113. Alao, J. P. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Molecular cancer* **6**, 24 (2007).
114. Guo, J. *et al.* Nicotine promotes mammary tumor migration via a signaling cascade involving protein kinase C and CDC42. *Cancer research* **68**, 8473–8481 (2008).
115. Nishioka, T. *et al.* Nicotine, through upregulating pro-survival signaling, cooperates with NNK to promote transformation. *Journal of cellular biochemistry* **109**, 152–161 (2010).
116. Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., Jolkovsky, D. L., Pinkerton, K. E. & Grando, S. A. Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of alpha7 nicotinic receptor in oral keratinocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**, 2093–2101 (2006).
117. Bocksberger, Simone: Expression von Acetylcholinrezeptoren in humanen Epithelzellen - Einfluss von Flotillin-1 und -2 auf die Expression von Acetylcholinrezeptoren in humanen Keratinozyten und Brustkrebszellen. *Dissertation*, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2017.
118. Dasgupta, P. *et al.* Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *International journal of cancer* **124**, 36–45 (2009).
119. Kalantari-Dehaghi, M., Parnell, E. A., Armand, T., Bernard, H.-U. & Grando, S. A. The nicotinic acetylcholine receptor-mediated reciprocal effects of the tobacco

- nitrosamine NNK and SLURP-1 on human mammary epithelial cells. *International immunopharmacology* **29**, 99–104 (2015).
120. Lee, C.-H. *et al.* Overexpression and activation of the alpha9-nicotinic receptor during tumorigenesis in human breast epithelial cells. *Journal of the National Cancer Institute* **102**, 1322–1335 (2010).
121. John, B. A. Function of flotillins in Alzheimer's disease and apoptosis. *PhD thesis*, Goethe-Universität Frankfurt (2014).

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zur Umsetzung und Fertigstellung dieser Dissertation beigetragen und mich unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und die überaus engagierte Betreuung.

Ganz herzlichen Dank an Dr. Antje Banning für die großartige Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Ich bedanke mich für die vielen wertvollen Ratschläge und motivierenden Gespräche.

Weiterhin möchte ich mich bei Petra und Ralf und allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Tikkanen für die Hilfe bei der Einarbeitung und Durchführung laborexperimenteller Methoden sowie die herzliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund für den unermüdlichen Rückhalt während und nach meiner Studienzeit. Ich danke euch von Herzen für euer Verständnis und die vielen motivierenden und aufheiternden Worte.