

Analyse der Rolle von onkogenem K-Ras und TGF β 1 in der EMT-assoziierten Genregulation des NSCLC

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

vorgelegt von Lea Sophie Henrich
aus Siegen

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Aus der Professur für Molekulare Onkologie solider Tumore, Klinik für Innere Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Andre Menke

2. Gutachter: Prof. Dr. Attila Németh

Tag der Disputation: 14.07.2025

INHALT

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIII
TABELLENVERZEICHNIS	XV
1. EINLEITUNG	1
1.1 Lungenkarzinom	1
1.2 Die Rolle der epithelial-mesenchymalen Transition in der Karzinogenese	3
1.3 TGF β -vermittelte Signalwege und EMT-Transkriptionsfaktoren	5
1.4 Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in der EMT	7
1.5 Die Rolle von cis- und trans-wirkenden Faktoren bei der Genregulation	8
1.6 Zielsetzung	11
2. MATERIAL	13
2.1 Chemikalien	13
2.2 Lösungen und Puffer	13
2.3 Verbrauchsmaterialien	15
2.4 Geräte	15
2.5 Prokaryotische und eukaryotische Zellen	17
2.5.1 Escherichia coli Stämme	17
2.5.2 Eukaryotische Zelllinien	17
2.6 Enzyme, Marker und molekularbiologische Kits	17
2.7 Transfektionsreagenzien	18
2.8 Plasmide	18
2.8.1 Reporterplasmide	18

2.8.2 Expressionsplasmide	19
2.9 Kontrollreagenzien, Inhibitoren und Stimulanzen	20
2.10 Antikörper	21
2.10.1 Primäre Antikörper	21
2.10.2 Sekundäre Antikörper	22
2.11 Software	22
3. METHODEN	23
3.1 Zellbiologie	23
3.1.1 Kultivierung von humanen, adhärenen Zellen	23
3.1.2 Inhibition bzw. Stimulation von humanen, adhärenen Zellen	23
3.1.3 Transiente Luziferase-Transfektion von H1299 mit PEI	24
3.1.4 Transiente Luziferase-Transfektion von H23 und HCC-44 mit PEI	24
3.1.5 Transiente Luziferase-Transfektion von H358 mit Lipofektamine 3000	25
3.2 Proteinbiochemie	26
3.2.1 Herstellung von RIPA-Zelllysaten	26
3.2.2 Herstellung von Luziferase-Zelllysaten	26
3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure-Assay	26
3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	27
3.2.5 Western Blot	27
3.2.6 Proteinfärbung mittels spezifischer Antikörper und Proteindetektion mittels Chemilumineszenz und Nah-Infrarot-Lumineszenz	28
3.2.7 Dual Luziferase Reporter Assay	29
3.3 Mikrobiologische Methoden	30
3.3.1 Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> TOP10	30
3.4 Molekularbiologische Methoden	31
3.4.1 Isolation der Plasmid-DNA	31
3.4.2 Restriktionsverdau	31
3.4.3 Agarose-Gelelektrophorese	31
3.5 Statistik	31
4. ERGEBNISSE	32
4.1 Morphologische Betrachtung der verwendeten NSCLC-Zelllinien	32

4.2 Einfluss von Transkriptionsfaktoren und Kinasen auf die Regulation der Promotoraktivität von Reporterkonstrukten in der Zelllinie H1299	33
4.2.1 Nachweis der Proteinexpression in Luziferase-Lysaten	37
4.2.2 Einfluss von Transkriptionsfaktoren und Kinasen auf die Regulation der Reporter für Ets- und AP1-Bindungselemente	38
4.2.3 Einfluss von Transkriptionsfaktoren und Kinasen auf die Regulation der Reporter für den c-MYC- und Slug-Promotor und für NFκB- und C/EBP-Bindungselemente	40
4.2.4 Einfluss von Transkriptionsfaktoren und Kinasen auf die Regulation der Reporter für Promotoren der Zellzyklusproteine Cyclin D1 und p21Cip1	43
4.2.5 Analyse des Einflusses von Transkriptionsfaktoren und Kinasen auf die Aktivität des TCF-Reporters TOPflash sowie des Reporters mit Smad/TGFβ-Bindungselementen 3TP-Lux und des SRE-Reporters	44
4.2.6 Zusammenfassung Reporterassays H1299	46
4.3 Einfluss der K-Ras-Inhibition auf die Regulation der Promotoraktivitäten in der Zelllinie H358	47
4.3.1 Einfluss der K-Ras-Inhibition auf die Regulation der ERK1/2-Aktivität	48
4.3.2 Einfluss der K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Regulation der Promotoraktivität der Reporter für Ets- und AP1-Bindungselemente	49
4.3.3 Einfluss der K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Promotoraktivität der Reporter für c-MYC, NFκB, C/EBP sowie der Reporter für die EMT-Regulatoren Snail1 und Slug	50
4.3.4 Einfluss der K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Promotoraktivität der Reporter der Zellzyklusproteine Cyclin D1 und p21Cip1	51
4.3.4.1 Einfluss von TGFβ1 auf die Regulation der relativen Promotoraktivität des p21Cip1-Reporters unter K-Ras-Inhibition	52
4.3.5 Einfluss der K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Aktivität des TCF-Reporters TOPflash, des TGFβ1-sensitiven Smad-Reporters 3TP-Lux und des SRE-Reporters	53
4.3.6 Einfluss der K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Promotoraktivität der Reporter für die Gene der Zell-Zell-Kontakt-Adhäsionsproteine E-Cadherin, N-Cadherin und Claudin 1	54
4.4 Transkriptionelle Regulation der Promotoraktivität von E-Cadherin- und N-Cadherin-Reportern	55
4.5 Zusammenfassung Reporterassays H358	57
4.6 Einfluss der K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Regulation der Promotoraktivität von Reportern in den Zelllinien HCC-44 und H23	58

4.7 Rolle des Wnt-Signalwegs in der Metastasierung des NSCLC	61
5. DISKUSSION	64
5.1 Methodendiskussion	64
5.2 Genexpressionsanalyse der analysierten Transkriptionsfaktoren und Signalproteine in Lungenadenokarzinomen	68
5.3 Einfluss von TGFβ-assoziierten Signalproteinen auf EMT und Metastasierung	69
5.4 Einfluss von klassischen EMT-Transkriptionsfaktoren auf EMT und Metastasierung	71
5.5 Einfluss von Cut-like-Proteinen auf EMT und Metastasierung	73
5.6 Einfluss von ausgewählten Signalproteinen auf verwendete Zellzyklus-Reporter	74
5.7 Einfluss von K-Ras-Inhibition auf die verwendeten Reporter	75
6. ZUSAMMENFASSUNG	78
7. ABSTRACT	79
8. ANHANG	80
8.1 Einfluss von Transkriptionsfaktoren und Kinasen auf die Regulation der Reporter für MnSOD-, G6Pase- MMP9- und Snail1-Promotoren sowie des Transkriptionsfaktors NFAT	80
8.2 Einfluss der KRAS-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Regulation der relativen Promotoraktivität der MnSOD-, MMP9- und NFAT-Reporter	82
8.3 Einfluss der KRAS-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Regulation der Reporteraktivität von Ets-AP1, Ets, TOPflash, p21Cip1 und Claudin 1 in H23-Zellen	83
8.4 Beispielhafte Darstellung von Primärdaten der Luziferase Assays	83

9. LITERATURVERZEICHNIS	86
10. ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	107

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
Akt	Synonym für Proteinkinase B
<i>ALK</i>	<i>anaplastic lymphoma kinase</i> Gen
AP	Alkalische Phosphatase
AP1	Aktivator-Protein 1
<i>APC</i>	<i>adenomatous polyposis coli</i> Gen
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
<i>BRAF</i>	<i>B-rapidly accelerated fibrosarcoma</i> Gen
BSA	bovines Serumalbumin
C/EBP	CCAAT/ <i>Enhancer-Binding-Protein</i>
ca	konstitutiv aktiv
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCD	<i>charge-coupled device</i>
<i>CDH1</i>	Cadherin-1 Gen von E-Cadherin
<i>CDH2</i>	Cadherin-2 Gen von N-Cadherin
<i>CDKN1A</i>	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1A Gen von p21Cip1
ChIP-Analyse	Chromatin-Immunopräzipitations-Analyse
Chr.	Chromosom
CMF	Calcium-Magnesium-frei
c-Myc	zelluläres Myc
COSMIC	<i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding</i> Protein
Cut-like 1	Cut-like homeobox 1 Protein
Cut-like 2	Cut-like homeobox 2 Protein
<i>CUX1</i>	<i>Cut-like homeobox 1</i> Gen von Cut-like 1
<i>CUX2</i>	<i>Cut-like homeobox 2</i> Gen von Cut-like 2
DBE	<i>Daf-16 family binding element</i>
ddH ₂ O	<i>double distilled water</i>
dH ₂ O	<i>distilled water</i>

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
E-Box	<i>Enhancer-Box</i>
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
Ets	<i>erythroblast transformation specific</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FOXO3a	<i>Forkhead-Box-Protein O3a</i>
g	Gravitationsbeschleunigung 9,81m/s ²
G	Gauge
G1-Phase	<i>Gap 1-Phase</i>
G6Pase	Glucose-6-Phosphatase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
G-Protein	Guanosinnukleotid-bindendes Protein
GRE	<i>Glucocorticoide Responsive Element</i>
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
GSK-3 β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 beta
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<i>Her2/neu</i>	<i>human epidermal growth factor receptor/ neural type 2</i>
HRE	<i>hormone responsive element</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin G

IL-2	Interleukin-2
IRE	<i>iron response element</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten Rat Sarcoma</i> Gen
K-Ras G12C	<i>Kirsten Rat Sarcoma</i> Protein mit Austausch des Glycins an Position 12 gegen Cystein
l	Liter
LB-Medium	<i>Lysogeny-Broth</i> -Medium
Lef	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
LiCl	Lithiumchlorid
M	Mol
m	Milli-
m/V	Masse pro Volumen
MAP3K7	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase 7
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
min	Minute
miRNA	<i>micro ribonucleic acid</i>
mk	monoklonal
MMP	Matrixmetalloprotease
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
MW	Mittelwert
N-Cadherin	neurales Cadherin
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NFκB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
<i>NRAS Q61K</i>	<i>Neuroblastoma Rat Sarcoma</i> Gen mit Punktmutation an Position 61 Austausch Glutamin gegen Lysin
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
p110α	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-Kinase katalytische Untereinheit alpha
p21Cip1	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor protein 1</i>
p38/JNK	c-Jun N-terminale Kinase
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-L1	<i>programmed cell death ligand 1</i>
PEI	Polyethylenimin
p-ERK	phospho-ERK
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIK3CA	katalytische Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase
Pk	polyklonal
PLB	<i>Passive Lysis Buffer</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RIPA	<i>radioimmuno-precipitation-buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
ROS1	ROS Protoonkogen 1
rpm	<i>rounds per minute</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SCLC	<i>small cell lung cancer</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sp1	<i>specificity protein 1</i>
S-Phase	Synthese-Phase
SRE	<i>serum response element</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAK ca	TGF β -aktivierte-Kinase konstitutiv aktiv
TAK1	TGF β -aktivierte-Kinase 1
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	Tris-buffered saline mit 10 % Tween®20
Tcf	T-Zell-Faktor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i>
TGF β R1 ca	TGF β -Rezeptor 1 konstitutiv aktiv
Thr	Threonin

TNM	Tumor (T), <i>Nodes</i> (N), Metastasen (M)
<i>TP53</i>	Tumorprotein 53 Gen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween®20	<i>polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate</i>
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
VDRE	Vitamin D Rezeptor <i>response element</i>
<i>VIM</i>	Vimentin Gen
WB	Western Blot
WRE	<i>Wnt response element</i>
YAP	<i>Yes1 associated transcriptional regulator</i>
ZEB	<i>zinc-finger E-box-binding homeobox</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Phasenkontrastaufnahmen der verwendeten NSCLC-Zelllinien.	33
Abb. 2 Nachweis der Proteinüberexpression in Luziferase-Lysaten.	37
Abb. 3: Regulation der relativen Promotoraktivität von Ets- und AP1-Bindungselementen.	39
Abb. 4 Regulation der relativen Promotoraktivität von c-MYC und Slug sowie von den Bindungselementen für C/EBP und NFκB.	42
Abb. 5: Regulation der relativen Promotoraktivität der Reporter für Promotoren der Zellzyklusproteine Cyclin D1 und p21Cip1.	43
Abb. 6 Regulation der relativen Promotoraktivität von TCF- (TOPflash), TGFβ- (3TP-Lux) und SRE-Bindungselementen.	45
Abb. 7: Analyse des Einflusses der K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Aktivität des K-Ras-Effektorproteins ERK1/2.	48
Abb. 8: Regulation der relativen Promotoraktivität von Ets- und AP1- Bindungselementen durch K-Ras-Inhibitor.	49
Abb. 9 Regulation der relativen Promotoraktivität von c-MYC (Del1), Snail1 und Slug sowie von den Bindungselementen NFκB und C/EBP durch K-Ras-Inhibition.	51
Abb. 10 Regulation der relativen Promotoraktivität der Reporter für Promotoren der Zellzyklusproteine Cyclin D1 und p21Cip1 durch K-Ras-Inhibition.	52
Abb. 11 Regulation der relativen Promotoraktivität des Reporters für den Promotor des Zellzyklusproteins p21Cip1 durch eine Cobehandlung mit TGFβ1 und K-Ras-Inhibitoren.	53
Abb. 12: Regulation der relativen Promotoraktivität von TCF- (TOPflash), TGFβ- (3TP-Lux) und SRE-Bindungselementen durch K-Ras-Inhibition.	54
Abb. 13: Regulation der relativen Promotoraktivität der Reporter für Promotoren der Zell-Zell-Kontakt-Adhäsionsproteine E-Cadherin, N-Cadherin und Claudin 1 durch K-Ras-Inhibition.	55
Abb. 14: Regulation der relativen Promotoraktivität der Reporter für Promotoren der Zell-Zell-Kontakt-Adhäsionsproteine E-Cadherin und N-Cadherin durch Transkriptionsfaktoren.	56
Abb. 15: Regulation der relativen Promotoraktivität der abgebildeten Reporter durch K-Ras-Inhibition in HCC-44-Zellen.	59
Abb. 16: Regulation der relativen Promotoraktivität der ab-gebildeten Reporter durch K-Ras-Inhibition in H23-Zellen.	60
Abb. 17: Behandlung von H23-Zellen mit LiCl in einer Konzentrationsreihe.	61
Abb. 18 GSK-3-Inhibition von H23-Zellen.	62

Abb. 19: Analyse des Einflusses der GSK-3-Inhibition auf die Proteinexpression des EMT-Proteins Vimentin und der Zellkontakt-Proteine Cadherin 11 und Paxillin in H23-Zellen.	63
Abb. 20 Regulation der relativen Promotoraktivität von MnSOD, MMP9 und G6Pase sowie eines Fragmentes eines IL-2-Promotors (NFAT)	80
Abb. 21 Regulation der relativen Promotoraktivität von MnSOD und MMP9 sowie eines Fragmentes eines IL-2-Promotors (NFAT) durch K-Ras-Inhibition.	82
Abb. 22 Beispielhafte Darstellung von Primärergebnissen eines Luziferase Assays mit MikroWin 2000 Version 4.41	84
Abb. 23 Beispielhafte tabellarische Auswertung von Primärdaten eines Luziferase Assays	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien	17
Tabelle 2: Verwendete Transfektionsreagenzien	18
Tabelle 3: Verwendete Reporterplasmide	18
Tabelle 4: Verwendete Expressionsplasmide	19
Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper	21
Tabelle 6: Verwendete sekundäre Antikörper	22
Tabelle 7: Verwendete Konzentrationen von Inhibitoren bzw. Stimulanzen	24
Tabelle 8: Pipettierschema transiente Luziferase-Transfektion	25
Tabelle 9: Pipettierschema SDS-Page	27
Tabelle 10: Sequenzmotive und Bindestellen der verwendeten Reporterplasmide	35
Tabelle 11: Reporter-Aktivitätsprofile der Zelllinie H1299	46
Tabelle 12: Reporter-Aktivitätsprofile der Zelllinie H358 unter K-Ras-Inhibition	57
Tabelle 13: Vergleich der enthaltenen Bindestellen zwischen synthetischen und endogenen Reportern	66
Tabelle 14: Genexpressionsanalyse von Signalproteinen in Lungenadenokarzinomen	68
Tabelle 15: Einfluss der verwendeten KRAS-Inhibitoren auf die Regulation der Reporteraktivität von Ets-AP1, Ets, TOPflash, p21Cip1 und Claudin 1 in H23-Zellen	83

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1 Lungenkarzinom

Mit der Postulierung seiner Zelltheorie hat Rudolf Virchow bereits in den 1850er Jahren den Grundstein für die Definition der Karzinogenese gelegt: Jede Zelle entsteht aus einer Zelle (1). Heute ist bekannt, dass Krebs eine genetische Erkrankung ist, welche im Rahmen eines mehrstufigen Prozesses entsteht (2). Dieser führt durch den Erwerb replikativer Unsterblichkeit und Umgehung der Apoptose zu einer Entartung der Krebszellen. Das weitere Tumorwachstum wird nun durch die Aufrechterhaltung proliferativer Signalwege und die Unempfindlichkeit gegenüber antiproliferativen Signalen sowie die Initiierung der Angiogenese unterhalten (3).

Laut Statistik der *International Agency for Research in Cancer* war das Lungenkarzinom im Jahr 2020 weltweit bei Männern die häufigste und bei Frauen die dritthäufigste Krebserkrankung. Dabei lag die altersstandardisierte Inzidenz für das Lungenkarzinom bei 22,4 pro 100.000 Menschen, was 11,4 % der diagnostizierten Krebsfälle ausmacht. Mit einer Mortalitätsrate von 18 pro 100.000 Menschen war das Lungenkarzinom die Krebserkrankung mit der höchsten Mortalität weltweit (4).

Anhand der Zellteilungsrate lassen sich zwei Hauptgruppen des Lungenkarzinoms abgrenzen: das kleinzellige (SCLC) und das häufigere nicht-kleinzellige (NSCLC) Lungenkarzinom. Histologisch erfolgt die weitere Klassifizierung des NSCLC in die häufiger vorkommenden Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome und die vergleichsweise seltenen großzelligen Karzinome und neuroendokrinen Tumore (5). Das Plattenepithelkarzinom entwickelt sich aus dem Epithel der Hauptbronchi und ist assoziiert mit Rauchen, dem Hauptrisikofaktor von Lungenkarzinomen (6). Das Adenokarzinom entwickelt sich aus den kleinen Bronchien, Bronchiolen oder alveolären Epithelzellen und macht mit insgesamt 40 % den größten Anteil aller Lungenkarzinome aus (7). Die Noxen des Tabakrauchs induzieren *KRAS*-Mutationen (Kirsten Rat Sarcoma), welche die Karzinogenese des Adenokarzinoms vorantreiben (8). Aktivierende *KRAS*-Mutationen liegen in bis zu 30 % der Adenokarzinome vor und sind damit die häufigste Treibermutation (9). Dabei macht die K-Ras-Mutation G12C mit einem Austausch des Glycins an Position 12 gegen ein Cystein mit 40 % die häufigste *KRAS*-Mutation des NSCLC unabhängig vom histologischen Subtyp aus (10). Das K-Ras-Onkoprotein ist eine GTPase, die zwischen der inaktiven GDP-gebundenen und der aktiven GTP-gebundenen Form wechselt. Die aktivierende K-Ras-Mutation G12C führt durch eine Konformationsänderung dazu, dass die Affinität von K-Ras zu GTP extrem gesteigert wird. Der nun mehrheitlich vorliegende aktive Zustand von K-Ras bedingt eine Hyperaktivierung nachgeschalteter onkogener Signalwege mit konsekutiv unkontrollierter Proliferation (11).

1. Einleitung

Insgesamt ist das Lungenkarzinom ein Tumor mit einer sehr hohen Mutationslast. Während *KRAS*- und *TP53*-Mutationen (Tumor Protein 53) mit Rauchen assoziiert sind, sind *EGFR*-Mutationen (*Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor*) häufiger in Adenokarzinomen bei weiblichen Nichtrauchern beschrieben (12) (13). Weitere für das NSCLC beschriebene Treibermutationen befinden sich u. a. im *ALK*, *PIK3CA* (katalytische Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase), *BRAF*, *ROS1*, *HER2/neu* (Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor Typ 2) und *PTEN*-Gen (*Phosphatase and Tensin homolog*) (14). Eine Mutationsanalyse des Tumors ist nicht nur von prognostischer Bedeutung, sondern ermöglicht auch die Auswahl einer zielgerichteten Therapie (15) (16). Das Therapieschema richtet sich neben individuellen Faktoren wie den Komorbiditäten des Patienten v. a. nach der TNM-Klassifikation des NSCLC. Während in den Stadien I und II primär eine operative Resektion erfolgen soll, wird in den Stadien III und IV eine molekularpathologische Analyse der Treibermutationen *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *ROS1* und die immunhistochemische Bestimmung der PD-L1-Expression (*programmed death ligand 1*) empfohlen, sodass hier neben der chemotherapeutischen Systemtherapie auch eine mutationsspezifische zielgerichtete Therapie eingesetzt werden kann (17). Dies ist insbesondere relevant, da die meisten Diagnosen eines Lungenkarzinoms erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt werden (18).

Seit 2022 ist in der Europäischen Union mit AMG-510 (Freiname Sotorasib) der erste K-Ras-Inhibitor zugelassen. Grundlage für die Zulassung ist die CodeBreak-100-Studie, die für diesen K-Ras G12C-Inhibitor in der Phase-II-Studie eine Therapieansprache von 37 % zeigte, wobei das mediane progressionsfreie Überleben 6,8 Monate und die mediane Gesamtüberlebenszeit 12,5 Monate betragen (19). AMG-510 hemmt K-Ras G12C irreversibel durch Bindung an die *Switch II* Region, welche nur in der inaktiven GDP-gebundenen K-Ras-Konformation vorliegt, wodurch das G-Protein in seinem inaktiven Zustand gehalten wird (20). Zuvor galt das K-Ras-Onkoprotein über Jahrzehnte als nicht für eine Inhibition zugänglich, da eine direkte Inhibition aufgrund der extrem hohen Affinität von K-Ras zu GTP nicht gelang (21). Mit MRTX-849 (Freiname Adagrasib) befindet sich nun bereits ein zweiter kovalenter, irreversibler K-Ras G12C-Inhibitor in der Zulassungsphase (22).

Die beiden oben genannten K-Ras-Inhibitoren wurden in dieser Arbeit zur K-Ras G12C-Inhibition eingesetzt. Die dabei verwendeten Lungenkarzinom-Zelllinien (H1299, H23, H358 und HCC-44) wurden alle aus einem NSCLC vom Subtyp des Adenokarzinoms etabliert.

1. Einleitung

1.2 Die Rolle der epithelial-mesenchymalen Transition in der Karzinogenese

Der Grund für die hohe Mortalität des Lungenkarzinoms liegt v. a. darin, dass die Diagnosestellung häufig erst im fortgeschrittenen, bereits metastasierten Stadium erfolgt, wodurch die 5-Jahres-Überlebensrate von 52,2% auf 3,7% sinkt (23). Damit im Rahmen des mehrstufigen Metastasierungsprozesses die Blut- oder Lymphgefäßinvasion mit peripherer Absiedelung einer Fernmetastase möglich ist, muss initial eine Ablösung der malignen Zelle aus dem Zellverband des Primarius erfolgen (24). Dies erfordert eine histologische Dedifferenzierung der ursprünglich epithelialen Tumorzelle (25) (26). Im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) verliert die Zelle typische epitheliale Charakteristika und gewinnt stattdessen vermehrt mesenchymale Eigenschaften, welche eine Metastasierung begünstigen. Während der EMT-Prozess in der Embryogenese, der Organogenese und der Wundheilung streng reguliert abläuft, wird die EMT in der Karzinogenese weniger geordnet reaktiviert (27). Eine EMT umfasst dabei auch verschiedene Zwischenzustände, die als partielle EMT bezeichnet werden (28) (29) (30). Diese Zellen machen in der Regel die Mehrheit der Tumorzellen aus (31) und sind gekennzeichnet durch eine hohe Plastizität mit invasions- und progressionsfördernden Eigenschaften (32).

Im Rahmen der EMT kommt es initial zu einer Reduktion der Zell-Zell-Adhäsion, was die epitheliale Integrität des Gewebes zerstört. Eine zentrale Rolle spielt hierbei der Verlust des E-Cadherin-Catenin-Adhäsionskomplexes (33). Der E-Cadherin-Catenin-Adhäsionskomplex ist der wesentliche Bestandteil von *Adherens Junctions* (34). Zu dem Proteinkomplex gehören u. a. β - und γ -Catenin, welche über die Catenin-Bindungsdomäne an E-Cadherin binden und p120-Catenin, welches über die Juxta-Membran-Domäne an E-Cadherin bindet. β - und γ -Catenin verbinden wiederum über α -Catenin E-Cadherin mit dem Aktinzytoskelett (35). Auch andere Arten von interzellulären Kontakten wie die *Tight Junctions*, *Gap Junctions* und Desmosomen werden während einer EMT herunterreguliert (36). Dies resultiert in einem Verlust der Zellpolarität, welche für die Barrierefunktion des Epithels unabdingbar ist (37).

Darüber hinaus verändert sich auch die Proteinexpression der Transmembranproteinfamilie der Cadherine. Während das klassisch epitheliale E-Cadherin herunterreguliert wird, wird das mesenchymale N-Cadherin verstärkt exprimiert. Dabei sind N-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Kontakte deutlich instabiler, was die Zellmigration und -invasion erleichtert (38). Dieser sog. *Cadherin Switch* geht daher in Tumorentitäten mit epitheliale Ursprung mit einer Verschlechterung der Prognose einher (39). Darüber hinaus konnten Lechuga et al. zeigen, dass auch die Hochregulierung der Expression des mesenchymalen Cadherin 11 eine wichtige Rolle bei der beschleunigten Motilität von manchen

1. Einleitung

NSCLC-Zellen spielt (40). Auch Paxillin, welches als Adapterprotein in fokalen Adhäsionen fungiert (41), moduliert die Zellmigration (42). Wenn Paxillin transkriptionell hochreguliert wird, induziert dies die Proliferation und Migration von NSCLC-Zellen (43).

Außerdem ändert sich die Organisation des Zytoskeletts im Rahmen der EMT. So wird das für epitheliale Zellen charakteristische Intermediärfilament Zytokeratin durch das typisch mesenchymale Intermediärfilament Vimentin ersetzt (44). Im Gegensatz zu Zytokeratinen erfolgt jedoch durch Vimentin kein Transport von E-Cadherin zur Zellmembran (45). Anstelle des kortikalen Aktins werden nun außerdem vermehrt Aktin-Stressfasern gebildet, welche eine gerichtete Motilität ermöglichen (46).

Durch den Um- und Abbau der extrazellulären Matrix über eine EMT-bedingte vermehrte Genexpression und Exozytose u. a. von MMP9 (Matrixmetalloprotease 9), wird außerdem die Invasion der Tumorzellen erleichtert (47). Darüber hinaus sind MMPs auch am Abbau von E-Cadherin und der Aktivierung von Vorläufer-Enzymen der EMT beteiligt (48). In einer Meta-Analyse konnten Gong et al. zeigen, dass sowohl die Aktivität als auch die Expression der MMP9 in NSCLC-Gewebeproben mit einer fortgeschrittenen Tumorgroße korrelieren (49).

Die EMT wird durch zahlreiche regulatorische Mechanismen und Signalwege gesteuert. Das bereits gut charakterisierte Zytokin TGF β 1 (transformierender Wachstumsfaktor β 1) spielt hierbei eine Schlüsselrolle (50). Wie Katsuno et al. zusammenfassend darstellen, ist schon länger bekannt, dass TGF β 1 zwei konträre Funktionen während der Karzinogenese innehat. Im Frühstadium wirkt TGF β 1 als Tumorsuppressor proliferationshemmend und proapoptotisch. Im Verlauf der Krebsprogression hingegen verliert TGF β 1 diese Wirkung und fördert Karzinomwachstum, Invasion und Metastasierung (51). Auch in NSCLC-Zellen induziert eine anhaltende Stimulation mit TGF β 1 eine EMT-ähnliche Proteinexpression (52) (53). Die Ergebnisse der Meta-Analyse von Li et al. weisen darauf hin, dass eine hohe Expression von TGF β mit einem schlechteren Überleben bei NSCLC-Patienten einhergeht (54). TGF β kann in Tumorzellen sowohl autokrin (55) als auch parakrin (56) stimulierend wirken. Die Genexpression der bisher bekannten klassischen EMT-Transkriptionsfaktoren Snail1, Slug, ZEB1, ZEB2 und Twist1 wird Smad-vermittelt gesteuert (57). TGF β interagiert zudem mit weiteren Signalwegen wie Wnt oder Ras, um eine vollständige EMT auszulösen (58).

Wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, kommen in Lungenadenokarzinomen häufig aktivierende Ras-Mutationen wie K-Ras G12C vor. Die aktiven Ras-Signale hemmen wiederum die tumorsuppressive Funktion von TGF β (59), indem sie den Abbau von Smad-Proteinen fördern. Dadurch vergrößert sich die Population der Krebszellen mit Ras-Mutation schnell. Zusätzlich fördert Ras die autonome Sekretion von TGF β (60). Demnach

1. Einleitung

wirken TGF β und Ras synergistisch als EMT-Induktoren. Für NSCLC-Zellen wurde darüber hinaus bereits gezeigt, dass das Onkoprotein K-Ras die EMT fördert, indem es über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Slug die Genexpression von E-Cadherin hemmt (61).

Neben den bereits erwähnten charakteristischen EMT-Transkriptionsfaktoren Snail1, Slug, ZEB1, ZEB2 und Twist, sind im Rahmen dieser Arbeit noch weitere Transkriptionsfaktoren und Kinasen verwendet worden, auf die ebenso im nachfolgenden Kapitel näher eingegangen wird.

1.3 TGF β -vermittelte Signalwege und EMT-Transkriptionsfaktoren

Im vorherigen Kapitel wurde bereits die Schlüsselfunktion von TGF β 1 im Rahmen der EMT dargestellt. Wie Tzavlaki zusammenfassend dargestellt, vermittelt TGF β 1 seine Signalwirkung über einen transmembranen tetrameren Serin/Threonin-Kinase-Rezeptorkomplex aus Typ 1 (TGF β R1) und Typ 2 TGF β -Rezeptoren (TGF β R2) (62). Dabei trans-phosphoryliert TGF β R2 den TGF β R1. TGF β R1 initiiert sowohl über Smad-abhängige als auch über Smad-unabhängige Signalwege schließlich die transkriptionelle Aktivierung bzw. Repression zahlreicher Zielgene. Zu den Smad-unabhängigen Signalwegen zählen neben dem p38/JNK (c-Jun N-terminale Kinase)- und NF κ B-Signalweg u. a. auch der ERK-MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen)-Signalweg (63) und der PI3K-AKT-Signalweg (64). In den ersten beiden genannten Signalwegen wird die Kinase TAK1 (TGF β -aktivierte-Kinase 1) aktiviert (65) (66) (67). TAK1 kann abhängig vom Signalweg und der Zellart die Tumorentstehung, Proliferation und Metastasierung sowohl fördern als auch hemmen (68).

Der PI3K-Akt-Signalweg ist in mehreren Krebserkrankungen aberrant aktiviert (69) (70). In einer Sequenzierungsstudie zeigten Scheffler et al., dass bei 3,7 % der NSCLC-Patienten das Gen der katalytischen Untereinheit p110 α der Kinase PI3K mutiert ist (71). In einer weiteren Studie wurden entsprechende Mutationen wie auch Genamplifikationen von p110 α häufiger in Plattenepithelkarzinomen der Lunge als in Adenokarzinomen gefunden (72). Der Tumorsuppressor PTEN unterbricht die Signaltransduktion des PI3K-Akt-Signalwegs durch Dephosphorylierung eines Zwischenprodukts und kann deshalb als Gegenspieler von p110 α gesehen werden (73).

Neben TGF β -vermittelten Signalwegen spielen auch einige Transkriptionsfaktoren eine tragende Rolle in der EMT und somit in der Metastasierung von Karzinomen. Im Besonderen zu nennen sind hier die EMT-Transkriptionsfaktoren Snail1, Slug, Twist1, ZEB1 und ZEB2 die schon seit längerem als Repressoren unter anderem der E-Cadherin-Expression beschrieben sind (74) (75).

1. Einleitung

Die Transkriptionsfaktoren Snail1 und Slug gehören zur Zinkfinger-Proteinfamilie Snail. Über dieses Strukturmotiv werden sequenzspezifische Interaktionen mit E-Box-Sequenzen (CAGGTG) innerhalb von DNA-Promotoren vermittelt (76). Das *CDH1*-Gen, welches E-Cadherin exprimiert, beinhaltet mehrere E-Box-Elemente (77) sowie eine palindromische Sequenz innerhalb einer E-Box (E-pal), die als negatives regulatorisches Element (78) von mehreren Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren u. a. Snail1, Slug und Twist1 gebunden wird (79). In immunhistochemischen Untersuchungen an Gewebeproben von Lungenadenokarzinomen konnte verglichen mit gesundem Lungengewebe eine vermehrte Expression von Twist1, jedoch nicht von Snail1 oder Slug nachgewiesen werden (80). Die vermehrte Expression von Twist1 korreliert dabei mit dem TNM-Stadium und damit auch mit Metastasierung und außerdem auch mit dem Risikofaktor Rauchen (81). Twist1 ist ein Transkriptionsfaktor der Twist-Familie mit *helix-loop-helix*-Motiv, welches ebenfalls über E-Box-Motive mit DNA-Promotoren interagiert (82). Anders als die anderen hier genannten EMT-Transkriptionsfaktoren reprimiert Twist1 die E-Cadherin-Expression nur indirekt, indem Twist1 die Expression von Slug induziert (83). In Adenokarzinomen der Lunge mit EGFR-Mutation wird häufig auch eine Genamplifikation von Twist1 festgestellt (84). Tran et al. konnten bereits im Mausmodell zeigen, dass die Expression von Twist1 in Kombination mit aktiviertem K-Ras die Entstehung von Lungentumoren durch Unterdrückung zellulärer Seneszenzmechanismen beschleunigt (85). ZEB1 und ZEB2 gehören zur Zinkfinger- und E-Box-Bindeproteinfamilie ZEB (86). ZEB-Proteine können die Transkription unterdrücken, indem sie direkt an E-Box-ähnlichen-Motive binden, die sich in verschiedenen Promotoren befinden (87). Die genaue Funktion der ZEB-Transkriptionsfaktoren in der Karzinogenese ist noch nicht geklärt. Die überwiegende Forschungsmeinung ist, dass das als Onkogen wirkende ZEB1 v. a. die Invasivität der Tumorzellen erhöht (88) (89). In KRAS-mutierten NSCLC-Zellen gibt es jedoch auch Hinweise, dass ZEB-Faktoren antiapoptotisch wirken können (90). In Adenokarzinomen der Lunge ist v. a. bei Nichtrauchern ZEB1 deutlich reprimiert, was darauf hindeutet, dass ZEB eine wachstumsunterdrückende Funktion haben könnte (91). In KRAS-mutierten NSCLC-Zellen wirken ZEB-Faktoren hingegen antiapoptotisch (90) und fördern anders als im EGFR-mutierten Adenokarzinom der Lunge das Tumorstadium (91).

Obwohl alle diese EMT-Transkriptionsfaktoren über E-Box-ähnliche-Sequenzen mit DNA-Promotoren interagieren, wirken sie nicht redundant. Die ZEB-Proteine können zusätzlich auch an Z-Motive (CACCT) binden (87). Darüber hinaus ist für ZEB1 die an die E-Box angrenzende Sequenz entscheidend, wobei die N-terminalen Zinkfinger bevorzugt E-Boxen mit der zusätzlichen Sequenz GTTTG/C binden (92). Außerdem binden ZEB1 und ZEB2 bevorzugt Promotoren, die zwei E-Boxen mit variablem Abstand

1. Einleitung

enthalten (93), z. B. auch in der häufig vorkommenden Form von Tandemwiederholungen (94). Für Snail1 und Slug hingegen sind bereits Varianten der Art und Anzahl der Zinkfinger beschrieben, die funktionelle Unterschiede erklären können (95). Twist1 wiederum wirkt als Dimer und kann daher nur mit zwei Bindungselementen in einem Abstand von fünf Nukleotiden interagieren (96). Und nicht zuletzt ist die Wirkung der EMT-Transkriptionsfaktoren entscheidend vom (epi-)genomischen Kontext der Zielgene abhängig (97).

Es gibt darüber hinaus weitere Transkriptionsfaktoren und Gene, die die Differenzierung und Dedifferenzierung von Epithelzellen steuern und somit potenziell für den Prozess der EMT und Metastasierung relevant sein könnten. Hierzu zählen z. B. Cut-like-Transkriptionsfaktoren. Eine Genduplikation während der Evolution hat dazu geführt, dass es zwei *CUX*-Gene bei Säugetieren gibt: Cut-like 1, das ubiquitär exprimiert wird und Cut-like 2, das v. a. in Nervengewebe exprimiert wird (98), (99). Am Mausmodell konnte erstmals gezeigt werden, dass Cut-like 1 für die Differenzierung des Lungenepithels relevant ist (100). Tumorzellen mit onkogenem Ras und induziertem Cut-like 1 haben u.U. einen Vorteil, da sie besser mit oxidativem Stress umgehen können (101), (102). Interessanterweise ist Cut-like 1 funktionell nicht nur als Onkogen, sondern in erster Linie als Tumorsuppressor beschrieben worden (103). *CUX1* (Cut-like 1) gilt als haploinsuffizientes Tumorsuppressorgen. Eine Isoform von Cut-like 1 wirkt z. B. in der Basenexzisionsreparatur mit (104).

1.4 Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in der EMT

Neben TGF β - und K-Ras-regulierten Signalwegen, sind weitere Signalwege in den EMT-Prozess involviert. Über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg werden Signale zwischen benachbarten Zellen vermittelt um u. a. Prozesse wie Proliferation, Zellmigration und Morphologie zu steuern (105). Im Rahmen der Wnt-vermittelten Signalübertragung wird die GSK-3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3) gehemmt, welche im aktiven Zustand β -Catenin für den proteasomalen Abbau markiert. Nukleäres β -Catenin bildet einen transkriptionell aktiven Komplex mit den *high-mobility-group*-Proteinen LEF1 (*lymphoid enhancer factor*) und TCF (*T cell factor 1*) um die Transkription von Zielgenen zu aktivieren (106) (107). Wnt3a aktiviert als Wnt-Ligand diesen sogenannten kanonischen Wnt-Signalweg. In Lungenadenokarzinomen ist die Wnt/TCF-LEF-Aktivierung mit der Entwicklung von Metastasen und einer Verkürzung der Überlebenszeit assoziiert (108). Anhand von respiratorischem Epithel in Zellkultur konnte gezeigt werden, dass Bestandteile von Zigarettenrauch den Wnt-Signalweg hochregulieren (109). Daher verwundert es nicht, dass die Mehrheit der NSCLC-Zelllinien einen aktivierten Wnt-Signalweg aufweist (110).

1. Einleitung

Überraschenderweise ist entgegen dieser Beobachtung der Verlust der β -Catenin-Proteinexpression in NSCLC-Tumoren mit einer Zunahme der TumorgroÙe assoziiert, was möglicherweise auf die negative Auswirkung des β -Catenin-Verlusts in Bezug auf den E-Cadherin-Catenin-Adhäsionskomplexes zurückzuführen ist (111).

Darüber hinaus bestehen Wechselwirkungen zwischen TGF β - und K-Ras-regulierten Signalwegen und dem Wnt-vermittelten Signalweg. Wie β -Catenin werden auch K-Ras-Proteine durch das Fehlen der GSK3 β -vermittelten Phosphorylierungen angereichert und bleiben aktiv (112). Unter TGF β -Stimulation kann der Wnt-Signalweg Smad-unabhängig aktiviert werden (113). GSK3 β wiederum markiert in Abwesenheit von TGF β Smad-Proteine zum Abbau (114).

Als eines der Schlüsselenzyme des Wnt-Signalwegs kontrolliert GSK-3 β durch Phosphorylierung die zytoplasmatischen Konzentrationen der EMT-Transkriptionsfaktoren Snail1 und Slug (115) (116). Anhand von Brustkrebszellen konnten Wu et al. zeigen, dass die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges Slug durch Hemmung der GSK3 β -Kinase-Aktivität stabilisiert und schließlich EMT-Transkriptionsprogramme initiiert (115).

Aufgrund der wichtigen Rolle des Wnt-Signalwegs in der Tumorentstehung und -progression, könnten GSK-3-Inhibitoren einen weiteren Ansatzpunkt in der Krebs-Therapie bieten. Der GSK-3-Inhibitor XIII wirkt als starker Inhibitor an den ATP-Bindestellen (117). SB216763 ist ebenfalls ein selektiver und ATP-kompetitiver GSK-3-Inhibitor der beiden aktiven Formen GSK-3 α und GSK-3 β (118).

1.5 Die Rolle von cis- und trans-wirkenden Faktoren bei der Genregulation

Doch wie vermitteln Transkriptionsfaktoren ihre Wirkung? Es ist allgemein anerkannt, dass der Vorgang der eukaryotischen Proteinbiosynthese aus zwei Hauptschritten besteht. Im Rahmen der Transkription wird zunächst ein Abschnitt der DNA in RNA umgeschrieben, welche anschließend während der Translation in eine Aminosäuresequenz übersetzt wird. Die Proteinbiosynthese ist mit einem enormen Energieverbrauch verbunden, weshalb die Genexpression stark reguliert wird. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die DNA auf sequenzspezifische Weise binden und dadurch die Transkription regulieren können (119). Die meisten Transkriptionsfaktor-Bindestellen sind kurz (ca. 6-12 Basen), sodass ein typisches menschliches Gen (>20 kb) mehrere potenzielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren enthält (120). Dabei sind die regulatorischen Sequenzen der Transkriptionsfaktoren oft hoch konserviert zwischen Metazoen (121). Somit kann ein Transkriptionsfaktor unterschiedliche Gene in verschiedenen Zelltypen regulieren. Die meisten eukaryotischen Transkriptionsfaktoren wirken durch die Rekrutierung von Kofaktoren (122).

1. Einleitung

Sowohl die Smad- als auch die Ras-ERK-vermittelte Transkription wird u. a. über die Transkriptionsfaktoren Ets und AP1 reguliert (123) (124) (125). Die humanen Ets-Proteine gehören zu einer großen Familie von insgesamt 28 Transkriptionsfaktoren (126). Ihnen gemeinsam ist die Ets-Domäne, die GGAA/T-Motive bindet (127). Da Zellen mehrere Ets-Proteine gleichzeitig exprimieren können, ist eine funktionelle Redundanz gegeben (128). Die Ets-Transkriptionsfaktoren steuern u. a. Proliferation, Zelldifferenzierung und den Zellzyklus (129). Wenn der Transkriptionsaktivator Ets1 in Krebszellen exprimiert wird, durchlaufen diese Zellen eine EMT (130) und MMPs werden aktiviert (131), wodurch die Invasivität des Tumors steigt. Die Ergebnisse einer kleinen Stichprobenanalyse von Zhou et. al weisen darauf hin, dass eine verstärkte Genexpression von Ets mit einem höheren *Grading* des NSCLC nach TNM-Klassifikation und folglich auch mit einer verringerten Gesamtüberlebenszeit korreliert (132). Die Transkriptionsfaktoren der AP1-Familie sind Dimere der Jun- und Fos-Familie (133) und wirken vor allem als Effektoren von vorgeschalteten onkogenen Signalwegen (134).

Als DNA-bindende Proteine benötigen Transkriptionsfaktoren besondere Strukturmodule, die in Luscombe et al. zusammenfassend dargestellt sind: Hierzu zählen u. a. Zinkfinger-, Leucin-*Zipper*-, Helix-*Loop*-Helix- und Helix-*Turn*-Helix-Motive. Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren wie die ZEB- und Snail-Familie bestehen aus zwei antiparallelen β -Faltblatt-Strukturen gefolgt von einer α -Helix, die koordinativ ein Zink-Ion binden. Über die α -Helix binden sie an die große Furche der DNA. Meist folgen mehrere Zinkfinger-Domänen kettenartig hintereinander. Leucin-*Zipper*-Proteine wie AP1 (133) bestehen aus zwei α -Helices, die über hydrophobe Aminosäuren wie Leucin dimerisieren. Helix-*Loop*-Helix-Motive wie in Twist1 entsprechen modifizierten Leucin-*Zipper*-Strukturen, in denen die DNA-bindende Domäne durch eine Schleife von der Dimerisierungsdomäne getrennt ist. Helix-*Turn*-Helix-Proteine wie die zur Homöobox-Familie zählenden Transkriptionsfaktoren Cut-like 1 und 2 oder Ets-Proteine (127) binden die große Furche der DNA über zwei senkrecht zueinanderstehende α -Helices, welche über eine β -Faltblattstruktur miteinander verknüpft sind. (135).

Die Mehrheit der menschlichen Gene ist grundlegend ähnlich aufgebaut. Dabei sind den kodierenden Abschnitten eines Gens am 5'-Ende cis-wirkende Elemente vorgeschaltet. Hierzu gehören Promotoren, *Enhancer* und *Silencer*. Der Promotor liegt stromaufwärts in der Nähe des Transkriptionsstarts und besteht aus einem Kernpromotor und einer proximalen Promotorsequenz. Der Kernpromotor beinhaltet u. a. die TATA-Box als Startstelle für die Transkriptionsinitiation. Die proximale Promotorregion ist i.d.R. unmittelbar

1. Einleitung

bis zu einigen hundert Basenpaaren stromaufwärts gelegen und beinhaltet vor allem Bindestellen für Transkriptionsfaktoren (136). Während manche Gene konstitutiv exprimiert werden, unterliegen die meisten Gene Regulationsmechanismen. Als Repressoren bezeichnet man DNA-bindende Proteine, die die Transkription hemmen, indem sie an sogenannte *Silencer*-Sequenzen binden. Im Gegensatz dazu binden als Aktivatoren wirksame Transkriptionsfaktoren an *Enhancer*-Sequenzen und stimulieren dadurch die Transkription. Enhancer und Silencer zählen zu den distalen regulatorischen Elementen und können bis zu mehrere tausend Basenpaare weiter stromaufwärts des regulierten Gens liegen (137). Darüber hinaus ist seit langem bekannt, dass die Genexpression auch passiv über weitere kaskadenartig dazwischen geschaltete regulatorische Elemente beeinflusst werden kann wie z. B. durch sogenannte nicht-klassische negative regulatorische Elemente (138). Lange Zeit wurden Transkriptionsfaktoren entweder als Aktivatoren oder Repressoren klassifiziert. Heute ist bekannt, dass viele Transkriptionsfaktoren abhängig vom lokalen Sequenzkontext und der Verfügbarkeit unterschiedliche Kofaktoren rekrutieren, die entgegengesetzte Wirkungen haben können (139).

Bei der Genregulation im Rahmen der Karzinogenese spielen zwei besondere Gruppen von Genen eine entscheidende Rolle: Onkogene und Tumorsuppressorgene. Onkogene steuern Zellwachstum und -differenzierung. Durch sogenannte *Gain-of-Function*-Mutationen kann aus einem Protoonkogen ein Onkogen entstehen. Besonders gut charakterisiert für das NSCLC ist zum einen das Protoonkogen *KRAS*, das u. a. durch die Punktmutation *KRAS* G12C konstitutiv aktiviert wird sowie die Überexpression des Onkogens *c-MYC* durch Genamplifikation (140). Tumorsuppressorgene codieren häufig für Proteine, die den Zellzyklus kontrollieren und Apoptose induzieren. Die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens wie z. B. *CDH1* (E-Cadherin) oder *PTEN* durch *Loss-of-Function*-Mutationen fördert somit die Karzinogenese (141) (142).

Zur Untersuchung der transkriptionellen Genregulation gibt es verschiedene Methoden. Die Transkriptionsregulation ist häufig mit DNA-Protein-Interaktionen verbunden. DNA-Protein-Interaktionen können z. B. mithilfe des von Garner und Revzin beschriebenen *Electrophoretic Mobility Shift Assays* nachgewiesen werden. Dabei werden Proteine mit bereits bekannten Nukleotidsequenzen inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Wenn das Protein an die DNA-Sequenz gebunden hat, ist dies an einer Verschiebung der Laufweite erkennbar (143). Die Bindestellen von DNA-assoziierten Proteinen lassen sich dann im nachfolgenden Schritt u. a. mittels ChIP-Analyse (Chromatin-Immunopräzipitation-Analyse) analysieren (144). Hierfür wird das Protein-DNA-Gemisch mit Formaldehyd zunächst quervernetzt. Danach wird das Chromatin

1. Einleitung

fragmentiert, um eine Immunpräzipitation spezifischer Proteine durchführen zu können. Kopräzipitierte DNA-Sequenzen können nach Trennung der Protein-DNA-Komplexe durch PCR oder DNA-Sequenzierung identifiziert werden. Als Weiterentwicklung des nuklearen *Run-on*-Assays können schließlich mithilfe des von Core et al. entwickelten *Global Run-on Sequencing* genomweit die Gene identifiziert werden, die zu einem bestimmten Zeitpunkt durch aktive RNA-Polymerasen transkribiert werden. Dazu werden die Zellen isoliert und neu synthetisierte Transkripte mit Bromouridin markiert. Die zeitgleiche Inkubation mit Sarkosyl verhindert die Anlagerung neuer RNA-Polymerasen, so dass nur von den Genen, die bereits zuvor von einer RNA-Polymerase gebunden wurden, markierte Transkripte erstellt werden. Im Anschluss können diese sog. *Run-on*-Transkripte mithilfe von Antikörpern gebunden, in cDNAs umgeschrieben und schließlich mittels *Next-Generation-DNA-Sequenzierung* identifiziert werden (145). Um nun darüber hinausgehend die Funktion spezifischer regulatorischer Sequenzen im Rahmen der Genregulation untersuchen zu können, nutzt man sog. Reporterassays. Dabei werden Reportergene wie *gfp* (grün fluoreszierendes Protein) oder *luciferase* hinter die Promotorregion in den ursprünglichen codierenden Bereich eingefügt. Die Genprodukte dieser Reportergene können mittels Fluoreszenz, bzw. Lumineszenz detektiert und quantifiziert werden (146). Duale Reportersysteme verbessern durch Verwendung eines zweiten Reporters mit experimenteller Erfassung der Basisreaktion die Genauigkeit. Somit lässt sich quantitativ die Promotoraktivität von Genen erfassen (147). Mit dieser Methode ist im Rahmen vergleichender Messungen auch die Ermittlung dynamischer Transkriptionsreaktionen auf externe Stimuli möglich (148).

1.6 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der EMT-assoziierten Genregulation im NSCLC anhand von Zellkultursystemen, um ein detaillierteres Verständnis der zellulären und subzellulären Prozesse der Metastasierung zu gewinnen. Hierfür wurde initial mit Hilfe von Reporterassays die Regulation der Promotoraktivität von potentiellen Zielgenen (c-MYC, Snail1, Slug, p21Cip1, Cyclin D1, MnSOD, G6Pase, NFAT, MMP9) und regulatorischen Elementen (Ets, AP1, Ets-AP1, NFκB, C/EBP, TCF (TOPflash-Reporter), Smad/TGFβ-Bindungselement (3TP-Lux-Reporter), SRE) durch Transkriptionsfaktoren (ZEB1 in den Isoformen 1 und 2, ZEB2, Snail1 und Slug, Twist1, LEF1, FOXO3a, Cut-like 1 und Cut-like 2, TGFβR1 ca, TAK ca, p110α, Fer sowie PTEN), die in Zusammenhang mit der Differenzierung und Dedifferenzierung von Epithelzellen beschrieben sind, untersucht. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist insbesondere in der Analyse der Rolle TGFβ1-vermittelter Signalwege.

1. Einleitung

Wie zahlreiche Untersuchungen bereits zeigen, treibt onkogenes K-Ras die Karzinogenese des NSCLC maßgeblich voran. Daher wurde in weiterführenden Reporterassays untersucht, welchen Einfluss eine K-Ras-Inhibition auf die EMT-assoziierte Genregulation *KRAS*-mutierter Lungenkrebszellen hat.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird darüber hinaus in Form eines Ausblicks der Frage nachgegangen, welche Rolle der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in der Metastasierung des NSCLC spielt. Ziel ist es hierbei zu analysieren, welchen Einfluss eine GSK-3-Inhibition auf die Expression exemplarischer EMT- und Zellkontakt-Proteinen hat.

2. Material

2. Material

2.1 Chemikalien

Alle unten nicht explizit genannten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Qualität von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Biozym (Hessisch-Oldendorf), Capricorn (Ebsdorfergrund), Carl Roth (Karlsruhe), Merck Millipore (Darmstadt), Serva Electrophoresis (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Thermo Fisher Scientific (Dreieich) und VWR (Darmstadt) bezogen.

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
30 % Acrylamid (Rotiphorese® Gel A)	Carl Roth, Karlsruhe
2 % Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel B)	Carl Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin, Fraktion V (pH 7,0)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
<i>Dulbecco's Modified Eagle medium</i> (DMEM) (Glukosekonzentration 1g/L)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Fetales Kälberserum (FCS)	Capricorn, Ebsdorfergrund
Milchpulver (<i>Blotting</i> -Qualität)	Carl Roth, Karlsruhe
Opti-MEM reduziertes Medium	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Phosphatase-Inhibitor-Mix PhosSTOP	Sigma-Aldrich Taufkirchen
SuperSignal West Pico PLUS chemilumineszierendes Substrat	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
0,05 % Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

2.2 Lösungen und Puffer

<u>10x Agarosegel-Ladepuffer</u>	0,25 % (M/V) Orange G 50 % (V/V) Glycerin 1 mM EDTA
<u>BCA-Färbereagenz</u>	50 Volumenteile: Pierce BCA Protein Assay Reagenz A 1 Volumenteil: 4 % (M/V) CuSO ₄ in ddH ₂ O
<u>1x CMF-PBS</u>	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ PO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 in ddH ₂ O
<u>DMEM-Wachstumsmedium</u>	10 % (V/V) Fetales Kälberserum (FCS) 1 % (V/V) GlutaMAX

2. Material

<u>LB-Medium</u>	1 % (V/V) MEM Nicht-essentielle AS 1 % (M/V) Trypton 0,5 % (M/V) Hefeextrakt 1 % (M/V) NaCl pH 7,5 in ddH ₂ O
<u>Ponceau-S-Lösung</u>	0,2 % (M/V) Ponceau-S 3 % (M/V) Trichloressigsäure (TCA)
<u>100x Proteaseinhibitor-Mix</u>	40 mg Pefabloc 10 mg Aprotinin 1 mg Leupeptin 100 mg Trypsin-Inhibitor (Sojabohne) 50 mM Tris/HCl pH 7,4
<u>1x RIPA-Puffer</u>	50 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 0,5 % (M/V) Na-Deoxycholat 1 % (V/V) Triton x-100 0,1 % (M/V) SDS pH 7,2
<u>1x SDS-Laufpuffer</u>	50 mM Tris/HCl 0,5 M Glycin 0,1 % (M/V) SDS
<u>5x SDS-Probenpuffer</u>	0,2 M Tris/HCl 1 M Saccharose 5 mM EDTA 1 mM DTT 2 % (M/V) SDS 0,1 % (M/V) Bromphenolblau pH 8,8
<u>1x TAE-Puffer</u>	40 mM Tris/HCl 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8,0
<u>1x TBS</u>	10 mM Tris/HCl 150 mM NaCl pH 7,4

2. Material

<u>1 x TBS/T</u>	10 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 0,1 % (V/V) Tween 20 pH 7,4
<u>TCM-Puffer</u>	10 mM Tris/HCl 10 mM CaCl ₂ 10 mM MgCl ₂ pH 7,5 in ddH ₂ O
<u>1 x TE-Puffer</u>	10 mM Tris/HCl 5 mM EDTA pH 8,8 in ddH ₂ O
<u>Transferpuffer</u>	25 mM Tris/HCl 1,5 % (M/V) Glycin 0,1 % (M/V) SDS 20 % (V/V) Methanol

2.3 Verbrauchsmaterialien

Alle unten genannten Verbrauchsmaterialien wurden in Standardqualität bezogen.

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Hersteller</u>
96-Well Mikroplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Well Mikroplatte, schwarz	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kanülen 26 G (0,45 × 16 mm)	BD Biosciences, Heidelberg
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, Freiburg
Amersham Protran 0,45 µm	
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen 15 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg Steritop
Sterilfilter Millex-GS	Merck Millipore, Darmstadt
Tuberkulinspritzen 1 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Whatman Chromatographie-Papier	GE Healthcare, Freiburg
Zellkulturplatte 6-Well und 24-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschale 60 mm und 100 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.4 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
--------------	-------------------

2. Material

Absorptions-Reader ELx800	BioTek, Bad Friedrichshall
Bakterienschüttler MaxQ400	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Blotkammer	C.B.S. Scientific Co., San Diego, CA, USA
Centro XS3 LB 960 Luminometer	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Elektrophoresekammer BlueMarine™ 100	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Feinwaage Analytical Balance A200S	Sartorius Lab Instruments, Göttingen
Fusion-SL 3500.WL	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Heizblock Analog	VWR, Darmstadt
HERACELL 150i CO2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Heraeus Megafuge 16R Kühlzentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Heraeus Megafuge X1R Tischzentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Inkubationsschüttler Ecotron	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
LI-COR Odyssey Sa und CLx	LI-COR Biosciences, Bad Homburg vor der Höhe
Mikroskop Primovert	Zeiss, Oberkochen
Mini-Zentrifuge Sprout	Biozym, Hessisch Oldendorf
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
PAULA Cell Imager	Leica, Wetzlar
pH-Meter	Mettler Toledo, Gießen
Pipetten PIPETMAN Classic	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
P10, P20, P200, P1000	
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Sicherheitswerkbank Labgard	ibs tecnomara, Fernwald
Thermomixer kompakt	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallreiniger Transsonic T310	ELMA Sonic, Singen
UV-Transilluminator GeneFlash	Syngene, Cambridge, England
Waage 1264MP	Sartorius Lab Instruments, Göttingen
Wasseraufbereitungssystem	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Barnstead GenPure	
Zellkulturzentrifuge Heraeus Labofuge 400	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

2. Material

2.5 Prokaryotische und eukaryotische Zellen

2.5.1 Escherichia coli Stämme

OneShot TOP10 kompetente *E. coli*

Invitrogen, Groningen, Niederlande

2.5.2 Eukaryotische Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden aus dem Material verschiedener NSCLC etabliert. Dabei haben H1299, H23 und HCC-44 eine eher mesenchymale Morphologie, während H358 eine eher epitheliale Morphologie zeigt. Die Zelllinien H23 und H358 tragen heterozygot und HCC-44 homozygot, die aktivierende *KRAS*-Punktmutation G12C. H1299 ist heterozygot für die *NRAS*-Punktmutation Q61K. Die Angaben über die Zelllinien wurden den offiziellen Informationen der ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) und DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) sowie der Datenbank Cellosaurus (149) entnommen.

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Referenz	Bestellnummer
HCC-44	Adenokarzinom; polyploider Karyotyp; homozygot für <i>KRAS</i> G12C	DSMZ	#ACC 534
NCI-H1299	Adenokarzinom, abgeleitet aus dem Lymphknoten; p53-Deletion; heterozygot für <i>NRAS</i> Q61K	ATCC	#CRL-5803
NCI-H23	Adenokarzinom; Expression von a-Myc, c-Raf 1, Ha-Ras, Ki-Ras und N-Ras; heterozygot für <i>KRAS</i> G12C	ATCC	#CRL-5800
NCI-H358	bronchoalveoläres Karzinom; p53-Deletion; heterozygot für <i>KRAS</i> G12C	ATCC	#CRL-5807

2.6 Enzyme, Marker und molekularbiologische Kits

Enzyme

Restriktionsenzyme und -puffer

Hersteller

New England Biolabs, Frankfurt am Main

Marker

1 kb DNA Ladder

Hersteller

New England Biolabs, Frankfurt am Main
(#N3232)

PageRuler Prestained Proteine Ladder

Thermo Fisher Scientific, Dreieich
(#26617)

Molekularbiologisches Kit

Dual-Luziferase Reporter Assay System

Hersteller

Promega, Mannheim

2. Material

NucleoBond Finalizer

Macherey-Nagel, Düren

Plasmid Midi Kit

Qiagen, Hilden

2.7 Transfektionsreagenzien

Tabelle 2: Verwendete Transfektionsreagenzien

Transfektionsreagenz	Zelllinie	Hersteller	Bestellnummer
Lipofektamine 3000	H358	Thermo Fisher Scientific, Dreieich	#L3000015
Polyethylenimin (PEI)	H1299, H23, HCC-44	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	#9002986

2.8 Plasmide

2.8.1 Reporterplasmide

Tabelle 3: Verwendete Reporterplasmide

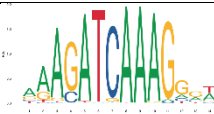

Reporterplasmid	Bezugsquelle	Referenz
pRL-TK	Promega, # E2241	
pTopflash	Upstate, # 21-170	(150)
p3TPLux	Addgene, #11767	(151)
pGL3-c-myc Del.1	Addgene, #16601	(152)
pGL3-NFκB	Prof. Roland Schmidt, LMU München	(153) (154)
pAP1(PMA)-TA-Luc	Clontech, #631906	(155)
pGL3-Cyclin D1 human (-962)	Addgene, #32727	(156)
pGL3-SRE.L	Prof. Alfred Nordheim, Universität Tübingen	(157)
pGL3-NFAT	Addgene, #10959	(158)
pGL4-luc2P/C/EBP-RE/minP/Hygro	Promega, #CS185201	
pGL3-MnSOD luc	Prof. Lars-Oliver Klotz, Universität Jena	(159) (160)
pGL3-Glucose-6-Phosphatase luc	Prof. Lars-Oliver Klotz, Universität Jena	(161)
pGL4-Ets-AP1	Prof. Peter C. Hollenhorst, Universität Indiana, Bloomington	(162)
pGL3-Ets	Frank McCormick, Universität California, San Francisco	(156)
pGL2-MMP9	Addgene, #53434	(163)
pGL4.10-Claudin-1	Addgene, #46387	(164)
pGL2/p21 promotor-Luc	Addgene, #33021	(165)

2. Material





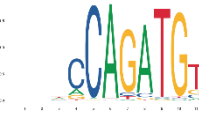



		(166)
pGL2/Snail1	Addgene, #31694	(167)
pGL2/Slug	Addgene, #31695	(167) (168)
pGL3/E-Cadherin (-1008/+49) human	Dr. Morag Park, McGill University Montreal, Quebec	(169)
pGL3/N-Cadherin -1087	AG Menke, Universität Gießen	AG Menke

2.8.2 Expressionsplasmide

Tabelle 4: Verwendete Expressionsplasmide

Expressionsplasmid	Bezugsquelle	UniProt. Nr.	Referenz	Bemerkung	Konsensussequenz der Transkriptionsfaktoren Quelle: JASPAR (170)
pcDNA3.1 (+)	Thermo Fisher Scientific, #V79020	-			
pEGFP-C1	Clontech	-			
pEGFP/TGFβR1ca	AG Menke	P36897	(123)	gleiches <i>Insert</i> wie in pCMV/TGFβR1ca	
pCMV5/TGFβR1 HA/T20D	Jeffrey L. Wrana; Liliana Attisano	P36897	(123)	durch Mutation T20D konstitutiv aktiv	
pEGFP/TAK1	AG Menke; addgene, #44161	Q62073	(171)	konstitutiv aktiv; aus der Maus	
pEGFP/FER	Gerhard Wiche	P70451	(172)	<i>full length</i> ; aus der Maus	
pcDNA/LEF1	AG Menke; Alexander König	Q9UJU2	(173)	<i>full length</i>	
pcDNA3/p110α	Markus Thelen	P42336	(174)	Wildtyp	
pcDNA/PTEN	AG Menke, Alexander König	P60484	(175)		
pCMV3/ZEB1-t1	Sino Biological, #HG17705-UT	P37275-1	NM_001128128.2	Isoform 1, mittels Sequenzierung bestätigt	

2. Material

pCIneo/ZEB1	Michel M. Sanders	P37275-2	(176)	Isoform 2, mittels Sequenzierung bestätigt	
pCMV/ZEB2	AG Menke, Yukiko Ima-michi	O60315	(87), (175)		5'-CACCT-3'
pcDNA/Snail1	Sino Biological, #HG16844-UT	O95863	NM_005985.3	ursprünglich pCMV3-Vektor	
pcDNA/Slug-Flag	Sino Biological, #HG11196-CF	O43623	NM_003068.3	ursprünglich pCMV3-Vektor	 
pCMV3/Twist1-t1	Sino Biological, #HG17462-UT	Q15672	NM_000474.3		
pcDNA6.2/nLumino-DEST/FoxO3a (pnLum/FoxO3a)	Lars O. Klotz	O43524	(177)	Wildtyp; mit HA-tag; ursprünglich HA-FOXO3a WT von Addgene, #1787 verwendet	
pcDNA3.1/Cut-like 2	Alain Nepveu	O14529		full length AS 1-1426	
pMX-Cut-like1	Julian Downward	P39880	(178)	full length	

2.9 Kontrollreagenzien, Inhibitoren und Stimulanzen

Kontrollreagenz

Citronensäure-Monohydrat

Stammlösung 10 mM in ddH₂O

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Hersteller

Merck Millipore, Darmstadt

PanReac AppliChem, Darmstadt

Inhibitor

AMG-510

Stammlösung 10 mM in DMSO

GSK3 Inhibitor XIII

Hersteller; Bestellnummer; Literatur

MedChemExpress, Monmouth

Junction, NJ, USA; #HY-114277; (20)

Cayman Chemical, Ann Arbor,

2. Material

<i>Stammlösung 10mM in DMSO</i>	MI, USA; #21190; (117)
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen;
<i>Stammlösung 5M in PBS</i>	#L0505; (179)
MRTX849	MedCemExpress, Monmouth
<i>Stammlösung 1 mM in DMSO</i>	Junction, NJ, USA; #HY-130149; (180)
SB216763	Cayman Chemical, Ann Arbor,
<i>Stammlösung 100mM in DMSO</i>	MI, USA; #10010246;(118)

<u>Stimulanz</u>	<u>Hersteller; Bestellnummer</u>
TGFβ1	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
<i>Stammlösung 5 µg/ml in Citrat</i>	#100-21
Wnt3a	R & D Systems, Minneapolis, MN
<i>Stammlösung 50 mg/ml in PBS</i>	USA; #5036-WN

2.10 Antikörper

2.10.1 Primäre Antikörper

Verdünnung in 3 % BSA/TBS-T

Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper

Antigen	Verdünnung WB	Spezies (Klonalität)	Hersteller	Bestellnummer	Größe
β-Aktin	1:5000	Maus (mk)	Sigma-Aldrich	#A-5441	42 kDa
β-Aktin	1:10000	Kaninchen (pk)	GeneTex	#GTX109639	42 kDa
E-Cadherin	1:3000	Maus (mk)	BD Bioscience	#610182	120 kDa
E-Cadherin	1:5000	Kaninchen (mk)	Cell Signaling Technology	#3195S	120 kDa
N-Cadherin	1:500	Kaninchen (pk)	Takara Bio	#M142	130 kDa
Cadherin 11	1:500	Kaninchen (pk)	Invitrogen	#71-7600	115 kDa
Cut-like 1	1:500	Kaninchen (pk)	Santa Cruz	#sc-13024	21 kDa
Cut-like 2	1:500	Kaninchen (pk)	Sigma-Aldrich	#SAB2100508	154 kDa
ERK1/2	1:2000	Maus (mk)	Cell Signaling Technology	#4696	44 kDa + 42 kDa
FoxO3a	1:1000	Kaninchen (mk)	Cell Signaling Technology	#2497	82-97 kDa

2. Material

GAPDH	1:2000	Maus (mk)	Acris	#ACR001P	38 kDa
GAPDH	1:10000	Kaninchen (pk)	Rockland	#600-401-GV0	38 kDa
GFP	1:1000	Kaninchen (pk)	Santa Cruz	#Sc-8334	
LEF1	1:2000	Kaninchen (mk)	Cell Signaling Technology	#C12A5	48-55 kDa
Paxillin	1:5000	Maus (mk)	BD Bioscience	#610052	68 kDa
Slug	1:500	Kaninchen (mk)	Cell Signaling Technology	#9585	30 kDa
Snail1	1:1000	Kaninchen (mk)	Cell Signaling Technology	#3879	30 kDa
Twist-1	1:1000	Kaninchen (mk)	Protein Tech- nology	#25465-1-AP	26 kDa
Vimentin	1:500	Maus (mk)	Sigma-Ald- rich	#V-6630	53-67 kDa
Vimentin	1:1000	Kaninchen (mk)	Cell Signaling Technology	#5741	57 kDa
ZEB1	1:1000	Kaninchen (pk)	Sigma-Ald- rich	#HPA027524	130 kDa
ZEB2	1:1000	Kaninchen (pk)	Sigma-Ald- rich	#AV33694	137 kDa
p-ERK1/2 Thr202/Tyr204	1:3000	Kaninchen (pk)	Cell Signaling Technology	#9101	42 kDa + 44 kDa

2.10.2 Sekundäre Antikörper

Verdünnung in 3% BSA/TBS-T

Tabelle 6: Verwendete sekundäre Antikörper

Antigen	Verdünnung WB	Funktionsweise	Hersteller	Bestell-num- mer
α-Kaninchen IgG	1:5000	HRP-gekoppelt	Sigma-Aldrich	#A-6154
α-Kaninchen IRDye 800CW	1:600.000	Nahinfrarot-Fluo- reszenz	LI-COR Biosciences	#926-32211
α-Maus IRDye 680LT	1:600.000	Infrarot-Fluoreszenz	LI-COR Biosciences	#926-68021

2.11 Software

AnalySIS Version 3.2

SIS, Münster

Fusion Molecular Imaging Version 15.18

Vilber Lourmat, Eberhardzell

Gen5 2.00

BioTek, Bad Friedrichshall

GraphPad Prism Version 7.0

Graphpad Software, San Diego, CA, USA

3. Methoden

<i>ImageJ</i> 1.45b	U.S. National Institutes of Health, Bethesda, WA, USA
<i>Image Studio</i> Version 5.2	LI-COR Biosciences, Bad Homburg vor der Höhe
Microsoft Office 2016 für Windows	Microsoft, Redmond, WA, USA
MikroWin 2000 Version 4.41	Mikrotek Laborsysteme, Overath
NanoDrop 1000 Version 3.8.1	NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA
PAULA <i>Cell Imager</i>	Leica, Wetzlar

3. Methoden

Alle Methoden wurden nach dem etablierten Standardprotokoll der AG Menke durchgeführt. Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden in doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

3.1 Zellbiologie

3.1.1 Kultivierung von humanen, adhärenen Zellen

Die verwendeten Zellkulturmaterialien entsprechen der Standardqualität. Sterile Arbeiten in der Zellkultur wurden an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einer 100 mm Zellkulturschale mit 10 ml DMEM-Wachstumsmedium bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Ein Medienwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Bei einer Konfluenz des *Monolayers* von etwa 80-100 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 1 x CMF-PBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin-EDTA für 3-7 min im CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend erfolgte die Resuspension in 5 ml DMEM-Wachstumsmedium und Abzentrifugation über 3 min bei 1000 xg. Das Zellsediment wurde erneut resuspendiert und im Verhältnis 1:5- 1:20 in einer neuen Zellkulturschale subkultiviert.

Für die Behandlung der Zellen mit Inhibitoren und Stimulanzien sowie für transiente Transfektionen wurde die Zellzahl vor dem Aussäen mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden 10 µl der 10 ml Zellsuspension auf die Zählkammer pipettiert, bei zehnfacher Vergrößerung mikroskopiert und jeweils vier große Quadranten ausgezählt. Der sich daraus ergebende Mittelwert multipliziert mit dem Faktor 10⁴ entsprach der Zellzahl in einem Milliliter Zellsuspension.

3.1.2 Inhibition bzw. Stimulation von humanen, adhärenen Zellen

Bei einer Konfluenz des *Monolayers* von 50-60 % erfolgte die Behandlung der Zellen mit den unten aufgeführten Substanzen. Die Messung der Konfluenz wurde mithilfe der

3. Methoden

Confluence App des PAULA *Cell Imager* (Fa. Leica, Wetzlar) durchgeführt. Unmittelbar vor der Inhibition bzw. Stimulation erfolgte ein Medienwechsel. Im nachfolgenden Schema sind die verwendeten Substanzen in den jeweils verwendeten Konzentrationen aufgeführt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation über einen Zeitraum von 24 h oder 48 h.

Tabelle 7: Verwendete Konzentrationen von Inhibitoren bzw. Stimulanzen

Behandlung	Stammlösung	eingesetzte Konzentrationen
AMG-510	10 mM, in DMSO	1 nM; 2 nM ; 5 nM; 10 nM ; 25 nM; 50 nM
GSK3 Inhibitor XIII	10 mM, in DMSO	5 µM; 10 µM
LiCl	5 M, in PBS	10 mM; 25 mM; 50 mM
MRTX849	1 mM, in DMSO	1 nM; 2 nM ; 5 nM; 10 nM ; 25 nM; 50 nM
SB216763	10 mM, in DMSO	5 µM; 10 µM
TGFβ1	5 µg/ml, in Citrat	10 ng/ml
Wnt3a	50 mg/ml, in DMSO	50 ng/ml

3.1.3 Transiente Luziferase-Transfektion von H1299 mit PEI

Für ein 24-Well wurden 6×10^4 Zellen pro Well ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Wachstumsmedium erneuert und es erfolgte bei einer Konfluenz von 70-80 % die Transfektion mit dem Reagenz PEI. Die verwendeten Mengen und Volumina wurden in einem *Mastermix* angesetzt und sind der Tabelle 8 in Kapitel 3.1.5 zu entnehmen. Der Transfektionsansatz bestehend aus Plasmid-DNA, PEI und DMEM pur wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor er langsam auf die Zellen gegeben wurde. Nach 3 h erfolgte die Zugabe von 100 µl Wachstumsmedium pro *Well*. Die transfizierten Zellen wurden über 24 h inkubiert. Für die Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden zwei *Wells* mit jeweils 0,7 µg pEGFP transfiziert.

3.1.4 Transiente Luziferase-Transfektion von H23 und HCC-44 mit PEI

Für ein 24-Well wurden 1×10^5 Zellen H23 bzw. 3×10^4 Zellen HCC-44 pro Well ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Wachstumsmedium erneuert und es erfolgte bei einer Konfluenz von 70-80 % die Transfektion mit dem Reagenz PEI. Die verwendeten Mengen und Volumina wurden in einem *Mastermix* angesetzt und sind der Tabelle 8 in Kapitel 3.1.5 zu entnehmen. Als Expressionsplasmid wurde stets pcDNA3.1 eingesetzt. Das weitere Procedere entsprach dem Protokoll zur transienten Transfektion von H1299 mit PEI. Zusätzlich zur Zugabe des Wachstumsmediums nach 3 h wurden die Zellen mit den K-Ras-Inhibitoren AMG-510 oder MRTX849 standardmäßig mit den Konzentrationen 2 nM oder 10 nM inhibiert. In parallelen Arbeiten konnte bereits in Migrationsassays und Proliferationsassays gezeigt werden, dass beide Inhibitoren bei der Konzentration 10 nM

3. Methoden

wirksam sind. Die Kontrollbehandlung wurde mit DMSO durchgeführt. Für die Transfektionskontrolle wurden zwei *Wells* mit jeweils 0,7 µg pEGFP transfiziert.

3.1.5 Transiente Luziferase-Transfektion von H358 mit Lipofektamine 3000

Für ein 24-Well wurden $1,3 \times 10^5$ Zellen pro Well ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Wachstumsmedium erneuert und es erfolgte bei einer Konfluenz von 70-80 % die Transfektion mit dem Reagenz Lipofektamine 3000. Die verwendeten Mengen und Volumina wurden in einem *Mastermix* angesetzt und sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Im Ansatz 1 wurde pro *Well* die DNA in 25 µl Opti-MEM pipettiert und anschließend je 1 µl Lipofektamine 3000 Reagenz hinzugegeben. Im Ansatz 2 wurden pro *Well* 0,75 µl Lipofektamine 3000 zu je 25 µl Opti-MEM pipettiert. Beide Ansätze wurden getrennt gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde Ansatz 1 zu Ansatz 2 gegeben, intensiv gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Transfektionsansatz langsam auf die Zellen gegeben. Nach 6 h erfolgte ein Medienwechsel und die Inhibition mit den K-Ras-Inhibitoren AMG-510 oder MRTX849 in den angegebenen Konzentrationen. In parallelen Arbeiten konnte bereits in Migrationsassays und Proliferationsassays gezeigt werden, dass beide Inhibitoren bei der Konzentration 10 nM wirksam sind. Die transfizierten Zellen wurden über 24 h inkubiert. Für die Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden zwei *Wells* mit jeweils 0,7 µg pEGFP transfiziert.

Tabelle 8: Pipettierschema transiente Luziferase-Transfektion

Zelllinie	Reagenz	Transfektionseffizienz	Zellzahl	Reporterplasmid	Expressionsplasmid	Renilla	Ansatz in	Medium vorgelegt
H1299	2,25 µl PEI (1 µg/µl)	10-15 %	6×10^4	0,4 µg	0,3 µg	0,02 µg	50 µl DMEM	350 µl
H23	2,25 µl PEI (1 µg/µl)	5-10 %	1×10^5	0,4 µg	0,3 µg	0,02 µg	50 µl DMEM	350 µl
H358	0,75 µl Lipofektamine 3000 + 1 µl Plus Reagent	20-30 %	$1,3 \times 10^5$	0,4 µg	0,3 µg	0,02 µg	50 µl Opti-MEM	300 µl
HCC-44	2,25 µl PEI (1 µg/µl)	5-10 %	3×10^4	0,4 µg	0,3 µg	0,02 µg	50 µl DMEM	350 µl

3. Methoden

3.2 Proteinbiochemie

3.2.1 Herstellung von RIPA-Zelllysaten

Zur Isolation der Proteine aus den eukaryotischen Zellen wurden RIPA-Lysate hergestellt. Die Durchführung erfolgte auf Eis. Zunächst wurden die Zellen mit 4 °C kaltem 1 x CMF-PBS gewaschen. Die Menge des Lysepuffers richtete sich nach der Konfluenz und der Größe der Zellkulturschale. Für 60 mm Schalen wurden bei einer Konfluenz von 90 % 120 µl verwendet. Je Well eines 6-Well wurden bei einer Konfluenz von 40-90 % jeweils 50-100 µl Puffer eingesetzt. Die Zellen wurden in 1 x RIPA-Puffer mit 1:50 PI-Mix, 1:50 Phospho-Stopp und 1:400 *Okadaic Acid* lysiert und für 2 min auf Eis inkubiert. Das Ablösen des *Monolayers* erfolgte mittels Zellschaber. Danach wurden die Zellen durch 7maliges auf- und abziehen in einer 1 ml Spritze mit einer G26 Kanüle homogenisiert. Bei Lysatmengen unter 100 µl erfolgte das Homogenisieren über 3-5 min in einem mit Eis gekühltem Ultraschallbad. Im Anschluss wurde die Suspension über 15 min bei 4 °C mit 16.000 xg abzentrifugiert und der Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der Lysate erfolgte bei -80 °C.

3.2.2 Herstellung von Luziferase-Zelllysaten

Zur Analyse der lumineszierenden Proteine aus den transient transfizierten Zellen wurden Lysate in *Passive Lysis Buffer* hergestellt. Dafür wurde das Dual-Luziferase Reporter Assay System von Promega verwendet. Die Zellen wurden auf Eis mit 4 °C kaltem 1 x CMF-PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse in 80 µl 1 x PLB je *Well* eines 24-*Well* unter 15 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler. Das Lysat wurde bei -20 °C eingefroren und gelagert.

3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure-Assay

Zur quantitativen Bestimmung des Proteingehalts der RIPA-Lysate wurde der Bicinchoninsäure-Assay durchgeführt. Dieser basiert auf dem Prinzip, dass in alkalischem pH-Bereich an Peptidbindungen assoziierende Cu^{2+} Kupferionen zu Cu^+ reduziert werden. Die einwertigen Kupferionen bilden einen violetten Farbkomplex mit der BCA. Durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 562 nm konnte die Absorption quantitativ bestimmt werden. Die Proteinkonzentration wurde näherungsweise errechnet, indem die Absorptionswerte der Proben mit denen einer Eichkurve verglichen wurden. Zur Kalibrierung wurde eine Sättigungsreihe aus 0 µl, 2 µl, 4 µl, 6 µl, 8 µl, 10 µl und 12,5 µl einer 2 mg/ml BSA-Lösung als Doppelwerte in eine 96-*Well*-Platte pipettiert und die Volumina anschließend auf 20 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Die Lysate wurden im Verhältnis 1:10 in ddH₂O verdünnt und jeweils 20 µl für eine Doppelwertbestimmung aufgetragen. Danach wurden 180 µl des zuvor angesetzten BCA-Färbereagens

3. Methoden

hinzugegeben und vermischt. Es folgte eine Inkubation über 30 min bei 37 °C bevor die Messung der Proben im Absorptions-Reader ELx800 erfolgte.

3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

In einer diskontinuierlichen SDS-Page nach Laemmli konnten Proteine ausschließlich nach ihrer Masse aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurden dazu Trenngele mit dem prozentualen Polyacrylamidgehalt 8,5 %, 10 % und 12,5 % verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele ist der Tabelle 9 zu entnehmen. Die Trenngele polymerisierten über Nacht bei 4 °C. Die Sammelgele wurden vor dem Beladen gegossen und polymerisierten 30 min bei Raumtemperatur. Die Proben wurden mindestens im Verhältnis 1:5 mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Es wurden jeweils 50 µg Protein aufgetragen. Von den Proben der Luziferase-Lysate wurde keine Proteinkonzentration bestimmt. Stattdessen wurden jeweils 20 µl aufgetragen. Als Marker wurden 7 µl der *PageRuler Prestained Proteine Ladder* pipettiert. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingespannt und mit 1x SDS-Laufpuffer überschichtet. In den ersten 15 min wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Für die restliche Laufzeit von 1-2 h lag die Spannung bei 110 V.

Tabelle 9: Pipettierschema SDS-Page

	Trenngel	Trenngel		Trenngel	Sammelgel
	8,5 %	10 %		12,5 %	
	2 Gele	2 Gele	Gelgieß- ständer	2 Gele	2 Gele
30 % Acrylamid	2,3 ml	2,6 ml	13 ml	3,25 ml	380 µl
2 % Bisacrylamid	0,9 ml	1 ml	5 ml	1,2 ml	150 µl
3 M Tris pH 8,8	1 ml	1 ml	5 ml	1 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	-	-	-	380 µl
10 % SDS	80 µl	80 µl	400 µl	80 µl	30 µl
60 % Saccharose	-	-	-	-	750 µl
ddH ₂ O	3,6 ml	3,2 ml	16,5 ml	2,45 ml	1,3 ml
TEMED	8 µl	8 µl	40 µl	8 µl	4 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	250 µl	50 µl	40 µl
Trennbereich	150-50 kDa	130-30 kDa		100-20 kDa	-

3.2.5 Western Blot

In einem *Western Blot* wurden die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. In dieser Arbeit wurde das

3. Methoden

Prinzip des *Tank Blots* angewendet. Dafür wurde das Gel auf die Membran gelegt und zwischen Filterpapier und Schwämmen in eine Transferkammer eingespannt. Die Blotkammer wurde mit Transferpuffer aufgefüllt. Die Zeiten für den Proteintransfer variierten je nach Polyacrylamidgehalt des Gels, Proteingröße und Phosphorylierungszustand des Proteins. Der Transfer erfolgte bei 4 °C für 8,5 % Gele über 2,5 h bei 60 V, für 10 % Gele über 3 h bei 60 V und für 12,5 % Gele über 11 h bei 20 V. Im Anschluss wurde die Membran in VE-H₂O gewaschen. Zur Beurteilung des erfolgten Transfers wurde eine Färbung für 5 min in Ponceau-S-Lösung durchgeführt. Die Membran wurde gescannt und anschließend in 1 x TBS-T vollständig entfärbt.

3.2.6 Proteinfärbung mittels spezifischer Antikörper und Proteindetektion mittels Chemilumineszenz und Nah-Infrarot-Lumineszenz

Um Proteine spezifisch durch AK nachweisen zu können, erfolgte im ersten Schritt das Abblocken der Membran über 1 h in 5 % Milchpulver/TBS-Lösung bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran in TBS-T gewaschen und über mindestens 12 h bei 4 °C in einer 3 % BSA/TBS-T-Lösung mit der entsprechenden Verdünnung des AK (siehe Tabelle 5 Kapitel 2.10.1) auf einem Wippschüttler inkubiert. Danach wurde die Membran 3 x für 5 min in 1 x TBS-T gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle 6 Kapitel 2.10.2) in 3 % TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Danach erfolgte erneutes Waschen über 2 x 5 min in 1 x TBS-T und 1 x 5 min in TBS. Die Detektion der Proteine erfolgte entweder über HRP-gekoppelte AK durch Chemilumineszenz oder über Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte AK mittels Nah-Infrarot-Lumineszenz.

Für die Detektion mittels Chemilumineszenz wurde das SuperSignal™ West Pico Plus Substrat von Thermo Fisher Scientific verwendet. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol, was zu der Emission von Lichtquanten der Wellenlänge 428 nm führt. Die ECL-Lösung verstärkte diese Emission, wodurch sie quantitativ messbar wurde. Die ECL-Lösung wurde in einer lichtgeschützten Box im Verhältnis 1:1 aus Luminol/*Enhancer*-Lösung und stabiler Peroxid-Lösung angesetzt. Anschließend wurde die Membran für 5 min in der ECL-Lösung inkubiert. Die Detektion erfolgte über den CCD-Sensor des Fusion SL4-3500.WL. Die Signale wurden regulär über einen Zeitraum von 30 s bis 6 min bei *Full Resolution* oder *High Sensitivity* aufgenommen.

Für die Detektion mittels Nah-Infrarot-Lumineszenz wurden an AK gekoppelte IRDye-Fluoreszenzfarbstoffe durch Laser der Wellenlänge 680 nm im roten Kanal oder 800 nm im grünen Kanal angeregt. Das emittierte Licht wurde mittels LI-COR Odyssey Sa oder CLx Scannern detektiert. Bei diesem Prinzip konnten zwei verschiedene Proteine

3. Methoden

simultan betrachtet werden, indem zwei gegen verschiedene Spezies gerichtete Primärantikörper verwendet wurden.

Für die quantitative Auswertung wurde eine Densitometrie mit der Software Image Studio Version 5.2 durchgeführt. Dabei wurde die Bandenstärke der jeweiligen Proteine, auf die der Beladungskontrolle normiert. Die Normierung der densitometrischen Messung phosphorylierter Proteine hingegen erfolgte auf die Bandenstärke des jeweiligen nicht phosphorylierten Proteins.

3.2.7 Dual Luziferase Reporter Assay

Für den Dual Luziferase Reporter Assay wurde das Dual-Luziferase Reporter Assay System von Promega nach Herstellerangaben verwendet. In diesem Assay wurde die relative Promotoraktivität bestimmter Gene erfasst. Die beiden Reportergene *Firefly* und *Renilla* codieren für Luziferasen, deren Biolumineszenz mittels Luminometer erfasst wurde. Das pRL-TK-Plasmid codiert dabei für die Luziferase aus *Renilla reniformis* und diente als interne Kontrolle der Normierung der Transfektionseffizienz. Die Promotoren, deren Aktivität erfasst werden sollte, waren an die *Firefly*-Luziferase aus *Photinus pyralis* kloniert. Bei der Transfektion wurden Reporterplasmid, Expressionsplasmid und Kontrollplasmid simultan transfiziert. Die experimentellen Ansätze wurden als Doppelbestimmungen in mind. drei unabhängigen Transfektionen durchgeführt. Pro Transfektionsansatz wurden zwei *Wells* ausschließlich mit je 0,7 µg des Expressionsplasmides pEGFP-C1 transfiziert. Dies diente als Transfektionskontrolle und als Wert für den unspezifischen Hintergrund. Das Plasmid pcDNA3.1 codiert für kein Protein und diente der Normierung auf die Grundaktivität des Promoters. Durch diesen methodischen Aufbau des Luziferase-Assays werden experimentelle Ungenauigkeiten wie eine unterschiedliche Zellzahl; Transfektionseffizienz und Effizienz der Lyse minimiert. Die eingesetzten Mengen und Volumina sind der Tabelle 8 in Kapitel 3.1.5 zu entnehmen. Vor der Messung erfolgte eine Zentrifugation der Lysate über 20 s bei 20.000 xg. 40 µl des Überstandes wurden in eine schwarze 96-*Well*-Platte pipettiert. Die Detektion der Biolumineszenz erfolgte mittels Luminometer Centro XS3 LB 960. Während der Messung wurden über einen Autoinjektor jeweils 40 µl Luziferase Assay Reagenz II und später 40 µl *Stop & Glo*® Reagenz hinzugegeben.

In der Auswertung wurden die Werte für den unspezifischen Hintergrund von den Werten der Luziferasen subtrahiert. Die relative Luziferaseaktivität entsprach dem Verhältnis von *Firefly*-Luziferase zur *Renilla*-Luziferase. Die relative Luziferaseaktivität wurde auf die pcDNA3.1, bzw. auf den DMSO-Wert normiert, welche gleich 1 gesetzt wurde. Der gemessene Hintergrund lag für den Luziferase-Wert im Bereich von 15-40 Lumeneinheiten. In den Ergebnissen abgebildet werden Konstrukte, deren Luziferase-Werte bei \geq

3. Methoden

300 Lumeneinheiten lagen. Die Luziferase-Werte lagen i.d.R. zwischen 1.500 und 40.000 Lumeneinheiten. Es wurden die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) berechnet. Der Mittelwert entspricht der relativen Promotoraktivität des auf pcDNA3.1 normierten Verhältnis von *Firefly*-Luziferase-Aktivität zu *Renilla*-Luziferase-Aktivität. Zur Abschätzung der Transfektionseffizienz wurde in einem gesonderten Ansatz der leere pEGFP-Vektor verwendet und die Anzahl grün-fluoreszierender Zellen als prozentualer Anteil der Gesamtzellzahl bestimmt. Folgende Grenzwerte wurden in dieser Arbeit für eine Reprimierung bzw. Aktivierung der relativen Promotoraktivität festgelegt: Für die in den Kapiteln 4.2 und 4.4 beschriebenen Luziferase-Assays, in denen mit einer Überexpression von Expressionsplasmiden gearbeitet wurde, wurde $\leq 0,65x$ bzw. $\geq 1,9x$ definiert (H1299 und H358). Für die in den Kapiteln 4.3 und 4.6 beschriebenen Luziferase-Assays in denen mit K-Ras-Inhibition gearbeitet wurde, wurde $\leq 0,7x$ bzw. $\geq 1,6x$ (H358) und $\leq 0,7x$ bzw. $\geq 1,9x$ (HCC-44 und H23) definiert. Bei einem Wert, der maximal $0,1x$ unter bzw. über dem Grenzwert liegt, wird im Folgenden von einer tendenziellen Erhöhung bzw. Verminderung der relativen Promotoraktivität gesprochen. Die Grenzwerte für die Zelllinie H358 wurden großzügiger gewählt, weil hier die Standardabweichungen deutlich geringer, die Ergebnisse demnach besser reproduzierbar und kleinere Abweichungen messbar waren. Alle Experimente mit den Zelllinien H1299 und H358 wurden unabhängig voneinander i.d.R. dreimal durchgeführt. Konstrukte, deren Ergebnis innerhalb des zuvor für diese Arbeit festgelegten Grenzwertintervalles lagen, wurden z. T. nur zweimal transfiziert. Alle Experimente mit den Zelllinien H23 und HCC-44 wurden unabhängig voneinander in der Regel dreimal durchgeführt. Abweichende Stichprobenzahlen sind entsprechend aufgeführt.

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* TOP10

Der Ansatz für die Transformation bestand aus 200 μ l auf Eis aufgetauten, kompetenten *E. coli* TOP10, 0,2 μ g des Plasmids und 100 μ l 4 °C kaltem TCM-Puffer und wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Wärmebehandlung für 1 min bei 42 °C, gefolgt von 1 min auf Eis. Es wurden 700 μ l LB-Medium (Raumtemperatur) hinzugefügt und der Transformationsansatz für 45 min bei 37 °C und 650 rpm inkubiert. Anschließend wurden 200 μ l auf eine mit dem entsprechenden Selektionsmedium versetzte LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein einzelner Klon von der Platte in 5 ml LB-Medium überführt, mit Selektionsantibiotikum versetzt und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

3. Methoden

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolation der Plasmid-DNA

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Plasmid Midi Kit von Qiagen nach Herstellerangaben. Die Aufreinigung der DNA wurde mit dem NucleoBond *Finalizer* von Macherey-Nagel nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und die DNA in 500 µl 1 x TE-Puffer eluiert. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop ND-1000 bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Ab einem Verhältnis des Absorptionwertes 260 nm zu 280 nm von $> 1,9$ galt die DNA als rein.

3.4.2 Restriktionsverdau

Die Plasmid-DNA wurde mittels Restriktionsendonukleasen hydrolysiert, um die korrekte Länge des Inserts zu überprüfen. Der Restriktionsansatz bestand aus 0,5 µg Plasmid, 2,5 U Restriktionsenzym (10 U/µl) und 1 µl des dazugehörigen 10 x Puffers. Der Ansatz wurde mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

3.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

In der Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der DNA nach Größe und Ladung. Dazu wurde ein 1 % Agarosegel aus 0,8 g Agarose und 80 ml 1 x TAE-Puffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf 45 °C wurden 10 µl *Midori Green Advance* hinzugefügt. Das Gel verfestigte sich beim Abkühlen über mindestens 45 min und wurde anschließend mit 1 x TAE-Puffer beschichtet. Für die Proben wurden 0,5–1 µg Plasmid-DNA im Verhältnis 1:5 mit 10 x Agarose-Ladepuffer angesetzt und mit ddH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Als Marker wurden 5 µl der 1 kb DNA *ladder* aufgetragen. Die Elektrophorese lief für 1 h bei 80 V. Die Detektion des zwischen die DNA interkalierenden *Midori Greens* erfolgte mit dem UV-Transilluminator *GeneFlash*.

3.5 Statistik

Alle Experimente, die mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt wurden, wurden statistisch ausgewertet. Für die Luziferase-Assays wurden Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) berechnet. Die Werte wurden auf zwei Nachkommastellen gerundet. Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit wurde die Abbildung auf die Darstellung von MW+ SD beschränkt. Die Auswertung erfolgte mittels *one sample* t-Test, bzw. mittels zweiseitigem t-Test mit vorheriger Testung auf eine Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Dabei wurden folgende Signifikanzniveaus unterschieden: $p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$.

4. Ergebnisse

4. Ergebnisse

4.1 Morphologische Betrachtung der verwendeten NSCLC-Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden aus dem Material verschiedener NSCLC-Proben etabliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Analyse auf folgende Adenokarzinomzelllinien beschränkt: H1299, H23, HCC-44 und H358. H1299 wurde aus einem Lymphknoten abgeleitet. H358 entspricht dem Subtyp des bronchoalveolären Karzinoms. H358- und H23-Zellen tragen heterozygot, HCC-44 trägt homozygot, die aktivierende *KRAS*-Punktmutation G12C. H1299 trägt keine *KRAS*-Mutation, ist aber heterozygot für die aktivierende *NRAS*-Punktmutation Q61K (siehe Kapitel 2.5.2).

Dargestellt sind Phasenkontrastaufnahmen der Zelllinien H1299, H359, HCC-44 und H23 mit einer Zellkonfluenz von etwa 50 % (Abb. 1 A-D), bzw. 100% (Abb. 1E-H). Die Zellen der verschiedenen Zelllinien zeigen deutliche Unterschiede in ihrer mikroskopischen Morphologie. Die Zellen der Zelllinie H1299 haben einen polygonalen Zellkörper mit großem, zentralem Zellkern (Abb. 1 A+E). Die Zelllinie H358 ist epithelialer und wächst gruppiert in Zellverbänden. Die Zellkörper sind v. a. an den Randbereichen der Zellgruppen spindelförmig mit zentral gelegenem Zellkern. (Abb. 1 B+F). Die Zellen der Zelllinie HCC-44 sind am größten. Bei mittlerer Konfluenz bilden sich multiple elongierte Zellausläufer, die die mesenchymale Morphologie der HCC-44-Zellen bedingen. (Abb. 1 C+G). Die Morphologie der Zelllinie H23 ist verglichen mit den anderen in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sehr heterogen. Der zelluläre Pleomorphismus innerhalb der Zelllinie zeigt sich in einer deutlichen Variationsbreite der Größe der einzelnen Zelle sowie des Zellkerns. Es sind rundliche H23-Zellen, die untereinander Zell-Zell-Kontakte ausbilden, ebenso wie kleinere fibroblastenähnliche, spindelförmige H23-Zellen mit multiplen z. T. langen Zellausläufern abgebildet (Abb. 1 D+H).

Die in Abb. 1 A-H jeweils erkennbaren hellen abgekugelten Zellen, liegen auf der adherenten Zellschicht und stellen zum einen Teil in Suspension gegangene Zellen und zum anderen Teil bereits abgestorbene Zellen dar.

4. Ergebnisse

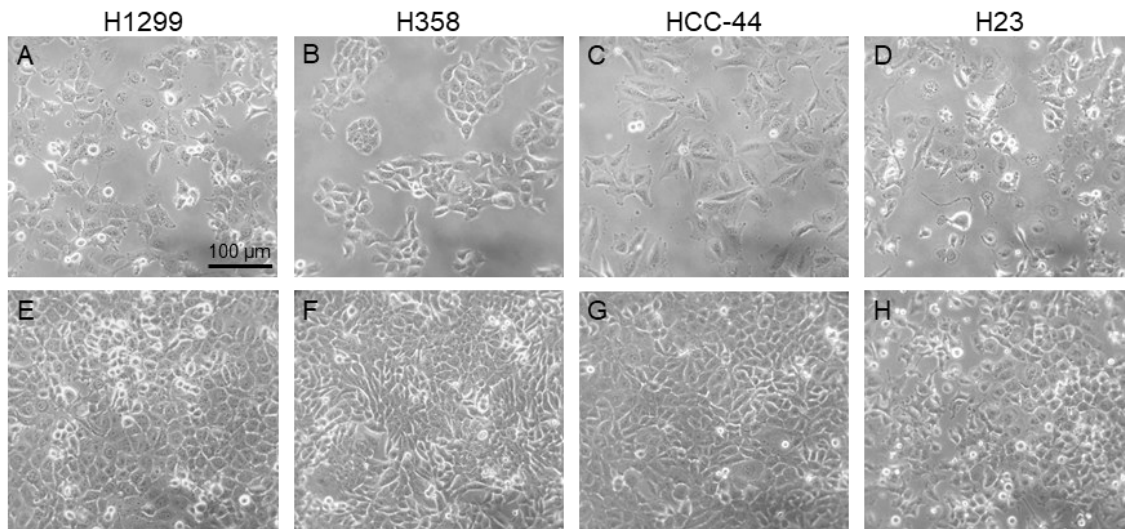


Abb. 1 Phasenkontrastaufnahmen der verwendeten NSCLC-Zelllinien.

Dargestellt sind Ausschnitte von Phasenkontrastaufnahmen der Zelllinien H1299, H359, HCC-44 und H23. Die zelluläre Konfluenz beträgt ca. 50 % (A-D), bzw. 100 % (E-H).

4.2 Einfluss von Transkriptionsfaktoren und Kinasen auf die Regulation der Promotoraktivität von Reporterkonstrukten in der Zelllinie H1299

Das Ziel dieser Arbeit ist die Analyse der Rolle von onkogenem K-Ras und TGF β 1 in der EMT-assoziierten Genregulation des NSCLC. Dafür wurde die Regulation der Promotoraktivität verschiedener Reporterkonstrukte durch die Überexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren, Kinasen und einer Phosphatase mittels Dual Luziferase Reporter Assay untersucht.

Die verwendeten Reporterplasmide enthielten endogene Promotorsequenzen oder Motive für Bindungselemente von Transkriptionsfaktoren, die vor die cDNA der *Firefly*-Luziferase aus *Photinus pyralis* kloniert wurden. Die Expressionsplasmide codieren jeweils für Signalmoleküle, die nach erfolgreicher Transfektion der Plasmide überexprimiert werden. Bei der Transfektion wurde ein Reporterplasmid zeitgleich mit je einem Expressionsplasmid oder pcDNA3.1 und dem Kontroll-Reporterplasmid pRL-TK cotransfiziert. Das Kontrollplasmid pRL-TK codiert für die *Renilla*-Luziferase aus *Renilla reniformis* unter der Kontrolle des konstitutiv-aktiven Promotors der Thymidin Kinase (TK) und dient als interne Kontrolle zur Normierung der Transfektionseffizienz. Das Plasmid pcDNA3.1 ist der leere Vektor und codiert für kein Signalprotein; die entsprechenden Ansätze dienen der Normierung auf die zelluläre Grundaktivität des jeweiligen Promotors. Diese relative Promotoraktivität wurde in den Auswertungen gleich 1 gesetzt. Die Inkubation nach Transfektion erfolgte über 24 h. Die experimentellen Ansätze wurden als Doppelbestimmungen in mind. drei unabhängigen Transfektionen durchgeführt. Die in den Abbildungen dargestellten MW + SD der relativen Promotoraktivitäten entsprechen dem auf

4. Ergebnisse

pcDNA3.1 normierten Verhältnis von *Firefly*-Luziferase-Aktivität zu *Renilla*-Luziferase-Aktivität.

Die *Dual Luziferase Reporter Assays* wurden wie in den Kapiteln 3.1.3 und 3.2.7 beschrieben durchgeführt. In dieser Arbeit wurde für die H1299-Zellen eine Veränderung der Messwerte um $\geq 1,9x$ bzw. eine Reduktion $\leq 0,65x$ als Grenzwert für eine Erhöhung bzw. Reprimierung der relativen Promotoraktivität festgelegt.

Reporterplasmide mit endogenen Promotorsequenzen der Gene folgender Proteine wurden verwendet: c-MYC, Snail1, Slug, p21Cip1 (*cyclin-dependent kinase inhibitor protein 1*), Cyclin D1, MnSOD (Mangan-Superoxid-Dismutase), G6Pase (Glucose-6-Phosphatase), NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*), MMP9 (Matrixmetalloproteinase 9).

Außerdem wurden synthetische Reporterplasmide mit z.T. repetitiven Sequenzen der Bindungselementen der folgenden Transkriptionsfaktoren verwendet: Ets (*Erythroblast transformation specific*), AP1 (*Activator protein 1*), Ets-AP1, NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), C/EBP (*CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine*), TCF (*T-cell factor*) (TOPflash-Reporter), Smad/TGFβ-Bindungselement (3TP-Lux-Reporter), SRE (*serum response element*).

Zur Überexpression folgender Proteine wurden Expressionsplasmide eingesetzt: ZEB1 (*Zinc finger E-box-binding homeobox 1*) in den Isoformen 1 und 2, ZEB2, Snail1 und Slug, Twist1, LEF1 (*lymphoid enhancer factor*), FOXO3a (*Forkhead-Box-Protein O3a*), Homöobox-Proteine Cut-like 1 und Cut-like 2, TGFβR1 ca (TGFβ-Rezeptor 1 konstitutiv aktiv), TAK ca (TGFβ-aktivierte-Kinase konstitutiv aktiv), p110α (katalytische Untereinheit α der Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-Kinase), die Tyrosin-Kinase Fer sowie die Phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*).

Die Mehrheit der Ergebnisse von Fer und PTEN war gegenüber den Kontrollen nicht verändert und wird daher im Ergebnisteil nicht abgebildet.

Im ersten Schritt wurden die Sequenzmotive und Bindestellen der verwendeten Reporterplasmide näher betrachtet. Hierzu wurde unter Verwendung der Datenbanken Nukleotide BLAST (181), PubMed (182) und JASPAR (170) eine *in silico* Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 10 zusammenfassend dargestellt.

4. Ergebnisse

Tabelle 10: Sequenzmotive und Bindestellen der verwendeten Reporterplasmide

Reporterplasmid	DNA-Sequenz nBLAST	Transkriptionsfaktor-Bindestellen (Konsensussequenzen in der Fußnote)	Referenz
pTopflash	synthetisch	2 Sets a 3 TCF/Lef ¹ -Bindestellen (Wildtyp), davon ein Set invers orientiert, ein WRE ²²	(150)
p3TPLux	synthetisch	3 AP1 ² -Bindestellen, davon eine invers orientiert (Vervielfältigung des Bereichs -73 bis -42 des humanen Kollagen-Gens) und ein TGFβ-Bindungselement, welches 3 AP1-ähnliche Bindestellen enthält (der Bereich -636 bis -740 des humanen PAI-Promotors)	(151)
pGL3-c-myc Del.1	-2788/-29 Del-1 (XmnI ->PvuII) Chr. 8 (q24.21)	2 TCF/Lef ¹ -Bindestellen, die (APC)- und β-Catenin-Response-Elemente des Promotors sind deletiert; c-MYC Bindesequenz: 5'-CACGTG-3', zwei WRE ²²	(152)
pGL3-NFκB	synthetisch	3 NFκB ³ -Motive; 2 davon invers orientiert: NFκB Bindesequenz: 5'-GGGACTTCC-3'	(154)
pAP1(PMA)-TA-Luc	synthetisch	vier Kopien der AP1 ² -Bindestelle	Clontech/brab Bio Company (155)
pGL3-Cyclin D1 human (-962)	-962/+134 Chr. 11 (q13)	3 Ets ⁴ -Bindestellen, eine AP1 ² -Bindestelle, ein CREB ⁵ -Motiv, eine TCF/Lef ¹ -Bindestelle und vier potenzielle in nur einer Base abweichende TCF/Lef ¹ -Bindestellen; außerdem u.a. ein E-Box ⁶ -Element, zwei Sp1 ⁷ - und mind. drei NFκB ³ -Bindestellen, ein WRE ²² und vier in nur einer Base abweichende WRE ²²	(156) (183)
pGL3-SRE.L	synthetisch	2 Kopien von SRE ⁸ -Bindungselementen aus dem c-Fos-Gen	(157)
pGL3-NFAT	synthetisch	3 Tandem-Wiederholungen eines Fragments des IL-2-Promotors mit NFAT ⁹ -Bindestellen	(158)
pGL4-luc2P/C/EBP-RE/minP/Hygro	synthetisch	5 C/EBP ¹⁰ -Bindestellen	Direktauskunft des Herstellers Promega, un- veröffentlicht
pGL3-MnSOD luc	-3340/+260; beinhaltet die 5'-Region, Exon 1 und anteilig Intron 1 Chr. 6 (q25.3)	2 AP1 ² -, 3 AP2 ¹¹ -, 6 Sp1 ⁷ -Bindestellen, ein CREB ⁵ - und 2 NFκB ³ -Motive sowie eine dem CREB ⁵ ähnliche Sequenz (TPA-sensitiv) und eine inverse DBE/FOXO ¹² -Bindestelle	(159) (160)
pGL3-Glucose-6-	-1227/+57 Chr. 17 (q21.31)	u.a. 3 AP1 ² -, 5 AP2 ¹¹ -Bindestellen sowie 4 C/EBP ¹⁰ -, 3 CREB ⁵ -, 2 IRE/FOXO ¹³ - und ein	(161) (184)

4. Ergebnisse

Phosphatase luc		GRE ¹⁴ -Element wurden für die im Plasmid enthaltene Sequenz beschrieben	
pGL4-Ets-AP1	synthetisch	3 Ets ⁴ - und 3 AP1 ² -Bindesstellen	(162)
pGL3-Ets	-962/+134 des Cyclin D1-Promotors Chr. 11 (q24.3)	3 Ets ⁴ -Bindestellen, eine AP1 ² -Bindestelle, ein CREB ⁵ -Motiv, eine TCF/Lef ¹ -Bindestelle	(156)
pGL2-MMP9	mind. -693/+36 (Insert 900 bp) Chr. 20 (q13.12)	ein NFκB ³ -Motiv, eine Sp1 ⁷ - und 2 AP1 ² -Bindestellen; eine Ets ⁴ -Bindestelle sowie ein TGFβ-Bindungselement ¹⁶	(163)
pGL4.10-Claudin-1	Mind. -1303 bis -262 Chr. 3 (q28)	u.a. 2 TCF/Lef ¹ -Bindestellen sowie 4 GATA ¹⁶ -Sequenzen	(164)
pGL2/p21 promoter-Luc	-7698/-5363 Chr. 6 (p21.2)	2 potentielle VDRE ¹⁷ -Sequenzen, außerdem beschrieben für den p21-Promotor ist u.a. ein C/EBP ¹⁰ -Element, Sp1 ⁷ -Bindestellen, mehrere p53 ¹⁸ -Bindestellen	(165) (166)
pGL2/Snail	-1045/-56 Chr. 20 (q13.13)	u.a. NFκB ³ -, HRE ¹⁹ - und SMAD ²⁰ -Bindemotive und ein E-Box ⁶ -Element	(167) (185)
pGL2/Slug	-908/-2 Chr. 8 (q11.21)	3 von 7 beschriebenen E-Box ⁶ -Elementen und eine TGFβ-sensitive Sp1 ⁷ -Bindestelle liegen innerhalb der vom Plasmid codierten SNAI2-Reportersequenz; darüber hinaus sind für den SNAI2-Promotor AP1 ² -, SMAD ²⁰ - und TCF/Lef ¹ -Bindestellen beschrieben	(167) (77) (186) (168)
pGL3/E-Cadherin (-1008/+49) human	-1008/+49 Chr. 16 (q22.1)	3 E-Box ⁶ - und ein E-pal ²¹ -Element, 2 Sp1 ⁷ -sowie 2 AP2 ¹¹ -Bindestellen	(169) (77)
pGL2/N-Cadherin -1087	-1087/+86 Kpn-Verdau Chr. 18 (q12.1)	u.a. ein E-Box ⁶ -Element und 2 SMAD ²⁰ -Bindestellen	AG Menke (187)

¹ TCF/Lef-Konsensussequenz 5'-CCTTTGATC-3'

² AP1-Konsensussequenz 5'-TGAG/CTCA-3'

³ NFκB-Konsensussequenz 5'-GGRNYYCC-3'

⁴ Ets-Konsensussequenz 5'-GGAA/T-3'

⁵ CREB-Konsensussequenz 5'-TGACGTCA-3'

⁶ E-Box-Konsensussequenz 5'-CANNTG-3'

⁷ Sp1-Konsensussequenz (entspricht GC-Box-Element) 5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3'

⁸ SRE-Konsensussequenz 5'-CC(A+T)6GG-3'

4. Ergebnisse

⁹ NFAT-Konsensussequenz 5'-AGGAGGAAAACTGTTTC-3'

¹⁰ C/EBP-Konsensussequenz 5'-T(TG)NNGNAA(TG)-3',

¹¹ AP2-Konsensussequenz 5'-GCCNNGGC-3'

¹² DBE/FOXO-Konsensussequenz 5'-TT(G/A)TTTAC-3'

¹³ IRE/FOXO-Konsensussequenz 5'-TT(G/A)TTTTG-3'

¹⁴ GRE-Konsensussequenz 5'-AGAACANNNTGTTCT-3'

¹⁵ TGF β -Bindungselement 5'-GNNTTGGNGN-3'

¹⁶ GATA-Konsensussequenz 5'-(T/A)GATA(A/G)-3'

¹⁷ VDRE-Konsensussequenz 5'-AGGTCA-3'

¹⁸ p53-Konsensussequenz, ein Tandem aus zwei palindromischen Sequenzen, 5'-RRRCA/TA/TGYYY-3'

¹⁹ HRE-Konsensussequenz 5'-A/G CGTG-3' mit einer hochvariablen Ankersequenz

²⁰ SMAD-Konsensussequenz 5'-GTCTAGAC-3'

²¹ E-pal-Element in E-Cadherin 5'-CACCTGCAGGTG-3'

²² WRE-Konsensussequenz 5'-CTTTGAT-3'

Abkürzungen: Purinbase [R], Pyrimidinbase [Y], beliebiges Nukleotid [N].

4.2.1 Nachweis der Proteinexpression in Luziferase-Lysaten

Zunächst wurde getestet, ob nach transienter Transfektion wie im Methodenteil beschrieben, das ektop exprimierte Protein in den Luziferase-Lysaten mittels Western Blot nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis wurde mittels Western Blot exemplarisch für die im Nachfolgenden aufgeführten Proteine geführt, da hierfür zum Zeitpunkt der Arbeit bereits spezifische Antikörper etabliert waren: ZEB1 Isoformen 1 und 2, ZEB2, Snail1, Slug, Twist1, LEF1, FOXO3a, Cut-like 1, Cut-like 2.

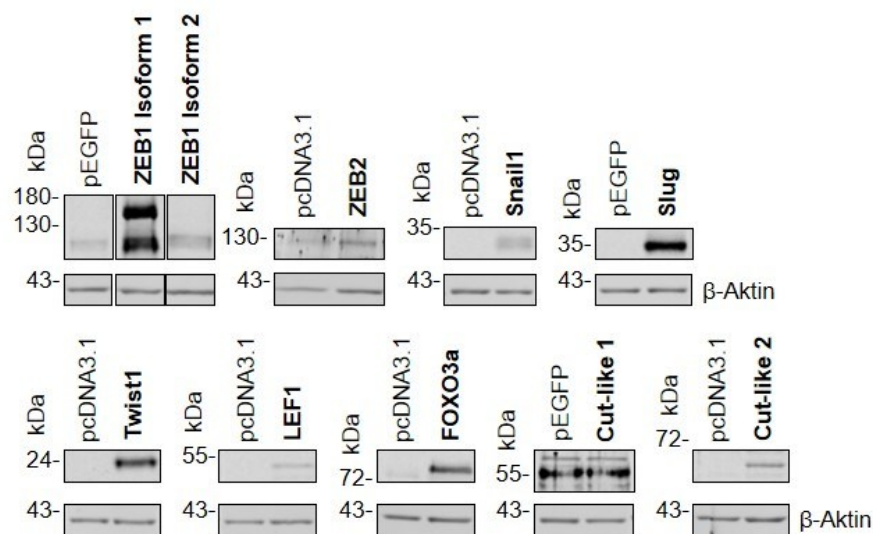


Abb. 2 Nachweis der Proteinüberexpression in Luziferase-Lysaten.

Zur Analyse der ektop exprimierten Proteine in transient transfizierten H1299-Zellen, wurden Lysate mit *Passive Lysis Buffer* hergestellt. Die Lysate wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und im Western-Blot-Verfahren analysiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels spezifischer Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper. Als Negativkontrolle dienen Lysate von mit pEGFP bzw. mit dem Leervektor pcDNA3.1 transfizierten H1299-Zellen. Als Beladungskontrolle dient der Nachweis von β -Aktin. Die Nachweise wurden exemplarisch mit $n=1$ durchgeführt.

In Abb. 2 ist dargestellt, dass die Expressionsplasmide ZEB1 Isoform 1 (berechnete molekulare Masse 124 kDa), Slug (berechnete molekulare Masse 30 kDa), Twist1 (berechnete molekulare Masse 26 kDa) und FOXO3a (berechnete molekulare Masse 90 kDa) nach transienter Transfektion in H1299-Zellen deutlich exprimiert werden. Das Protein

4. Ergebnisse

ZEB1 Isoform 1 ist als Doppelbande nicht nur bei 124 kDa nachweisbar, sondern darüber hinaus auch bei etwa 170 kDa. Diese Bande stellt wahrscheinlich ein posttranslational modifiziertes Produkt dar. Die Expressionsplasmide ZEB1 Isoform 2 (berechnete molekulare Masse 124 kDa), ZEB2 (berechnete molekulare Masse 136 kDa), Snail1 (berechnete molekulare Masse 29 kDa), LEF1 (berechnete molekulare Masse 37 kDa) und Cutlike 2 (berechnete molekulare Masse 155 kDa) hingegen werden nach Transfektion von den H1299-Zellen in geringerem Ausmaß exprimiert. Verglichen mit der Kontrollbehandlung lässt sich aber auch hier in allen Fällen eine Expression detektieren. Das Protein Cutlike 2 lässt sich in der Abbildung allerdings nicht auf Höhe der berechneten Molekularmasse, sondern bei etwa 60 kDa detektieren, da das verwendete Plasmid nur für ein verkürztes Protein codiert (siehe Kapitel 2.8.2). Das Protein Cutlike 1 (berechnete molekulare Masse 164 kDa) wird nach Transfektion des Expressionsplasmids in den H1299-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle nicht vermehrt exprimiert.

Größtenteils lassen sich die Banden nicht exakt auf der zu erwartenden Höhe der äquivalenten endogenen Proteine detektieren, da die exprimierten Proteine u. a. mit zusätzlichen Tags versehen sind.

Zusammenfassend kann mithilfe des Western-Blot-Verfahrens gezeigt werden, dass eine Expression der von den Expressionsplasmiden codierten Proteine im Rahmen der transienten Luziferase-Assays bei den exemplarisch ausgewählten Proteinen (bis auf Cutlike 1) nachweisbar war.

4.2.2 Einfluss von Transkriptionsfaktoren und Kinasen auf die Regulation der Reporter für Ets- und AP1-Bindungselemente

In Abb. 3 sind die Aktivitäten der Reporter für Ets- und AP1-Bindestellen grafisch mit Abbildung der Einzelwerte dargestellt.

Der Transkriptionsfaktor ZEB1 Isoform 1 steigert die relative Aktivität der Ets- ($6,42 \pm 1,72$), AP1- ($18,58 \pm 13,78$) und Ets-AP1- Reporter ($10,14 \pm 2,87$).

Die Überexpression von ZEB1 Isoform 2 erhöht in drei von vier Versuchsansätzen die Aktivitäten der Reporter für Ets- ($2,43 \pm 1,28$) und AP1-Bindungselemente ($2,64 \pm 1,51$). In jeweils einem der Experimente davon steigert ZEB1 Isoform 2 die Reporteraktivitäten so stark, dass die Standardabweichungen hier sehr groß sind. Darüber hinaus wirkt ZEB1 Isoform 2 tendenziell aktivierend auf den Ets-AP1-Reporter ($1,80 \pm 0,01$).

4. Ergebnisse

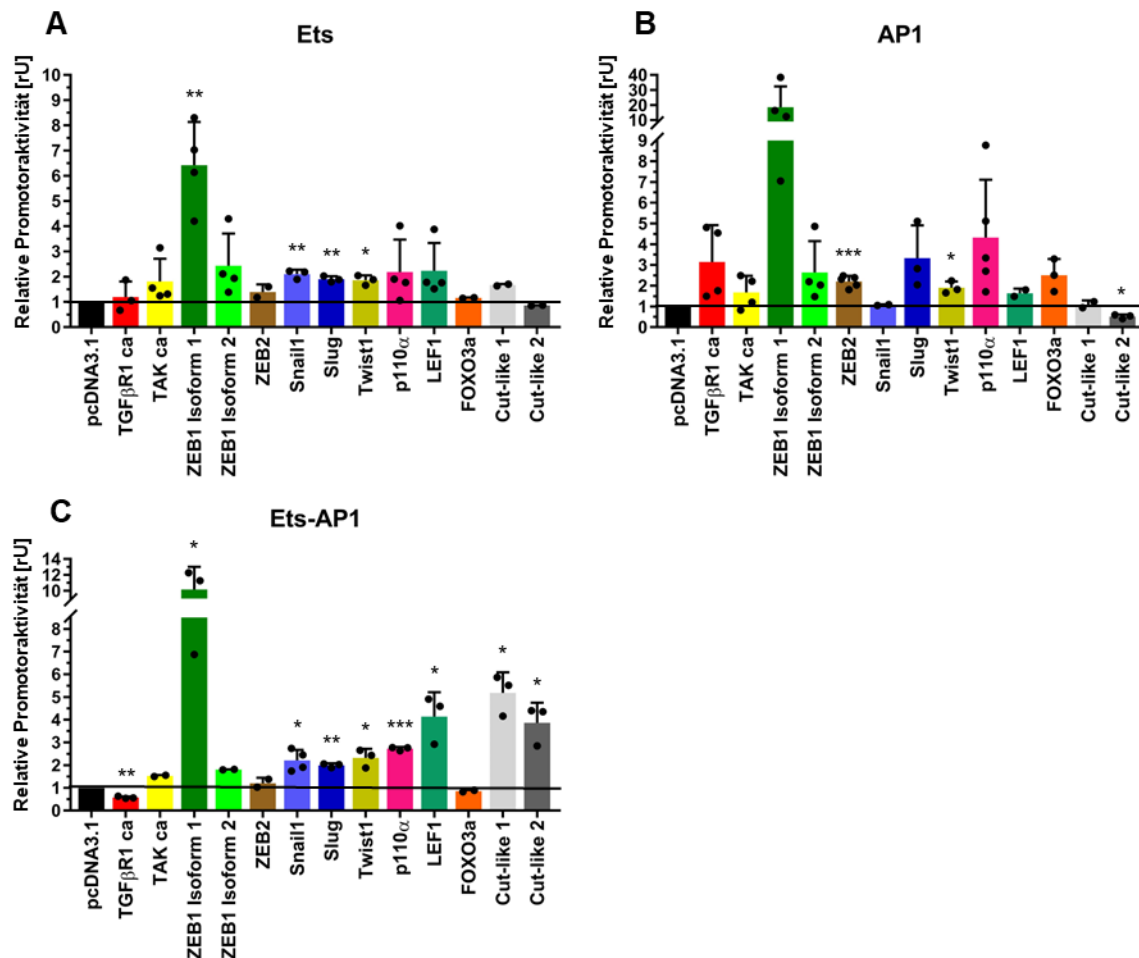


Abb. 3: Regulation der relativen Promotoraktivität von Ets- und AP1-Bindungselementen.

H1299-Zellen wurden zeitgleich mit einem Firefly-Promotorkonstrukt, einem Expressionsplasmid oder pcDNA3.1 und dem Renilla-Reporterkonstrukt pRL-TK cotransfiziert. Die Inkubation erfolgte über 24 h. Die Luziferase-Transfektion erfolgte jeweils in Doppelwerten. Die dargestellten relativen Promotoraktivitäten entsprechen dem auf pcDNA3.1 normierten Verhältnis von Firefly-Luziferase-Aktivität zur Renilla-Luziferase-Aktivität. Abgebildet sind die MW + SD von i.d.R. drei unabhängigen Experimenten mit Darstellung der Einzelwerte. Die statistische Signifikanz wurde mittels *one sample t*-Test bestimmt und wird wie folgt abgebildet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$. Abkürzung: *relative Units* [rU].

Slug steigert die relative Aktivität des Ets-AP1-Reporters ($1,99 \pm 0,09$) und erhöht in zwei von vier Experimenten die Aktivität des Reporters für Ets-Elemente ($1,91 \pm 0,12$) sowie in allen drei Versuchen die Aktivität des Reporters für AP1-Bindestellen ($3,33 \text{ SD} \pm 1,59$). Die hohe Standardabweichung des AP1-Reporters ist auf einen sehr hohen Einzelwert zurückzuführen.

Snail1 erhöht die Aktivität des Ets-Reporters ($2,10 \pm 0,18$) und in drei von vier Versuchsansätzen auch die Aktivität der Reporter für Ets-AP1-Bindestellen ($2,21 \pm 0,46$). Wohingegen die Überexpression von Snail keinen Einfluss auf die relative Aktivität des Reporters für AP1-Bindestellen hat ($1,07 \pm 0,03$).

Sowohl ZEB2 als auch FOXO3a steigern nur die Aktivität des AP1-Reporters ($2,20 \pm 0,28$; $2,50 \pm 0,78$). Dabei erhöht FOXO3a die AP1-Reporteraktivität deutlich in zwei der

4. Ergebnisse

drei Versuchsansätze, allerdings mit großer Streuung der Einzelwerte, woraus die hohe Standardabweichung der Ergebnisse resultiert.

Die relative Aktivität des kombinierten Ets-AP1-Reporters wird durch Überexpression der Transkriptionsfaktoren LEF1 ($4,14 \pm 1,07$), Twist1 ($2,32 \pm 0,40$), Cut-like 1 ($5,18 \pm 0,90$) und Cut-like 2 ($3,87 \pm 0,88$) erhöht. Cut-like 2 reprimiert darüber hinaus die Aktivität des AP1-Reporterkonstruktes ($0,51 \pm 0,10$). Die anderen Transkriptionsfaktoren LEF1, Twist1 und Cut-like 1 haben keinen Einfluss auf die Aktivität der alleinigen Ets- und AP1-Reporter.

Während die Expression des konstitutiv aktiven TGF β R1 ca die relative Aktivität des Reporters für Ets-Bindungselemente nicht beeinflusst ($1,20 \pm 0,61$), reprimiert die Überexpression des TGF β R1 ca die Aktivität des Ets-AP1-Reporters ($0,58 \pm 0,05$). Die Überexpression von TGF β R1 ca bedingte zweimal eine Steigerung der Aktivität des AP1-Reporters und hatte zweimal keinen Einfluss auf die AP1-Reporteraktivität ($3,15 \pm 1,77$) im Vergleich zu pcDNA3.1.

Die Expression der konstitutiv-aktiven TAK beeinflusst weder die relative Aktivität des Ets- ($1,81 \pm 0,90$) noch die des AP1-Reporters ($1,68 \pm 0,80$) oder des Ets-AP1-Reporters ($1,53 \pm 0,04$).

P110 α erhöht die Aktivität des AP1-Reporters ($4,33 \pm 2,78$) (mit mittleren relativen Aktivitäten von 2,70 bis 8,77) in vier von fünf Versuchen und steigert die Ets-AP1-Reporteraktivität ($2,73 \pm 0,08$) in allen drei Versuchen. Die Steigerung dieser Reporteraktivitäten durch p110 α kann über eine Wirkung an den AP1-Bindestellen erklärt werden, da p110 α die Aktivität des Reporters für die Ets-Bindestelle im Vergleich zu pcDNA3.1 nicht beeinflusst ($2,19 \pm 1,28$). Lediglich in einem von vier Experimenten wurde eine deutliche Erhöhung der relativen Promotoraktivität gemessen.

Die Überexpression der Phosphatase PTEN hat keinen Einfluss auf die Ets- ($1,48 \pm 0,80$) oder die Ets-AP1-Reporteraktivität ($1,42 \pm 0,43$) verglichen mit der Kontrolle (Ergebnisse nicht abgebildet).

Obwohl sich der Ets-AP1-Reporter aus Bindungselementen zusammensetzt, die jeweils auch in dem alleinigen Ets- bzw. AP1-Reporter enthalten sind, haben alle drei deutlich unterschiedliche Reporter-Aktivitätsprofile. Es fällt auf, dass der Ets-AP1-Reporter dabei durch die meisten der getesteten Transkriptionsfaktoren reguliert wird.

4.2.3 Einfluss von Transkriptionsfaktoren und Kinasen auf die Regulation der Reporter für den c-MYC- und Slug-Promotor und für NF κ B- und C/EBP-Bindungselemente

Die im Luziferase-Experiment bestimmten Aktivitäten der genannten Reporter sind in Abb. 4 zusammengefasst dargestellt.

4. Ergebnisse

Durch Überexpression von ZEB1 Isoform 1 werden die Aktivitäten der Reporter für den c-MYC- ($11,50 \pm 5,23$) und Slug-Promotor ($13,56 \pm 2,81$) sowie der Reporter für NFκB- ($10,55 \pm 3,54$) und C/EBP-Bindungselemente ($4,74 \pm 0,68$) deutlich gesteigert.

ZEB1 Isoform 2 steigert jeweils in drei von drei Versuchsansätzen die Aktivität der Reporter für den Slug- ($2,42 \pm 0,27$), den c-MYC-Promotor ($2,69 \pm 1,05$) sowie die Aktivität des Reporters für NFκB-Bindungselemente ($3,13 \pm 1,38$). Die hohen Standardabweichungen der letzten beiden Werte kommen dabei durch je einen stark erhöhten Messwert der Reporteraktivität zustande.

Die Überexpression von ZEB2 aktiviert den Slug- ($2,38 \pm 0,34$) in allen drei und den c-MYC-Reporter ($1,90 \pm 0,15$) in zwei von drei Versuchen.

P110α erhöht die Aktivität des c-MYC- ($2,96 \pm 0,81$) und des C/EBP-Reporters ($3,07 \pm 0,30$) und steigert die NFκB-Reporteraktivität in zwei von drei Experimenten ($3,41 \pm 1,99$).

TAK ca und Fer erhöhen die relative Aktivität des NFκB-Reporters ($2,61 \pm 0,31$; $2,86 \pm 0,61$). Twist1 ($2,24 \pm 0,45$) steigert die NFκB-Reporteraktivität in zwei von drei Versuchen.

Der Transkriptionsfaktor FOXO3a wirkt aktivierend auf den c-MYC- ($2,37 \pm 0,10$) und NFκB-Reporter ($2,37 \pm 0,47$).

Der Einfluss einer Überexpression des konstitutiv aktiven TGFβR1 ca sowohl auf die relative Promotoraktivität des c-MYC-Reporters ($2,62 \pm 3,15$) als auch auf die Aktivität des NFκB-Reporterkonstruktes ($2,03 \pm 0,66$) ist heterogen und anhand der Daten nicht eindeutig zu bestimmen. TGFβR1 ca reprimiert in den dargestellten Versuchen die relative Aktivität des Slug-Promotors ($0,57 \pm 0,05$).

P110 α dagegen erhöht die Aktivität des Slug-Reporters ($2,56 \pm 0,30$) in allen drei Versuchen.

4. Ergebnisse

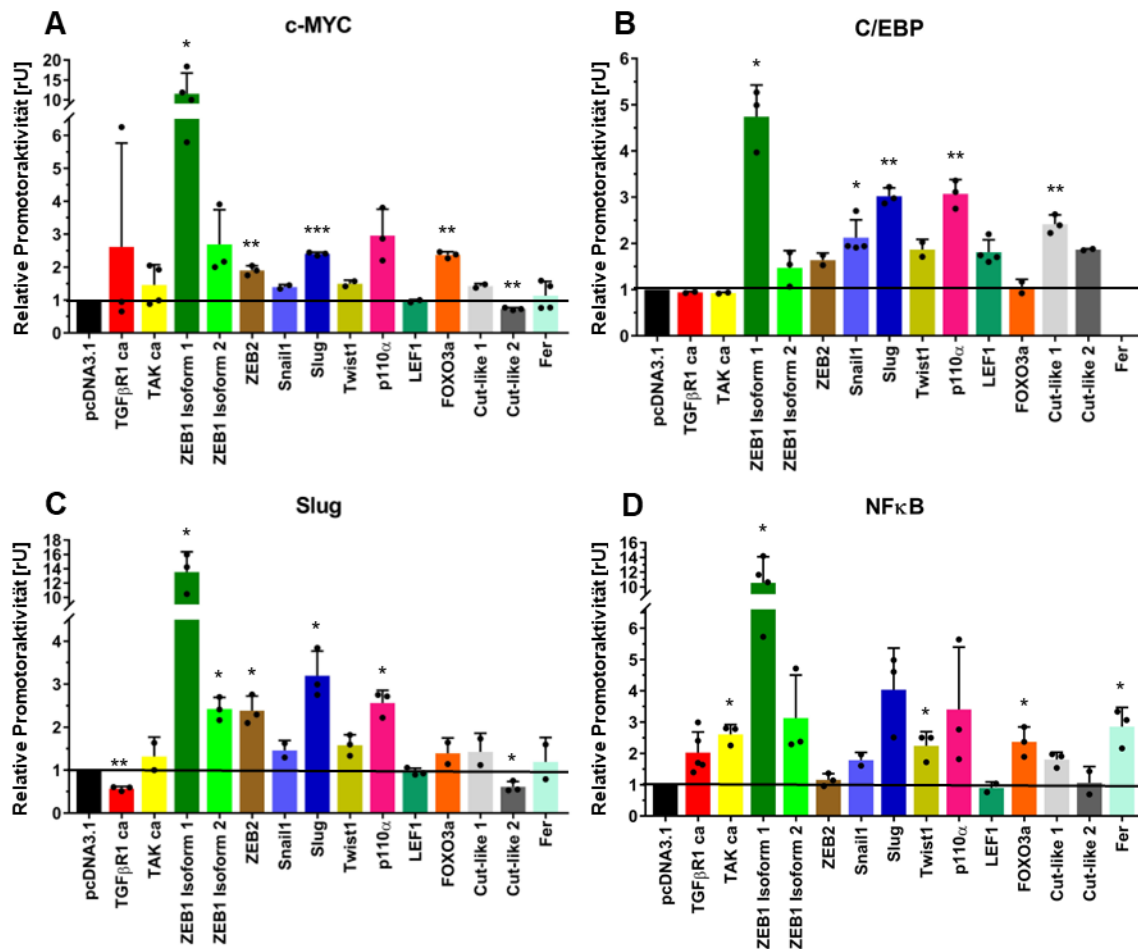


Abb. 4 Regulation der relativen Promotoraktivität von c-MYC und Slug sowie von den Bindungselementen für C/EBP und NFκB.

H1299-Zellen wurden zeitgleich mit einem Firefly-Promotorkonstrukt, einem Expressionsplasmid oder pcDNA3.1 und dem Renilla-Reporterkonstrukt pRL-TK cotransfiziert. Die Inkubation erfolgte über 24 h. Die Luziferase-Transfektion erfolgte jeweils in Doppelwerten. Die dargestellten relativen Promotoraktivitäten entsprechen dem auf pcDNA3.1 normierten Verhältnis von Firefly-Luziferase-Aktivität zur Renilla-Luziferase-Aktivität. Abgebildet sind die MW + SD von i.d.R. drei unabhängigen Experimenten mit Darstellung der Einzelwerte. Die statistische Signifikanz wurde mittels *one sample* t-Test bestimmt und wird wie folgt abgebildet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$. Abkürzung: *relative Units* [rU].

Die Überexpression der Transkriptionsfaktoren Snail1 und Slug unterscheidet sich hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Aktivität der hier getesteten Reporter. Der Transkriptionsfaktor Slug aktiviert den c-MYC- ($2,40 \pm 0,05$), den C/EBP- ($3,02 \pm 0,18$), den NFκB-Reporter ($4,03 \pm 1,33$) sowie autoregativ den Reporter des Slug-Promotors ($3,20 \pm 0,57$).

Snail1 steigert in allen vier Versuchsansätzen lediglich die C/EBP-Reporter-Aktivität ($2,13 \pm 0,39$).

Die Expression von Cut-like 1 erhöht die Aktivität des C/EBP-Reporterkonstruktes ($2,41 \pm 0,20$). Cut-like 2 hingegen reprimiert das Slug-Reporterkonstrukt ($0,61 \pm 0,12$) in zwei von drei Experimenten, senkt tendenziell die relative Promotoraktivität des c-MYC-Reporters ($0,73 \pm 0,04$) und steigert tendenziell die C/EBP-Reporteraktivität ($1,87 \pm 0,02$; $n=2$).

4. Ergebnisse

LEF1 beeinflusst die Aktivität des Reporterkonstrukts für C/EBP- ($1,81 \text{ SD} \pm 0,27$) nur schwach und die Aktivität der Reporter für c-MYC ($0,96 \text{ SD} \pm 0,05$), Slug ($0,96 \text{ SD} \pm 0,09$) und NFκB -Elemente ($0,90 \text{ SD} \pm 0,19$) nicht.

Vergleicht man die transkriptionelle Regulation der genannten Reporter miteinander, so fällt auf, dass die Promotor-Aktivitätsprofile des c-MYC- und Slug-Reporters (ZEB1 Isoform 2 (+), ZEB2 (+), Slug (+), p110α (+), Cut-like 2 (-)) sowie des c-MYC- und NFκB-Reporters (ZEB1 Isoform 2 (+), Slug (+), FOXO3a (+), p110α (+)) ähnlich sind. Da der Transkriptionsfaktor ZEB1 Isoform 1 auf alle Reporter in dieser Gruppe eine deutlich aktivierende Wirkung hatte, wurde er im Vergleich der Reporter-Aktivitätsprofile nicht berücksichtigt.

4.2.4 Einfluss von Transkriptionsfaktoren und Kinasen auf die Regulation der Reporter für Promotoren der Zellzyklusproteine Cyclin D1 und p21Cip1

Die experimentell bestimmten Aktivitäten der genannten Reporter sind in Abb. 5 zusammengefasst dargestellt. Die Transkriptionsfaktoren ZEB1 Isoform 1 und Slug erhöhen die relative Promotoraktivität des Cyclin D1- ($11,60 \pm 3,61$; $2,65 \pm 0,58$) und des p21Cip1-Reporters ($4,27 \pm 0,07$; $2,14 \pm 0,07$).

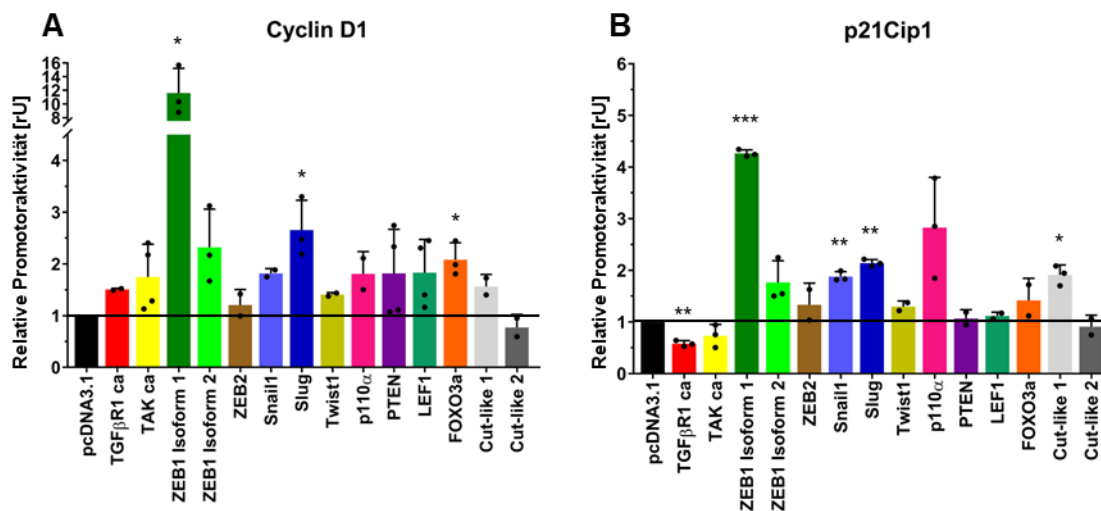


Abb. 5: Regulation der relativen Promotoraktivität der Reporter für Promotoren der Zellzyklusproteine Cyclin D1 und p21Cip1.

H1299-Zellen wurden zeitgleich mit einem Firefly-Promotorkonstrukt, einem Expressionsplasmid oder pcDNA3.1 und dem Renilla-Reporterkonstrukt pRL-TK cotransfiziert. Die Inkubation erfolgte über 24 h. Die Luziferase-Transfektion erfolgte jeweils in Doppelwerten. Die dargestellten relativen Promotoraktivitäten entsprechen dem auf pcDNA3.1 normierten Verhältnis von Firefly-Luziferase-Aktivität zur Renilla-Luziferase-Aktivität. Abgebildet sind die MW + SD von i.d.R. drei unabhängigen Experimenten mit Darstellung der Einzelwerte. Die statistische Signifikanz wurde mittels *one sample* t-Test bestimmt und wird wie folgt abgebildet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$. Abkürzung: *relative Units* [rU].

Cut-like 1 steigert in diesem experimentellen Ansatz nur die Aktivität des Reporterplasmids für den p21Cip1-Promotor ($1,91 \pm 0,19$) in zwei von drei Versuchen.

TGFβR1 ca reprimiert die Aktivität des p21Cip1-Reporters ($0,58 \pm 0,06$).

4. Ergebnisse

P110 α erhöht die Reporteraktivität von p21Cip1 in zwei von drei Versuchen ($2,83 \pm 0,97$) und von Cyclin D1 in einem von zwei Versuchen ($1,81 \pm 0,43$). Die Messwerte der Kinase p110 α variieren bei beiden Reporterkonstrukten stark.

Die Überexpression des Transkriptionsfaktors Snail1 steigert tendenziell die Reporteraktivität des p21Cip1-Konstruktes ($1,88 \pm 0,09$) wie auch tendenziell die relative Promotoraktivität des Cyclin D1-Reporters ($1,82 \pm 0,10$).

TAK ca, ZEB1 Isoform 2, PTEN, LEF1, FOXO3a und Cut-like 2 zeigen im Vergleich zu dem Leervektor pcDNA3.1 keinen Einfluss auf die Aktivität des p21Cip1-Reporters ($0,73 \pm 0,22$; $1,77 \pm 0,42$; $1,07 \pm 0,17$; $1,12 \pm 0,07$; $1,42 \pm 0,43$; $0,91 \pm 0,22$). Die Ergebnisse der Überexpression dieser Transkriptionsfaktoren und dem Cyclin D1-Reporter ($1,75 \pm 0,63$ (TAK ca); $2,32 \pm 0,74$ (ZEB1 Isoform 2); $1,82 \pm 0,85$ (PTEN); $1,83 \pm 0,64$ (LEF1); $2,08 \pm 0,33$ (FOXO3a); $0,77 \pm 0,25$ (Cut-like 2; n=2)) sind heterogen. Jeweils die Hälfte der Einzelwerte der gemessenen Reporteraktivitäten sind erhöht oder im Falle von Cut-like 2 reprimiert. In weiteren Versuchsansätzen ließen sich diese Werte jedoch nicht bestätigen, sodass davon auszugehen ist, dass die genannten Transkriptionsfaktoren auch auf die relative Promotoraktivität des Cyclin D1-Reporters keinen Einfluss haben.

Auch ZEB2 und Twist1 beeinflussen in jeweils zwei Pilotexperimenten verglichen mit pcDNA3.1 weder die relative Promotoraktivität des p21Cip1-Reporters ($1,33 \pm 0,42$; $1,30 \pm 0,11$) noch die des Cyclin D1-Reporters ($1,21 \pm 0,30$; $1,41 \pm 0,04$).

Vergleicht man die transkriptionelle Regulation der beiden Reporter miteinander, so fällt auf, dass deren Promotor-Aktivitätsprofile (Snail (+), Slug (+), ZEB1 Isoform 1 (+)) ähnlich sind, wobei sich die Regulation des p21Cip1-Reporters insgesamt differenzierter darstellt.

4.2.5 Analyse des Einflusses von Transkriptionsfaktoren und Kinasen auf die Aktivität des TCF-Reporters TOPflash sowie des Reporters mit Smad/TGF β -Bindungselementen 3TP-Lux und des SRE-Reporters

In Abb. 6 sind die Aktivitäten der Reporter TOPflash, 3TP-Lux und SRE grafisch in Form von Säulendiagrammen dargestellt.

ZEB1 Isoform 1 erhöht die Reporteraktivität von TOPflash ($5,29 \pm 1,33$), 3TP-Lux ($8,44 \pm 2,23$) und dem SRE-Reporter (Reporter des *serum response element* $7,49 \pm 2,19$).

Den SRE-Reporter wird jeweils in drei von drei Versuchsansätzen durch die Überexpression von ZEB1 Isoform 2 ($2,81 \pm 1,49$) und Slug ($2,18 \pm 0,13$) aktiviert. Die hohe Standardabweichung von ZEB1 Isoform 2 ist bedingt durch einen einzelnen sehr hohen Messwert. Slug steigert in zwei von drei Messungen darüber hinaus die Aktivität des TOPflash-Reporters ($1,92 \pm 0,17$).

4. Ergebnisse

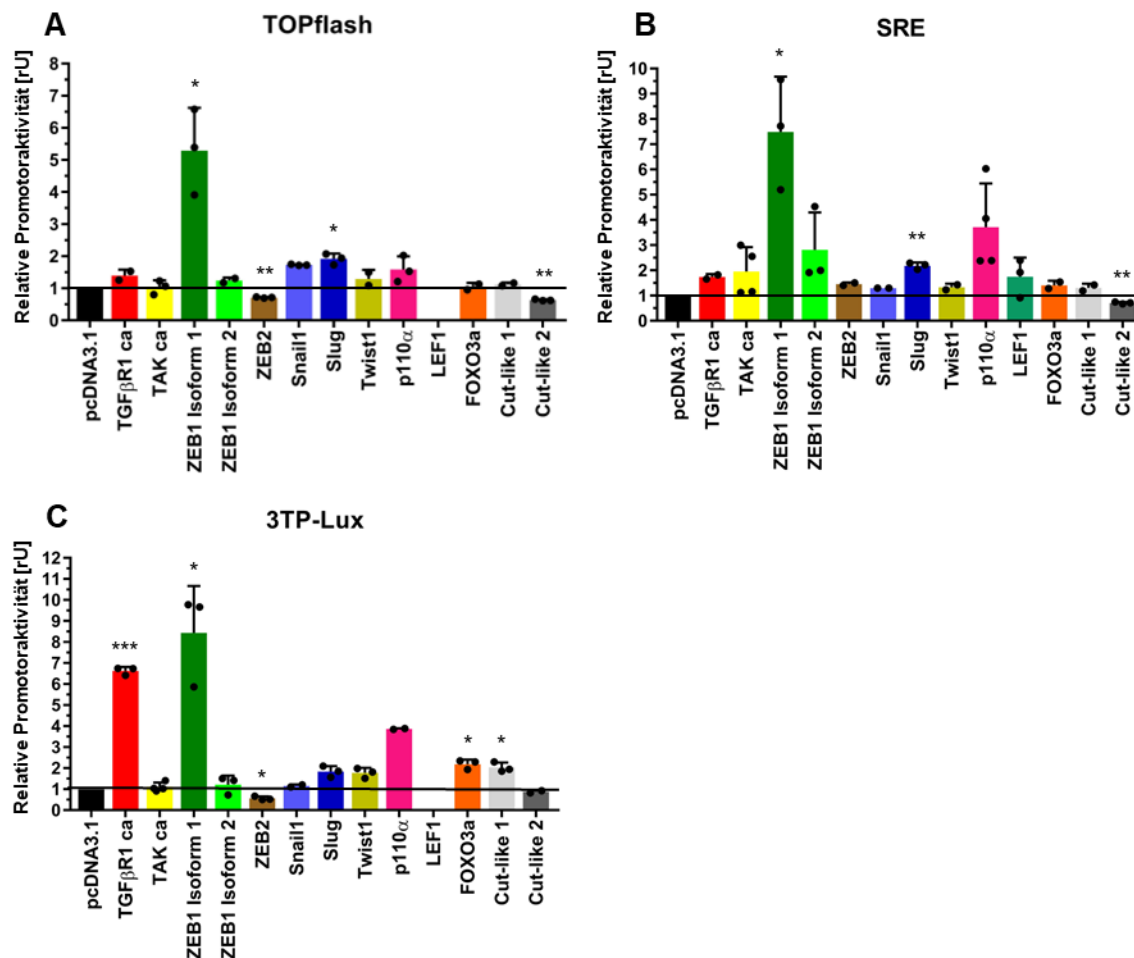


Abb. 6 Regulation der relativen Promotoraktivität von TCF- (TOPflash), TGFβ- (3TP-Lux) und SRE-Bindungselementen.

H1299-Zellen wurden zeitgleich mit einem Firefly-Promotorkonstrukt, einem Expressionsplasmid oder pcDNA3.1 und dem Renilla-Reporterkonstrukt pRL-TK cotransfiziert. Die Inkubation erfolgte über 24 h. Die Luciferase-Transfektion erfolgte jeweils in Doppelwerten. Die dargestellten relativen Promotoraktivitäten entsprechen dem auf pcDNA3.1 normierten Verhältnis von Firefly-Luciferase-Aktivität zur Renilla-Luciferase-Aktivität. Abgebildet sind die MW + SD von i.d.R. drei unabhängigen Experimenten mit Darstellung der Einzelwerte. Die statistische Signifikanz wurde mittels *one sample* t-Test bestimmt und wird wie folgt abgebildet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$. Abkürzung: *relative Units* [rU].

Der Einfluss der Kinase TAK ca auf die Regulation des SRE-Reporters ($1,96 \pm 0,96$) ist nicht eindeutig zu bewerten. Zwei der vier Messwerte sind erhöht, während die anderen beiden Versuchsansätze verglichen mit pcDNA3.1 keinen Einfluss auf die Reporteraktivität zeigen.

Die Überexpression der folgenden Transkriptionsfaktoren steigert ausschließlich die Aktivität des Smad-responsiven 3TP-Lux-Reporters: TGFβR1 ca ($6,63 \pm 0,19$), Cut-like 1 ($2,03 \pm 0,23$) und FOXO3a ($2,19 \pm 0,22$).

P110α erhöht die Aktivität des 3TP-Lux- ($3,87 \pm 0,03$) sowie des SRE-Reporters ($3,7 \pm 1,74$).

Während die Expression des Transkriptionsfaktors ZEB2 den 3TP-Lux-Reporter reprimiert ($0,57 \pm 0,09$) und die Aktivität von TOPFlash ($0,71 \pm 0,02$) tendenziell senkt,

4. Ergebnisse

reprimiert Cut-like 2 die Aktivität des TOPflash-Reporters ($0,63 \pm 0,03$) und senkt die Reporteraktivität von SRE ($0,71 \pm 0,04$) tendenziell.

Snail1 und Twist1 beeinflussen verglichen mit pcDNA3.1 die relative Aktivität der getesteten Reporter TOPflash ($1,73 \pm 0,02$; $1,29 \pm 0,29$), SRE ($1,30 \pm 0,00$; $1,33 \pm 0,14$) und 3TP-Lux ($1,15 \pm 0,07$; $1,77 \pm 0,24$) nicht.

Trotz einzelner Übereinstimmungen zeigen die drei genannten Reporter deutliche Unterschiede in ihrem Reporter-Aktivitätsprofil.

4.2.6 Zusammenfassung Reporterassays H1299

In der Tabelle 11 sind die Gesamtergebnisse der Reporterassays mit H1299 schematisch zusammengefasst (inklusive der Ergebnisse aus Kapitel 8.1 im Anhang). Aufgrund der in Kapitel 5.1 diskutierten methodischen Limitationen wurden nur die Ergebnisse als Aktivierung/Reprimierung gewertet und mit einem Plus/Minus-Zeichen gekennzeichnet, die eines der beiden nachfolgenden Kriterien erfüllen. Entweder lag das Ergebnis auch nach Abzug einer SD oberhalb bzw. auch nach Addition einer SD unterhalb des gewählten Grenzwertes (relative Promotoraktivität $MW - 1 SD \geq 1,9 rU$ [+], relative Promotoraktivität $MW + 1 SD \leq 0,65 rU$ [-]). Oder alle gemessenen Einzelwerte lagen ober-/unterhalb des gewählten Grenzwertes. Der Transkriptionsfaktor ZEB1 Isoform 1 hat auf alle verwendeten Reporter eine deutlich aktivierende Wirkung und wurde daher im Vergleich der Promotor-Aktivitätsprofile nicht berücksichtigt.

Tabelle 11: Reporter-Aktivitätsprofile der Zelllinie H1299

Signalproteine	Ets-Reporteraktivität	AP1-Reporteraktivität	Ets-AP1-Reporteraktivität	c-MYC-Reporteraktivität	C/EBP-Reporteraktivität	NFκB-Reporteraktivität
TGFβR1 ca		?	-	?		?
TAK ca						g.e.
ZEB1 Isoform 2	+	+	(+)	+		+
ZEB2		+		?		
Snail1	+		+		+	
Slug	?	+	+	+	+	+
Twist1			+			?
P110α		+	+	+	+	?
PTEN						
LEF1			+			
FOXO3a				+		+
Cut-like 1			+		+	
Cut-like 2		-	+	(-)	(+)	

grün = erhöht; rot = verringert; weiß = ohne Einfluss; grau = nicht getestet; () = tendenziell erhöht/verringert; ? = uneindeutiges Ergebnis; g.e. = Reporter gering exprimiert

4. Ergebnisse

Signalproteine	Slug-Reporteraktivität	Cyclin D1-Reporteraktivität	p21Cip1-Reporteraktivität	TOPflash-Reporteraktivität	3TP-Lux-Reporteraktivität	SRE-Reporteraktivität	MMP9-Reporteraktivität
TGFβR1 ca	-		-		+		
TAK ca						?	
ZEB1 Isoform 2	+					+	?
ZEB2	+			(-)	g.e.		
Snail1		(+)	(+)				
Slug	+	+	+	?		+	
Twist1							
P110α	+	?	?		+	+	+
PTEN							
LEF1							
FOXO3a					+		
Cut-like 1			?		+		
Cut-like 2	?			-		(-)	

grün = erhöht; rot = verringert; weiß = ohne Einfluss; grau = nicht getestet; () = tendenziell erhöht/verringert; ? = uneindeutiges Ergebnis; g.e. = Reporter gering exprimiert

Es fällt auf, dass insbesondere TGFβR1, ZEB1 Isoform 2, ZEB2, Snail1, Slug, p110α, Cut-like 1 sowie Cut-like 2 viele der untersuchten Genpromotoren bzw. klassischen Transkriptionsfaktorbindestellen regulieren. ZEB1 Isoform 2, ZEB2, Snail1, Slug, p110α und Cut-like 1 wirken dabei vor allem aktivierend auf die Genexpression. TGFβR1 und Cut-like 2 hingegen unterdrücken die Genexpression der meisten analysierten Promotorfragmente.

Viele der untersuchten Transkriptionsfaktoren und Signalproteine regulieren häufig vorkommende Transkriptionsfaktor-Bindestellen wie Ets, AP1, NFκB, C/EBP und SRE. Außerdem werden insbesondere die Promotoraktivität des Onkogens c-MYC, des EMT-Transkriptionsfaktors Slug und der Smad-assoziierte Signalweg (3TP-Lux-Reporter) durch die untersuchten Proteine reguliert.

4.3 Einfluss der K-Ras-Inhibition auf die Regulation der Promotoraktivitäten in der Zelllinie H358

Für eine bessere Charakterisierung der Rolle von onkogenem K-Ras in der EMT-assoziierten Genregulation des NSCLC wurde im Folgenden der Einfluss der K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 (Adagrasib) und AMG-510 (Sotorasib) auf die Promotoraktivität verschiedener Reporterkonstrukte in der für die *KRAS* G12C-Mutation heterozygoten Zelllinie H358 mittels *Dual Luciferase Reporter Assay* untersucht (siehe Tabelle 7 Kapitel 3.1.2).

4. Ergebnisse

Beide K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 inhibieren mutationsspezifisch das K-Ras G12C-Protein durch kovalente Bindung des Cysteins C12. Dadurch wird das K-Ras G12C-Molekül in seiner inaktiven, GDP-gebundene-Konformation gehalten, ohne dass der Signalweg des Wildtyp K-Ras-Proteins beeinflusst wird.

Die *Dual Luciferase Reporter Assays* wurden wie in den Kapiteln 3.1.5 und 3.2.7 beschrieben durchgeführt. Für die folgenden Experimente wurde für die H358-Zellen eine Veränderung der Messwerte um $\geq 1,6$ x bzw. $\leq 0,7$ x als Grenzwert für eine Erhöhung bzw. Reprimierung der relativen Promotoraktivität festgelegt.

4.3.1 Einfluss der K-Ras-Inhibition auf die Regulation der ERK1/2-Aktivität

Ebenso wie die GTPase K-Ras sind die MAPK ERK1 und ERK2 Teil des Ras-Raf-MAPK-Signalwegs. Zur internen Kontrolle der Wirksamkeit der K-Ras-Inhibitoren wurden daher die K-Ras-Effektorproteine ERK1 und ERK2 mittels Western Blot sowohl in deren aktiven phosphorylierten Zustand (p-ERK1/2) als auch in deren inaktiven dephosphorylierten Zustand in zwei Pilotexperimenten analysiert.

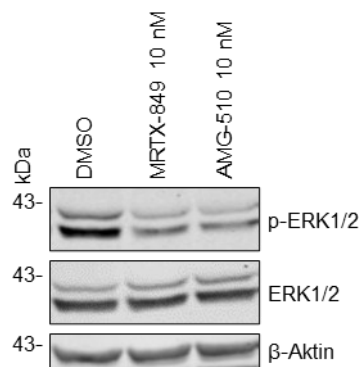


Abb. 7: Analyse des Einflusses der K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Aktivität des K-Ras-Effektorproteins ERK1/2.

H358-Zellen wurden über 48 h mit MRTX-849 10 nM oder AMG-510 10 nM behandelt. Als Kontrolle dient die Behandlung mit DMSO. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert und je 50 μ g Protein in 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und im Western-Blot-Verfahren analysiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels spezifischer Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper über Nah-Infrarot-Lumineszenz. Als Beladungskontrolle dient β -Aktin. Abgebildet sind repräsentative Blots (n=2).

ERK1 (44 kDa) und ERK2 (42 kDa) stellen sich als Doppelbande auf der Höhe der berechneten Molekularmassen dar. Die Proteinexpression dieser inaktiven Form ist nach 48 h K-Ras-Inhibition verglichen mit der DMSO-Kontrolle unverändert. Stattdessen hat der Anteil von phosphoryliertem und damit aktivem p-ERK1/2 unter Behandlung mit MRTX-849 10 nM sowie unter Behandlung mit AMG-510 10 nM verglichen mit der DMSO-Kontrolle deutlich abgenommen (siehe Abb. 7).

4. Ergebnisse

Zusammenfassend kann mithilfe des Western-Blot-Verfahrens anhand der Phosphorylierung des Effektorproteins p44/42 gezeigt werden, dass eine Behandlung mit MRTX-849 10 nM sowie AMG-510 10 nM K-Ras effektiv inhibiert.

4.3.2 Einfluss der K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Regulation der Promotoraktivität der Reporter für Ets- und AP1-Bindungselemente

Wie bereits einleitend dargestellt, zählen Ets und AP1 zu den Effektoren des Ras-MAPK-Signalweges. Im Rahmen einer Konzentrationsreihe von 1 nM bis 50 nM wurde daher anhand der Reporter für Ets- und AP1-Bindungselemente die Wirksamkeit der Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 untersucht, um die jeweils minimale wirksame Inhibitor-konzentration herauszufinden.

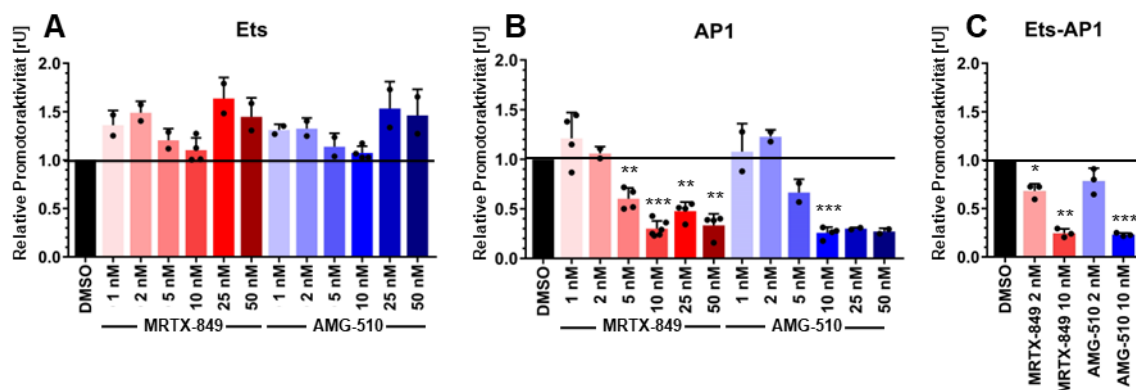


Abb. 8: Regulation der relativen Promotoraktivität von Ets- und AP1- Bindungselementen durch K-Ras-Inhibitor.

H358-Zellen wurden mit einem Firefly-Promotorkonstrukt, dem Expressionsplasmid pcDNA3.1 und dem Renilla-Reporterkonstrukt pRL-TK cotransfiziert. Die Ansätze wurden mit DMSO, MRTX-849 oder AMG-510 in den abgebildeten Konzentrationen behandelt. Die Inkubation erfolgte über 24 h. Die dargestellten relativen Promotoraktivitäten entsprechen dem auf die DMSO-Kontrolle normierten Verhältnis von Firefly-Luziferase-Aktivität zur Renilla-Luziferase-Aktivität. Abgebildet sind MW + SD von mind. zwei unabhängigen Experimenten mit Darstellung der Einzelwerte. Die statistische Signifikanz wurde in Assays mit mind. drei unabhängigen Versuchen mittels *one sample t-Test* bestimmt und wird wie folgt abgebildet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$. Abkürzung: *relative Units* [rU].

Sowohl MRTX-849 als auch AMG-510 beeinflussen in den Konzentrationen 1 nM ($1,21 \pm 0,26$; $1,08 \pm 0,28$) und 2 nM ($1,06 \pm 0,07$; $1,23 \pm 0,07$) die relative Luziferase-Aktivität des AP1-Reporters nicht. In höheren Konzentrationen reprimiert MRTX-849 (5 nM ($0,60 \pm 0,11$), 10 nM ($0,30 \pm 0,08$), 25 nM ($0,48 \pm 0,09$) und 50 nM ($0,33 \pm 0,12$)) vergleichbar wie AMG-510 (5 nM ($0,66 \pm 0,14$), 10 nM ($0,26 \pm 0,06$), 25 nM ($0,30 \pm 0,01$) sowie 50 nM ($0,27 \pm 0,03$)) die Aktivität des Reporters für AP1-Bindungselemente (siehe Abb. 8 B).

Die Aktivität des synthetischen, kombinierten Ets-AP1-Reporterkonstruktes wird in der Konzentration 2 nM von MRTX-849 ($0,68 \pm 0,08$) und AMG-510 ($0,79 \pm 0,13$) nur in jeweils einem von drei Versuchen reprimiert. In der höheren Konzentration 10 nM

4. Ergebnisse

reprimieren die K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 ($0,25 \pm 0,05$) und AMG-510 ($0,23 \pm 0,02$) die relative Aktivität des Ets-AP1-Reporters deutlich in drei von drei Versuchsansätzen (siehe Abb. 8 C).

In diesem experimentellen *Setup* von zwei Pilotexperimenten hat der Ets-Reporter keine wesentlichen Signifikanzen, auch wenn grafisch tendenziell eine abnehmende Reporteraktivität bei zunehmender Inhibitorkonzentration darstellbar ist (siehe Abb. 8 A).

4.3.3 Einfluss der K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Promotoraktivität der Reporter für c-MYC, NFκB, C/EBP sowie der Reporter für die EMT-Regulatoren Snail1 und Slug

Die Aktivitäten der Reporterstrukturen für Bindungselemente von NFκB und C/EBP werden jeweils nur durch die niedrigen Konzentrationen der K-Ras-Inhibitoren gesteigert. Auf den NFκB-Reporter wirken MRTX-849 2 nM ($1,78 \pm 0,11$) sowie AMG-510 2 nM ($1,81 \pm 0,11$) aktivierend. MRTX-849 2 nM ($1,68 \pm 0,02$) steigert die relative Reporteraktivität von C/EBP. AMG-510 2 nM ($1,61 \pm 0,07$) erhöht in zwei von drei Experimenten die Aktivität des C/EBP-Reporterkonstruktes. In der höheren Konzentration beeinflussen weder MRTX-849 10 nM ($0,99 \pm 0,02$; $1,13 \pm 0,08$) noch AMG-510 10 nM ($0,93 \pm 0,06$; $1,02 \pm 0,17$) die Aktivität des NFκB- oder des C/EBP-Reporters (siehe Abb. 9 A+B). Darüber hinaus hat eine weitere Steigerung der Konzentration auf MRTX-849 25 nM (relative Promotoraktivität 1,35) sowie AMG-510 25 nM (relative Promotoraktivität 1,09), in einem einmal durchgeführten Versuch, ebenfalls keinen Einfluss auf die relative Aktivität des C/EBP-Reporters (nicht abgebildet).

Die Behandlung mit den K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 hat verglichen mit der DMSO-Kontrolle keinen Einfluss auf die Aktivität des Snail1- (mittlere relative Promotoraktivitäten zwischen 1,12 und 1,39), des Slug- (mittlere relative Promotoraktivitäten zwischen 1,04 und 1,19) sowie des c-MYC-Reporters (mittlere relative Promotoraktivitäten zwischen 0,83 und 1,36) (siehe Abb. 9 C-E).

4. Ergebnisse

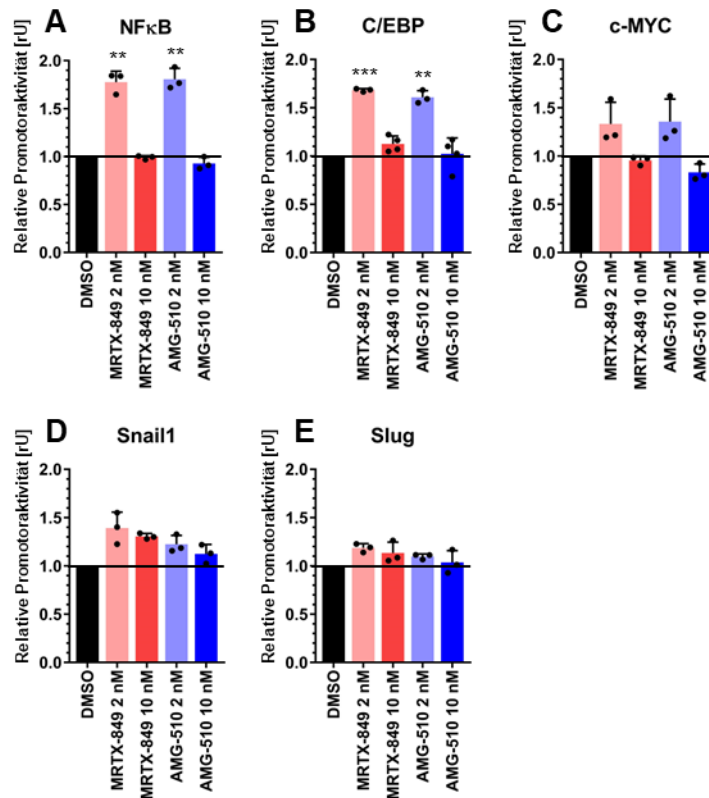


Abb. 9 Regulation der relativen Promotoraktivität von c-MYC (Del1), Snail1 und Slug sowie von den Bindungselementen NFκB und C/EBP durch K-Ras-Inhibition.

H358-Zellen wurden mit einem Firefly-Promotorkonstrukt, dem Expressionsplasmid pcDNA3.1 und dem Renilla-Reporterkonstrukt pRL-TK cotransfiziert. Die Ansätze wurden mit DMSO, MRTX-849 oder AMG-510 in den abgebildeten Konzentrationen behandelt. Die Inkubation erfolgte über 24 h. Die dargestellten relativen Promotoraktivitäten entsprechen dem auf die DMSO-Kontrolle normierten Verhältnis von Firefly-Luziferase-Aktivität zur Renilla-Luziferase-Aktivität. Abgebildet sind MW + SD von mind. drei unabhängigen Experimenten mit Darstellung der Einzelwerte. Die statistische Signifikanz wurde mittels *one sample* t-Test bestimmt und wird wie folgt abgebildet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$. Abkürzung: *relative Units* [rU].

4.3.4 Einfluss der K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Promotoraktivität der Reporter der Zellzyklusproteine Cyclin D1 und p21Cip1

Die relative Aktivität des Reporters für den Cyclin D1-Promotor wird unter Behandlung mit MRTX-849 2 nM ($1,62 \pm 0,21$) tendenziell aktiviert. Die Behandlung mit AMG-510 2 nM ($1,74 \pm 0,15$) steigert die Aktivität des Cyclin D1-Reporters ebenfalls. Eine Behandlung mit der höheren Konzentration MRTX-849 10 nM ($0,92 \pm 0,05$) oder AMG-510 10 nM ($0,82 \pm 0,07$) hat verglichen mit der DMSO-Kontrolle keinen Einfluss auf die Reporteraktivität (siehe Abb. 10 A). Eine weitere Steigerung der Inhibitorkonzentration auf MRTX-849 25 nM (relative Promotoraktivität 1,02) und AMG-510 25 nM (relative Promotoraktivität 0,71) scheint die Aktivität des Cyclin D1-Reporters ebenfalls nicht zu beeinflussen (nicht abgebildet).

4. Ergebnisse

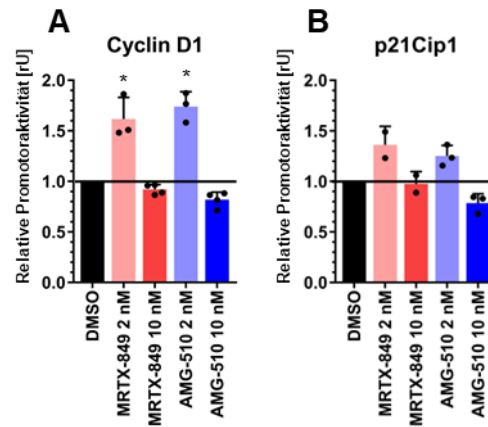


Abb. 10 Regulation der relativen Promotoraktivität der Reporter für Promotoren der Zellzyklusproteine Cyclin D1 und p21Cip1 durch K-Ras-Inhibition.

H358-Zellen wurden mit einem Firefly-Promotorkonstrukt, dem Expressionsplasmid pcDNA3.1 und dem Renilla-Reporterkonstrukt pRL-TK cotransfiziert. Die Renilla-Luziferase auf dem Reporterplasmid pRL-TK diente als interne Kontrolle der Transfektionseffizienz. Die Ansätze wurden mit DMSO, MRTX-849 oder AMG-510 in den abgebildeten Konzentrationen behandelt. Die Inkubation erfolgte über 24 h. Die dargestellten relativen Promotoraktivitäten entsprechen dem auf die DMSO-Kontrolle normierten Verhältnis von Firefly-Luziferase-Aktivität zur Renilla-Luziferase-Aktivität. Abgebildet sind MW + SD von i.d.R. drei unabhängigen Experimenten mit Darstellung der Einzelwerte. Die statistische Signifikanz wurde in Assays mit mind. drei unabhängigen Versuchen mittels *one sample* t-Test bestimmt und wird wie folgt abgebildet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$. Abkürzung: *relative Units* [rU].

Sowohl die K-Ras-Inhibition mit MRTX-849 2 nM ($1,36 \pm 0,18$), MRTX-849 10 nM ($0,97 \pm 0,12$) als auch mit AMG-510 2 nM ($1,25 \pm 0,11$) beeinflussen die p21Cip1-Reporteraktivität nicht signifikant. Die relative Promotoraktivität des p21Cip1-Reporters wird unter Behandlung mit AMG-510 10 nM ($0,78 \pm 0,09$) in einem von drei Versuchen reprimiert (siehe Abb. 10 B).

4.3.4.1 Einfluss von TGF β 1 auf die Regulation der relativen Promotoraktivität des p21Cip1-Reporters unter K-Ras-Inhibition

Im vorherigen Kapitel 4.3.4 wurde bereits dargestellt, dass die Aktivität des p21Cip1-Promotors unter K-Ras-Inhibition mit MRTX-849 und AMG-510 nicht moduliert wird. TGF β 1 ist bereits als Induktor des EMT-Prozesses in Lungentumoren bekannt und nimmt über die Regulation von p21Cip1 Einfluss auf die Proliferationskontrolle in einigen Zellarten. Daher wurde in weiteren Experimenten eine mögliche Interaktion zwischen TGF β 1 und K-Ras-Signalwegen analysiert (Abb. 11) (siehe auch Tabelle 7 Kapitel 3.1.2).

TGF β 1 10 ng/ml ($3,16 \pm 0,28$) steigert die Aktivität des p21Cip1-Reporters deutlich. Die gleichzeitige Behandlung mit TGF β 1 10 ng/ml und MRTX-849 2 nM ($2,20 \pm 0,08$) oder AMG-510 2 nM ($2,18 \pm 0,03$) wirkt in der Summe ebenfalls noch aktivierend auf die relative Promotoraktivität des Genreporters für p21Cip1. Diese Aktivierung ist aber signifikant niedriger als bei einer Behandlung mit TGF β 1 allein. Bei der höheren Konzentration

4. Ergebnisse

der K-Ras-Inhibitoren haben weder TGF β 1 10 ng/ml + MRTX-849 10 nM ($1,30 \pm 0,07$) noch TGF β 1 10 ng/ml + AMG-510 10 nM ($1,18 \pm 0,07$) einen Einfluss auf die Aktivität des p21Cip1-Reporters.

Der stimulierende Effekt von TGF β 1 auf die p21Cip1-Promotoraktivität wird durch eine gleichzeitige Behandlung mit AMG-510 oder MRTX-849 in der wirksamen Konzentration von 10 nM aufgehoben.

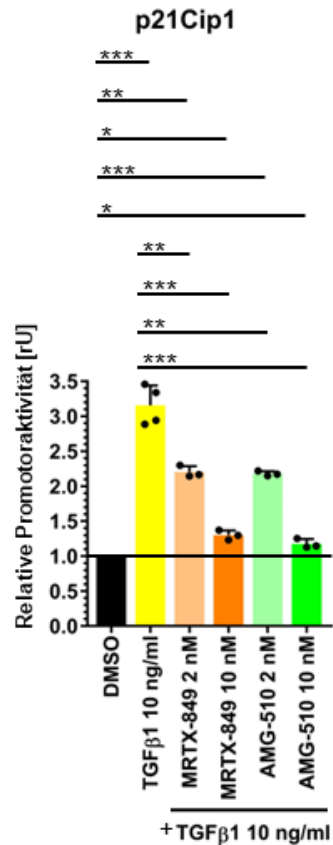


Abb. 11 Regulation der relativen Promotoraktivität des Reporters für den Promotor des Zellzyklusproteins p21Cip1 durch eine Cobehandlung mit TGF β 1 und K-Ras-Inhibitoren.

H358-Zellen wurden mit einem Firefly-Promotorkonstrukt, dem Expressionsplasmid pcDNA3.1 und dem Renilla-Reporterkonstrukt pRL-TK cotransfiziert. Die Ansätze wurden mit DMSO, MRTX-849 oder AMG-510 in den abgebildeten Konzentrationen behandelt. Die Inkubation erfolgte über 24 h. Die dargestellten relativen Promotoraktivitäten entsprechen dem auf die DMSO-Kontrolle normierten Verhältnis von Firefly-Luziferase-Aktivität zur Renilla-Luziferase-Aktivität. Abgebildet sind MW + SD von mind. drei unabhängigen Experimenten mit Darstellung der Einzelwerte. Die Normalverteilung der Werte wurde mittels Shapiro-Wilk-Test bestätigt. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem t-Test bestimmt und wird wie folgt abgebildet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$. Abkürzung: *relative Units* [rU].

4.3.5 Einfluss der K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Aktivität des TCF-Reporters TOPflash, des TGF β 1-sensitiven Smad-Reporters 3TP-Lux und des SRE-Reporters

Eine Behandlung der H358-Zellen mit 2 nM MRTX-849 hat eine leichte Erhöhung der Aktivität sowohl des TOPflash- als auch des 3TP-Lux-Reporters ($1,44 \pm 0,06$; $1,37 \pm 0,09$) zur Folge, die statistisch signifikant ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,05$) ist, aber unter der selbst gewählten Grenze von 1,6 liegt. Auch die Behandlung mit 2 nM AMG-510 steigert in zwei

4. Ergebnisse

der drei Versuche die TOPflash- ($1,57 \pm 0,21$), nicht jedoch die 3TP-Lux-Reporteraktivität.

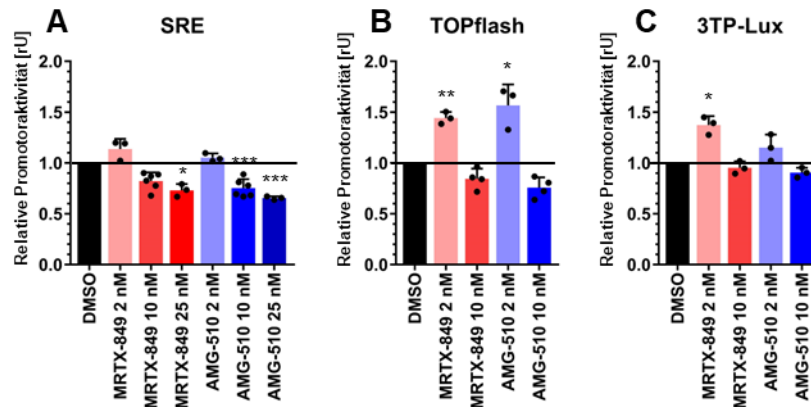


Abb. 12: Regulation der relativen Promotoraktivität von TCF- (TOPflash), TGF β - (3TP-Lux) und SRE-Bindungselementen durch K-Ras-Inhibition.

H358-Zellen wurden mit einem Firefly-Promotorkonstrukt, dem Expressionsplasmid pcDNA3.1 und dem Renilla-Reporterkonstrukt pRL-TK cotransfiziert. Die Ansätze wurden mit DMSO, MRTX-849 oder AMG-510 in den abgebildeten Konzentrationen behandelt. Die Inkubation erfolgte über 24 h. Die dargestellten relativen Promotoraktivitäten entsprechen dem auf die DMSO-Kontrolle normierten Verhältnis von Firefly-Luziferase-Aktivität zur Renilla-Luziferase-Aktivität. Abgebildet sind MW + SD von mind. drei unabhängigen Experimenten mit Darstellung der Einzelwerte. Die statistische Signifikanz wurde mittels *one sample* t-Test bestimmt und wird wie folgt abgebildet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$. Abkürzung: *relative Units* [rU].

Auffällig ist, dass die Behandlung mit AMG-510 10 nM ($0,76 \pm 0,10$; $0,90 \pm 0,05$;) oder MRTX-849 10 nM ($0,84 \pm 0,10$; $0,95 \pm 0,06$) verglichen mit der DMSO-Kontrolle keinen Einfluss auf die Aktivität des TOPflash- oder des 3TP-Lux-Reporters hat (siehe Abb. 12 B+C). Auch die in einem Versuchsansatz durchgeführte Steigerung der Konzentration von MRTX-849 oder AMG-510 auf 25 nM hat keinen Einfluss auf die Reporteraktivitäten (nicht abgebildet).

Die SRE-Reporteraktivität wird durch die Behandlung mit MRTX-849 2 nM ($1,14 \pm 0,10$), 10 nM ($0,82 \pm 0,08$) oder mit AMG-510 2 nM ($1,05 \pm 0,04$) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nicht beeinflusst. Die Behandlung mit AMG-510 10 nM ($0,75 \pm 0,09$) reprimiert in drei von sechs Experimenten leicht die Aktivität des SRE-Konstruktes. Eine weitere Erhöhung der Konzentration von AMG-510 auf 25 nM ($0,66 \pm 0,02$) zeigt eine signifikante Repression der relativen Reporteraktivität von SRE in allen drei experimentellen Ansätzen (siehe Abb. 12 A). MRTX-849 25 nM ($0,73 \pm 0,06$) reprimiert in der höchsten eingesetzten Konzentration die SRE-Reporteraktivität tendenziell nur leicht, jedoch statistisch signifikant ($p \leq 0,05$).

4.3.6 Einfluss der K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Promotoraktivität der Reporter für die Gene der Zell-Zell-Kontakt-Adhäsionsproteine E-Cadherin, N-Cadherin und Claudin 1

Die relative Promotoraktivität des Claudin 1-Reporters wird konzentrationsabhängig durch die Behandlung mit MRTX-849 2 nM ($1,66 \pm 0,08$), 10 nM ($1,87 \pm 0,07$), 25 nM

4. Ergebnisse

($2,56 \pm 0,13$; $n=2$) und 50 nM ($2,73 \pm 0,11$; $n=2$) gesteigert. Die Behandlung mit AMG-510 hingegen steigert die Aktivität des Claudin 1-Reporters erst bei den höheren Konzentrationen 25 nM ($2,4 \pm 0,22$) und 50 nM ($2,34 \pm 0,34$) deutlich (AMG-510 2 nM ($1,54 \pm 0,07$) oder 10 nM ($1,48 \pm 0,16$)) (siehe Abb. 13 C).

Sowohl MRTX-849 als auch AMG-510 beeinflussen in der Konzentration 2 nM ($0,93 \pm 0,13$; $0,86 \pm 0,13$) die relative Promotoraktivität des E-Cadherin-Reporters nicht. Bei Behandlung mit 10 nM ($0,76 \pm 0,06$; $0,80 \pm 0,05$) ist die relative Promotoraktivität des E-Cadherin-Reporters tendenziell leicht reprimiert (siehe Abb. 13 A).

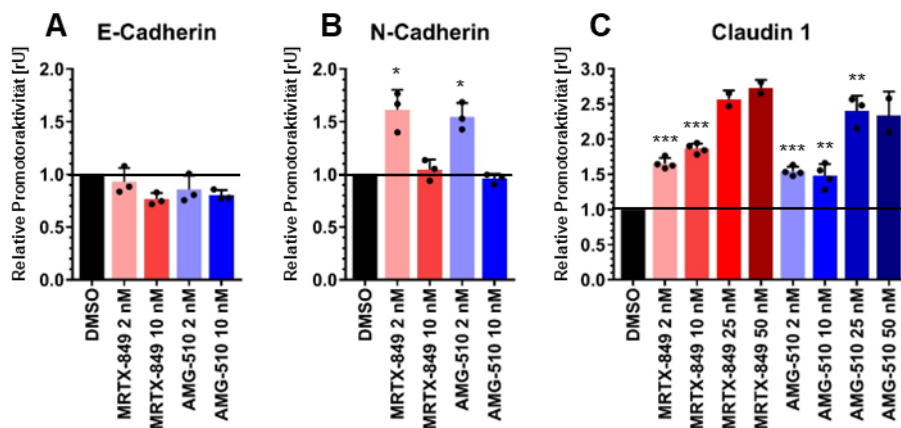


Abb. 13: Regulation der relativen Promotoraktivität der Reporter für Promotoren der Zell-Zell-Kontakt-Adhäsionsproteine E-Cadherin, N-Cadherin und Claudin 1 durch K-Ras-Inhibition.

H358-Zellen wurden mit einem Firefly-Promotorkonstrukt, dem Expressionsplasmid pcDNA3.1 und dem Renilla-Reporterkonstrukt pRL-TK cotransfiziert. Die Ansätze wurden mit DMSO, MRTX-849 oder AMG-510 in den abgebildeten Konzentrationen behandelt. Die Inkubation erfolgte über 24 h. Die dargestellten relativen Promotoraktivitäten entsprechen dem auf die DMSO-Kontrolle normierten Verhältnis von Firefly-Luziferase-Aktivität zur Renilla-Luziferase-Aktivität. Abgebildet sind MW + SD von i.d.R. drei unabhängigen Experimenten mit Darstellung der Einzelwerte. Die statistische Signifikanz wurde in Assays mit mind. drei unabhängigen Versuchen mittels *one sample t-Test* bestimmt und wird wie folgt abgebildet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$. Abkürzung: *relative Units* [rU].

Die relative Promotoraktivität des Reporterkonstruktes für N-Cadherin wird in zwei von drei Experimenten unter Behandlung mit der niedrigen K-Ras-Inhibitor-Konzentration MRTX-849 2 nM erhöht ($1,61 \pm 0,19$). Eine Behandlung mit AMG-510 2 nM hat ebenfalls eine leichte Erhöhung der N-Cadherin-Promotoraktivität ($1,55 \pm 0,13$) zur Folge, die statistisch signifikant ist ($p \leq 0,05$), aber knapp unterhalb des selbstgewählten Grenzwertes von 1,6 liegt. Eine Behandlung mit den höheren Konzentrationen MRTX-849 10 nM ($1,04 \pm 0,10$) sowie AMG-510 10 nM ($0,96 \pm 0,05$) hat wiederum verglichen mit der DMSO-Kontrolle keinen Einfluss auf die Aktivität des N-Cadherin-Konstruktes (siehe Abb. 13 B).

4.4 Transkriptionelle Regulation der Promotoraktivität von E-Cadherin- und N-Cadherin-Reportern

In Zusammenschau der Ergebnisse der Luziferase-Assays aus Kapitel 4.2 spielen potenziell folgende Transkriptionsfaktoren in der Regulation der EMT-assoziierten

4. Ergebnisse

Genexpression im NSCLC eine vielversprechende Rolle: ZEB1 Isoform 2, ZEB2, Snail1, Slug, Twist1, Cut-like 1 sowie Cut-like 2. Darauf aufbauend wurden in zwei Pilotexperimenten Luziferase-Assays mit der für die *KRAS*-Mutation G12C heterozygoten Zelllinie H358 unter Verwendung von Expressionsplasmiden der oben genannten Transkriptionsfaktoren und Reportern mit endogenen Promotorsequenzen der Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle E- und N-Cadherin durchgeführt (Abb. 14).

Die *Dual Luziferase Reporter Assays* wurden wie in den Kapiteln 3.1.5 und 3.2.7 beschrieben durchgeführt. In diesem Experiment wurde, wie auch in den H1299-Luziferase-Assays mit Coexpression eines Signalproteins, für die H358-Zellen eine Veränderung der Messwerte um $\geq 1,9 \times$ bzw. $\leq 0,65 \times$ als Grenzwert für eine Erhöhung bzw. Reprimierung der relativen Promotoraktivität festgelegt.

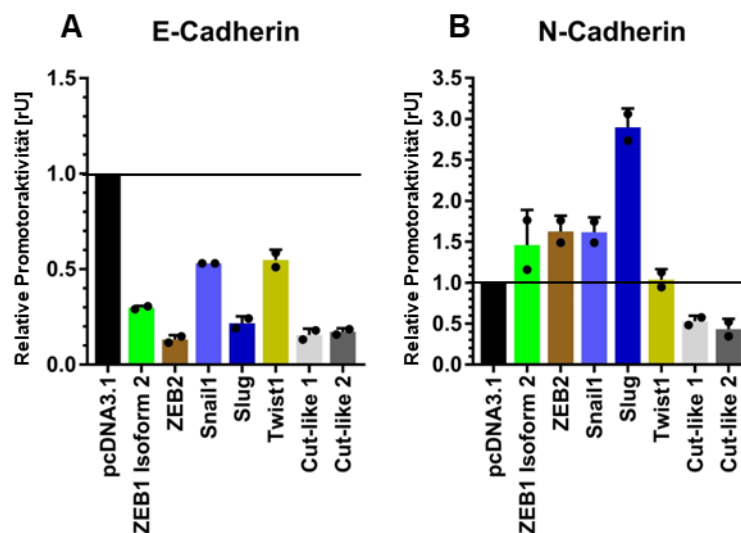


Abb. 14: Regulation der relativen Promotoraktivität der Reporter für Promotoren der Zell-Zell-Kontakt-Adhäsionsproteine E-Cadherin und N-Cadherin durch Transkriptionsfaktoren.

H358-Zellen wurden zeitgleich mit einem *Firefly*-Promotorkonstrukt, einem Expressionsplasmid oder pcDNA3.1 und dem *Renilla*-Reporterkonstrukt pRL-TK cotransfiziert. Die Inkubation erfolgte über 24 h. Die Luziferase-Transfektion erfolgte jeweils in Doppelwerten. Die dargestellten relativen Promotoraktivitäten entsprechen dem auf pcDNA3.1 normierten Verhältnis von *Firefly*-Luziferase-Aktivität zur *Renilla*-Luziferase-Aktivität. Abgebildet sind MW + SD von zwei unabhängigen Pilotexperimenten mit Darstellung der Einzelwerte. Abkürzung: *relative Units* [rU].

Die beiden Reporter zeigen deutliche Unterschiede in ihrem Promotor-Aktivitätsprofil. Alle untersuchten Transkriptionsfaktoren reprimieren die relative Promotoraktivität des E-Cadherin-Reporters. Dabei wird die E-Cadherin-Reporteraktivität unter Überexpression von ZEB2 ($0,13 \pm 0,02$), Cut-like 1 ($0,16 \pm 0,03$) und Cut-like 2 ($0,17 \pm 0,02$) sowie Slug ($0,22 \pm 0,04$) und ZEB1 Isoform 2 ($0,30 \pm 0,01$) besonders stark gehemmt. Die Transkriptionsfaktoren Snail1 ($0,53 \pm 0,01$) und Twist1 ($0,55 \pm 0,05$) reprimieren vergleichsweise in geringerem Ausmaß die relative Promotoraktivität des E-Cadherin-Reporters.

4. Ergebnisse

Die Promotoraktivität des N-Cadherin-Reporters wird durch Überexpression von Slug ($2,90 \pm 0,23$) deutlich gesteigert. Die Homöobox-Transkriptionsfaktoren Cut-like 1 ($0,53 \pm 0,07$) und Cut-like 2 ($0,43 \pm 0,12$) wirken reprimierend auf den N-Cadherin-Reporter. Verglichen mit den Ergebnissen des E-Cadherin-Reporters, wird die Aktivität des N-Cadherin-Reporters durch Cut-like 1 und Cut-like 2 jedoch weniger stark gehemmt. Die Transkriptionsfaktoren der ZEB-Familie ZEB1 Isoform 2 ($1,46 \pm 0,43$) und ZEB2 ($1,63 \pm 0,19$) sowie die Transkriptionsfaktoren Snail1 ($1,62 \pm 0,18$) und Twist1 ($1,04 \pm 0,13$) beeinflussen verglichen mit pcDNA3.1 die relative Promotoraktivität des N-Cadherin-Reporters hingegen nicht. Die Regulation des N-Cadherin-Reporters stellt sich damit differenzierter dar als die des E-Cadherin-Reporters. Betrachtet man die Transkriptionsfaktoren ZEB1 Isoform 2, ZEB2, Snail1 und Slug, so haben die beiden Reporter ein konträres Promotor-Aktivitätsprofil.

4.5 Zusammenfassung Reporterassays H358

In der Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Reporterassays mit H358-Zellen schematisch dargestellt (inklusive der Teilergebnisse aus Kapitel 8.2 im Anhang).

Tabelle 12: Reporter-Aktivitätsprofile der Zelllinie H358 unter K-Ras-Inhibition

Reporter	MRTX-849 2 nM	MRTX-849 10 nM	AMG-510 2 nM	AMG-510 10 nM
Ets				
AP1		-		-
Ets-AP1	-	-	?	-
c-MYC				
C/EBP	+		+	
NFκB	+		+	
Slug				
Cyclin D1	?		+	
P21Cip1				
TOPflash			?	(-)
3TP-Lux				
SRE				(-)
MMP9		(-)		-
E-Cadherin		(-)		(-)
N-Cadherin	(+)		?	
Claudin	+	+	(+)	
grün = erhöht; rot = verringert; (+) = tendenziell erhöht; (-) = tendenziell erhöht; weiß = ohne Einfluss; ? = uneindeutiges Ergebnis				

Die Ergebnisse wurden wie folgt als Aktivierung/Reprimierung gewertet: relative Promotoraktivität $MW \geq 1,6$ rU [+], relative Promotoraktivität $MW \leq 0,7$ rU [-]. Als tendenzielle

4. Ergebnisse

Aktivierung/Reprimierung wurde eine relative Promotoraktivität $MW \geq 1,5 \text{ rU [(+)}$, bzw. eine relative Promotoraktivität $MW \leq 0,8 \text{ rU [(-)}$ gewertet. Es wurden Standardabweichungen bis $\pm 0,15$ toleriert. Ergebnisse, die ober-/unterhalb der gewählten Grenze lagen, jedoch eine höhere Standardabweichung aufweisen, wurden wie folgt markiert [?].

Einige der Reporter werden vor allem durch Behandlung mit einem K-Ras-Inhibitor in der niedrigeren eingesetzten Konzentration in ihrer Aktivität beeinflusst (C/EBP, NF κ B, Cyclin D1, N-Cadherin, Claudin).

Hingegen werden die Aktivitäten der AP1-, Ets-AP1-, MMP9-, E-Cadherin- und z. T. des TOPflash-Reporters v. a. durch K-Ras-Inhibition in der höheren Konzentration gehemmt.

4.6 Einfluss der K-Ras-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Regulation der Promotoraktivität von Reportern in den Zelllinien HCC-44 und H23

Um die Ergebnisse der K-Ras-Inhibitionsversuche mit der Zelllinie H358 aus dem Kapitel 4.3 besser einzuordnen, wurde das Experiment um zwei Zelllinien erweitert. Die Zelllinie HCC-44 ist anders als H358 homozygot für die *KRAS* G12C-Mutation. Die Zelllinie H23 ist heterozygot für *KRAS* G12C. Darüber hinaus ist für diese Zellen jedoch die Expression von u. a. c-MYC, c-Raf 1, H-Ras, K-Ras und N-Ras beschrieben.

Die *Dual Luciferase Reporter Assays* wurden wie in den Kapiteln 3.1.4 und 3.2.7 beschrieben durchgeführt (siehe auch Tabelle 7 Kapitel 3.1.2). In dieser Arbeit wurden für die Zelllinien HCC-44 und H23 $\geq 1,9 \times$ bzw. $\leq 0,7 \times$ als Grenzwert für die Feststellung einer Erhöhung bzw. Reprimierung der relativen Promotoraktivität festgelegt.

Die Ets-AP1-Reporteraktivität wird in HCC-44-Zellen durch jeweils beide Inhibitoren sowohl in der niedrigen als auch in der hohen Konzentration stark reprimiert: MRTX-849 2 nM ($0,17 \pm 0,04$), MRTX-849 10 nM ($0,28 \pm 0,12$), AMG-510 2 nM ($0,21 \pm 0,11$) und AMG-510 10 nM ($0,38 \pm 0,07$) (Siehe Abb. 15 A und Abb. 8 C). Diese Ergebnisse sind ähnlich zu den entsprechenden Luciferase-Assays mit H358-Zellen.

Die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse der Behandlung mit den K-Ras-Inhibitoren in der Zelllinie HCC-44 unterscheiden sich hinsichtlich der Regulation der im Folgenden beschriebenen Reporteraktivitäten von der Zelllinie H358:

Nur mit den niedrigen Konzentrationen der Inhibitoren MRTX-849 2 nM und AMG-510 2 nM wird jeweils die Aktivität der Ets- ($0,45 \pm 0,16$; $0,51 \pm 0,11$), c-MYC- ($0,58 \pm 0,06$; $0,52 \pm 0,10$) und SRE-Reporter ($0,46 \pm 0,11$; $0,44 \pm 0,07$; $n=2$) reprimiert. Unter Behandlung mit der höheren Konzentration MRTX-849 10 nM ($0,97 \pm 0,06$ (Ets); $1,13 \pm 0,54$ (c-MYC); $0,76 \pm 0,09$ (SRE)) bzw. AMG-510 10 nM ($0,94 \pm 0,06$ (Ets); $0,85 \pm 0,26$ (c-MYC); $0,69 \pm 0,19$ (SRE)) unterscheiden sich die gemessenen Aktivitäten dieser Reporter verglichen mit der DMSO-Kontrolle nicht (siehe Abb. 15 B-D). Die Ergebnisse der relativen

4. Ergebnisse

Aktivitäten des C/EBP- und des Claudin 1-Reporters unter Behandlung mit MRTX-849 2 nM ($0,65 \pm 0,18$; $0,67 \pm 0,08$) liegen in jeweils einem der zwei Pilotexperimente in dem Bereich, der als Repression gewertet wurde. Unter AMG-510 2 nM ($0,63 \pm 0,06$; $0,64 \pm 0,04$) werden die Reporteraktivitäten des C/EBP- und des Claudin 1-Konstruktes deutlich reprimiert. Die Behandlung mit den höheren Konzentrationen MRTX-849 10 nM ($1,22 \pm 0,18$; $1,20 \pm 0,08$) und AMG-510 10 nM ($1,04 \pm 0,37$; $1,16 \pm 0,24$) beeinflusst die Aktivität beider Reporter im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle nicht (siehe Abb. 15 E+F). Die Ergebnisse der Aktivitäten des MMP9-Reporters unter Behandlung mit MRTX-849 2 nM ($0,54 \pm 0,24$) und AMG-510 2 nM ($0,55 \pm 0,24$) sind nicht eindeutig. In jeweils zwei von drei Versuchsansätzen wirken die K-Ras-Inhibitoren in der Konzentration 2 nM reprimierend auf die relative Promotoraktivität. Unter der Behandlung mit MRTX-849 10 nM ($0,80 \pm 0,09$) und AMG-510 10 nM ($0,98 \pm 0,27$) unterscheidet sich die relative Promotoraktivität des MMP9-Reporters nicht von der DMSO-Kontrolle (siehe Abb. 15 G).

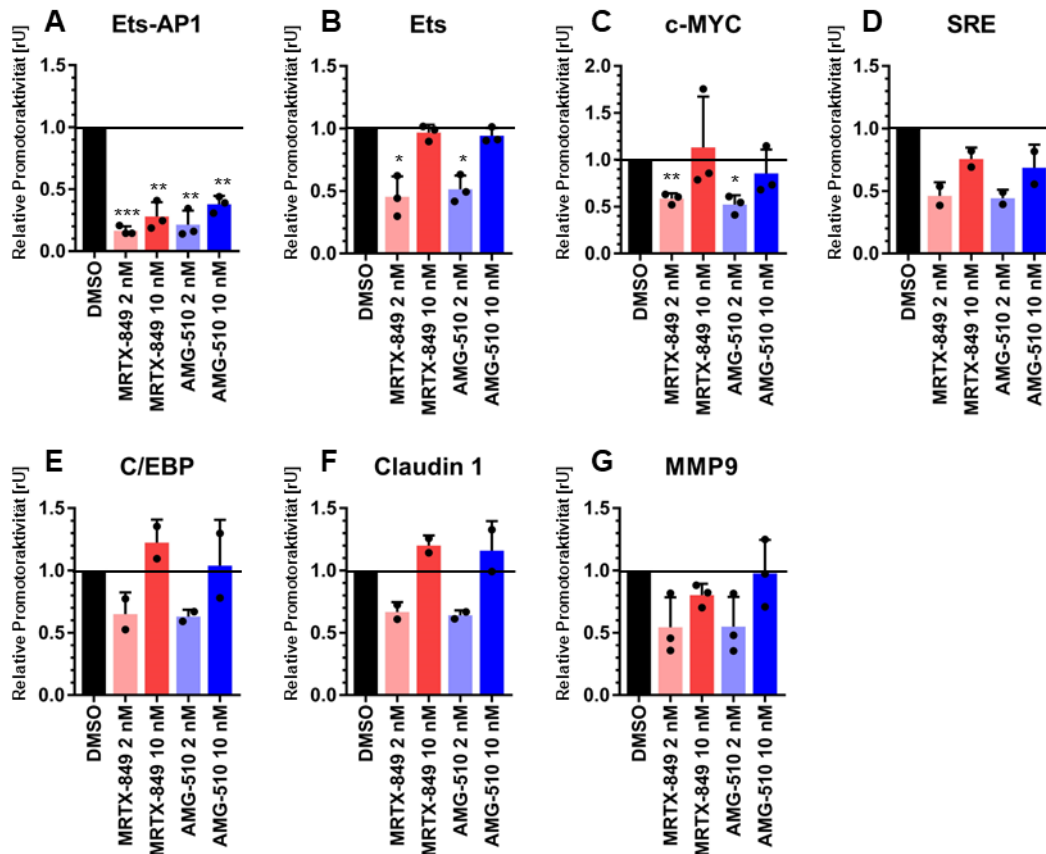


Abb. 15: Regulation der relativen Promotoraktivität der abgebildeten Reporter durch K-Ras-Inhibition in HCC-44-Zellen.

HCC-44-Zellen wurden mit einem *Firefly*-Promotorkonstrukt, dem Expressionsplasmid pcDNA3.1 und dem *Renilla*-Reporterkonstrukt pRL-TK cotransfiziert. Die Ansätze wurden mit DMSO, MRTX-849 oder AMG-510 in den abgebildeten Konzentrationen behandelt. Die Inkubation erfolgte über 24 h. Die dargestellten relativen Promotoraktivitäten entsprechen dem auf die DMSO-Kontrolle normierten Verhältnis von *Firefly*-Luziferase-Aktivität zur *Renilla*-Luziferase-Aktivität. Abgebildet sind MW + SD von mind. zwei unabhängigen Experimenten mit Darstellung der Einzelwerte. Die statistische Signifikanz wurde in Assays mit mind. 3 unabhängigen Versuchen mittels *one sample* t-Test bestimmt und wie folgt abgebildet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$. Abkürzung: *relative Units* [rU].

4. Ergebnisse

In der Zelllinie HCC-44 lagen die Luziferase-Werte der Reporter für AP1- und NFκB-Bindungselemente sowie die Reporter der Promotoren von Snail1, Slug, p21Cip1, Cyclin D1 und MnSOD, ebenso wie die Reporter TOPflash und 3TP-Lux deutlich unterhalb von 300 Lumeneinheiten. Gleichzeitig stabil hohe *Renilla*-Werte von 5.000-10.000 Lumeneinheiten zeigen, dass die Transfektion erfolgreich war. Demnach sind die Promotorfragmente der oben genannten Reporterplasmide nicht aktiv genug für eine messbare Luziferase-Expression (Ergebnisse nicht abgebildet).

Die Luziferase-Assays mit der Zelllinie H23 wurden als zwei voneinander unabhängige Pilotexperimente durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen zu diesen Assays sind im Anhang in Kapitel 8.3 tabellarisch zusammengefasst.

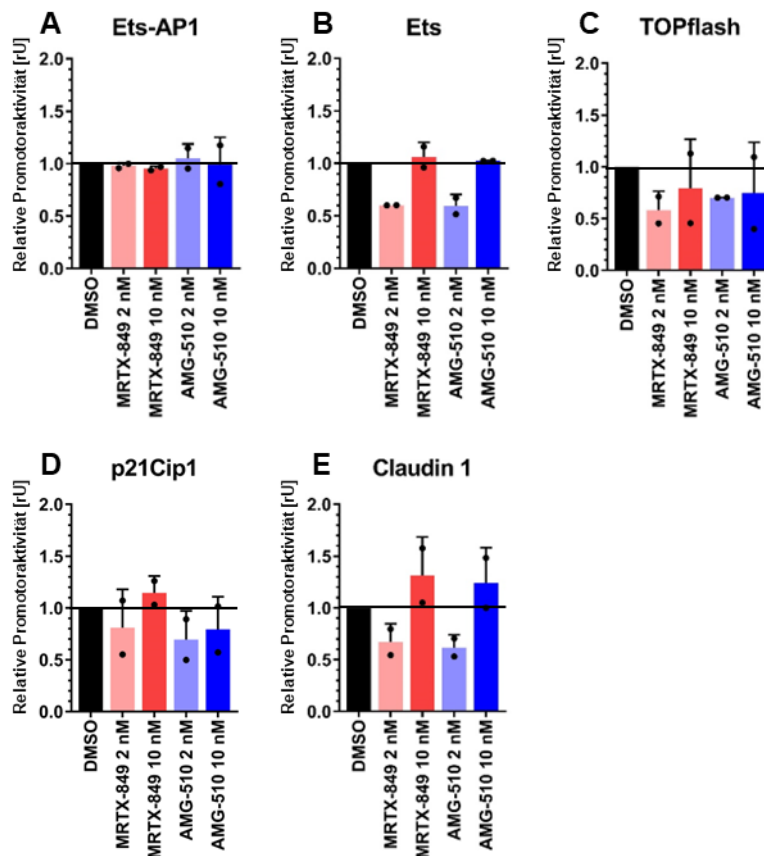


Abb. 16: Regulation der relativen Promotoraktivität der abgebildeten Reporter durch K-Ras-Inhibition in H23-Zellen.

H23-Zellen wurden mit einem *Firefly*-Promotorkonstrukt, dem Expressionsplasmid pcDNA3.1 und dem *Renilla*-Reporterkonstrukt pRL-TK cotransfiziert. Die Ansätze wurden mit DMSO, MRTX-849 oder AMG-510 in den abgebildeten Konzentrationen behandelt. Die Inkubation erfolgte über 24 h. Die dargestellten relativen Promotoraktivitäten entsprechen dem auf die DMSO-Kontrolle normierten Verhältnis von *Firefly*-Luziferase-Aktivität zur *Renilla*-Luziferase-Aktivität. Abgebildet sind MW + SD von zwei unabhängigen Pilotexperimenten mit Darstellung der Einzelwerte. Abkürzung: *relative Units* [rU].

4. Ergebnisse

Die Reporteraktivitäten von Ets-AP1 werden durch Behandlung mit einem K-Ras-Inhibitor nicht beeinflusst (siehe Abb. 16 A). Allerdings wird die Aktivität des Ets-Reporters bei Behandlung mit einem K-Ras-Inhibitor in der niedrigen Konzentration 2 nM gehemmt (siehe Abb. 16 B). Auch die TOPflash-Reporteraktivität sowie die Claudin 1-Promotoraktivität werden bei Behandlung mit einem K-Ras-Inhibitor in der Konzentration 2 nM tendenziell gehemmt (siehe Abb. 16 C+E). Aufgrund zu hoher Standardabweichungen bei nur zwei durchgeführten Versuchen, ist keine Aussage über eine Veränderung der TOPflash- oder der Claudin 1- Reporteraktivität unter K-Ras-Inhibition mit der Konzentration 10 nM möglich. Aus dem gleichen Grund kann auch keine Aussage über die Veränderung der p21Cip1-Promotoraktivität unter K-Ras-Inhibition getroffen werden. Zwischen den H23-Reporteraktivitätsprofile und den Ergebnissen der Zelllinie H358 gibt es keine Übereinstimmung (vgl. Abb. 7, 9, 11, 12).

4.7 Rolle des Wnt-Signalwegs in der Metastasierung des NSCLC

In den Luziferase-Assays wurde der TCF/LEF-Reporter TOPflash zur Untersuchung des Wnt-Signalwegs eingesetzt. In Form eines Ausblicks wird hierauf aufbauend der Einfluss der GSK-3-Inhibitoren LiCl, GSK-3-Inhibitor XIII und SB216763 auf die zelluläre Morphologie und die Expression des EMT-Proteins Vimentin und der Zellkontakt-Proteine Cadherin 11 und Paxillin in der NSCLC-Zelllinie H23 untersucht.

Die Phasenkontrastaufnahmen in Abb. 17 C+D zeigen, dass sich die H23-Zellen unter Behandlung mit LiCl 25 mM und LiCl 50 mM verschlanken und sich elongierte Zellausläufer ausbilden. Dies wird nachfolgend als mesenchymal veränderte Zellen beschrieben. Diese vermutete Veränderung muss jedoch durch weitere EMT-Marker-Analysen validiert werden.

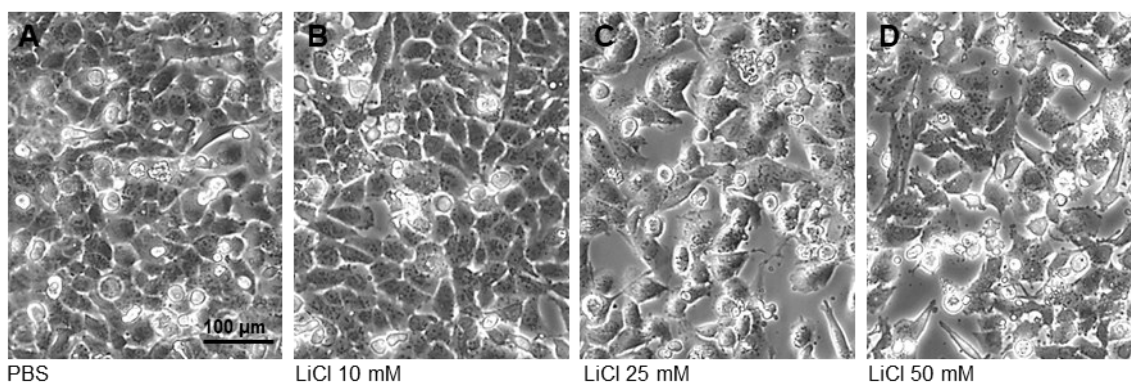


Abb. 17: Behandlung von H23-Zellen mit LiCl in einer Konzentrationsreihe.

Dargestellt sind Ausschnitte von Phasenkontrastaufnahmen. H23-Zellen wurden in den abgebildeten Konzentrationen mit dem GSK-3-Inhibitor LiCl über 24 h behandelt. Die Kontrollbehandlung erfolgte mit PBS. Unter Behandlung mit LiCl zeigen sich in einer Konzentration von 25 mM (C) vereinzelt und in einer Konzentration von 50 mM (D) ein hoher Anteil von Zellen mit mesenchymal veränderter Morphologie. Die wirksame Konzentration des GSK-3-Inhibitors LiCl wurde für die verwendeten NSCLC-Zelllinien auf 50 mM festgelegt. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Pilotexperimenten.

4. Ergebnisse

Unter Behandlung mit GSK-3-Inhibitor XIII bzw. SB216763 bilden die adhärenenten H23-Zellen in beiden ausgetesteten Konzentrationen eine mesenchymale Morphologie aus. Daneben steigt auch der Anteil abgekugelter, nicht vitaler Zellen (siehe Abb. 18 A+C-F, n=1).

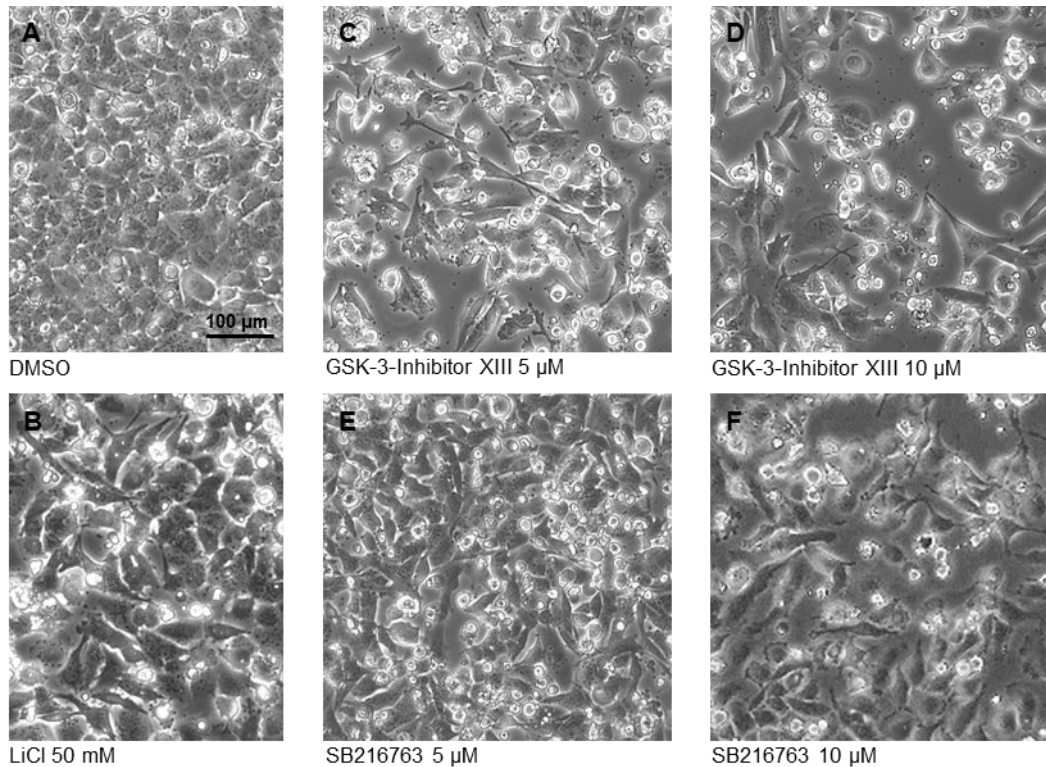


Abb. 18 GSK-3-Inhibition von H23-Zellen.

Dargestellt sind Ausschnitte von Phasenkontrastaufnahmen. H23-Zellen wurden mit GSK-3-Inhibitor XIII oder SB216763 in den abgebildeten Konzentrationen über 24 h behandelt. Die Positivkontrolle erfolgte mit LiCl 50 mM. Die Negativkontrolle erfolgte mit DMSO. GSK-3-Inhibitor XIII zeigt bei beiden Konzentrationen einen hohen Anteil mesenchymal veränderter Zellen. Unter Inhibition mit SB216763 sind ab einer Konzentration von 10 µM einzelne mesenchymale Zellen erkennbar. Der Anteil nicht vitaler Zellen ist unter Behandlung mit dem GSK-3-Inhibitor XIII hoch. Die Ergebnisse stammen aus einem Pilotexperiment.

Anschließend wurde mittels Western Blot untersucht, ob dieser Prozess mit einer veränderten Proteinexpression des mesenchymalen EMT-Proteins Vimentin oder der Zellkontakt-Proteine Cadherin 11 und Paxillin einhergeht. Die Behandlung mit LiCl 50 mM, GSK-3-Inhibitor XIII 10 µM oder SB216763 10 µM führt zu einer gesteigerten Proteinmenge von Vimentin (53 kDa) (siehe Abb. 19 A, n=3). Cadherin 11 (115 kDa) wird unter GSK-3-Inhibition mit dem GSK-3-Inhibitor XIII 10 µM und SB216763 10 µM leicht vermindert exprimiert. Auch die Proteinexpression von Paxillin (68 kDa) ist unter GSK-3-Inhibition tendenziell vermindert (siehe Abb. 19 A, n=1). Aufgrund der angedeuteten Unterschiede in der Proteinexpression wurde anschließend in einem Pilotexperiment der Wnt-Signalweg durch zeitgleiche Behandlung mit Wnt3a stimuliert. Insgesamt ist der Wnt-Signalweg in H23-Zellen jedoch nur schwach aktiv (siehe Abb. 19 B, n=1).

4. Ergebnisse

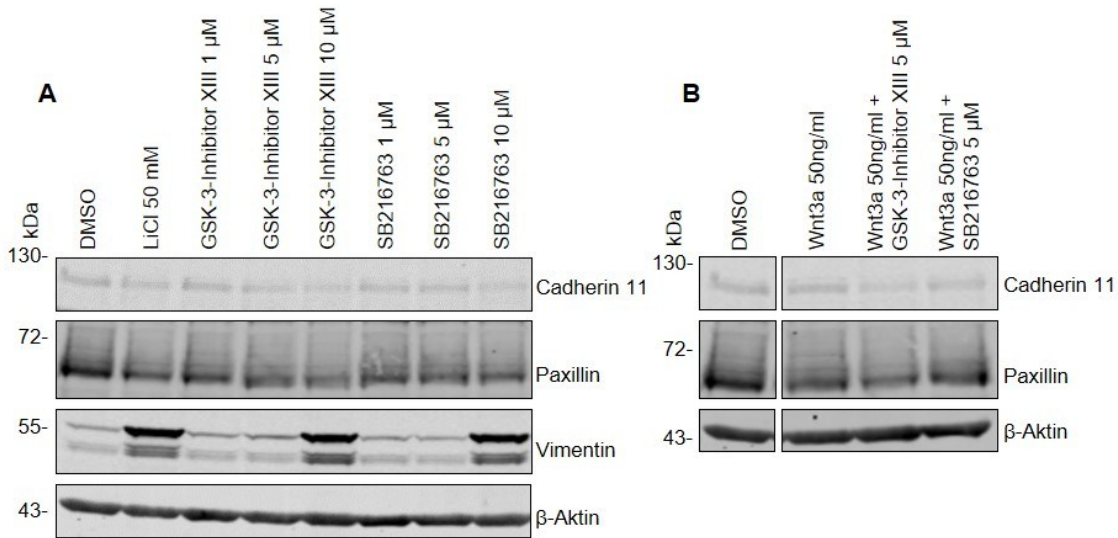


Abb. 19: Analyse des Einflusses der GSK-3-Inhibition auf die Proteinexpression des EMT-Proteins Vimentin und der Zellkontakt-Proteine Cadherin 11 und Paxillin in H23-Zellen.

H23-Zellen wurden mit GSK-3-Inhibitor XIII oder SB216763 in den abgebildeten Konzentrationen über 24 h behandelt (A). Darüber hinaus wurde eine Cobehandlung mit Wnt3a 50 ng/ml über 24 h durchgeführt (B). Die Positivkontrolle erfolgte mit LiCl 50 mM (A). Die Negativkontrolle erfolgte mit DMSO (A+B). Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert und je 50 µg Protein in 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und im Western-Blot-Verfahren analysiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels spezifischer Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper über Nah-Infrarot-Lumineszenz. Als Beladungskontrolle für die Gesamtzellextrakte dient β-Aktin. Abgebildet sind repräsentative Blots (n=3 (Vimentin), n=1 (Paxillin, Cadherin 11)).

5. Diskussion

5. Diskussion

Die Rolle von onkogenem K-Ras und TGF β 1 in der Karzinogenese und Metastasierung wird innerhalb der Forschung diskutiert und ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse geben neue Einblicke in die Funktion von Transkriptionsfaktoren und regulatorischen Signalproteinen in dem Prozess der EMT-assoziierten Genregulation des NSCLC.

5.1 Methodendiskussion

Zur Untersuchung der Funktion spezifischer regulatorischer DNA-Sequenzen im Rahmen der Genregulation wurden in dieser Arbeit Reporterassays verwendet. Mithilfe von Reporterassays kann der Aktivierungszustand von Genpromotoren bzw. typischen Transkriptionsfaktorbindestellen und damit die mögliche Transkription eines Gens beurteilt werden. Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von onkogenem K-Ras und TGF β 1 auf die Regulation von Genen, die mit einer EMT assoziiert sein können, zu untersuchen. Da die EMT ein komplexer Prozess ist, gibt es keinen bestimmten Reporter hierfür. Deshalb wurden zunächst Signalproteine bzw. Transkriptionsfaktoren (TGF β R1 ca, ZEB1 Isoform 1 und 2, Snail1, Slug, Twist1, LEF1, NF κ B) sowie Promotorfragmente und typische Transkriptionsfaktor-Bindesequenzen (Slug, MMP9; Smad-Element (3TP-Lux), TCF/Lef-Element (TopFlash), E-Cadherin, N-Cadherin) als Reporter ausgewählt, die in direktem Zusammenhang mit EMT-Prozessen beschrieben worden sind. Zusätzlich wurden weitere endogene Promotorsequenzen analysiert, die in einem indirekten Zusammenhang mit EMT und Metastasierung stehen könnten (c-myc, Cyclin D1, p21Cip1). Mithilfe von Reporterassays wurde der regulatorische Einfluss der Signalproteine und Transkriptionsfaktoren auf die Aktivität der endogenen Promotorsequenzen und typischen Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht. Letztendlich kann aus diesen Ergebnissen auf die Regulation der Transkription EMT-assoziiierter Gene geschlossen werden.

Die Methode ist aufgrund vielfältiger Anwendungsmöglichkeiten auch in der aktuellen Forschung verbreitet. Der Nachweis der Reporter-Genprodukte gelingt schnell und mit einer guten Sensitivität (146), (188). Allerdings bildet diese Methode der Genexpressionsanalyse nur einen Ausschnitt des Prozesses der Genregulation ab. Die Betrachtung der Ergebnisse sollte daher immer auch unter Berücksichtigung weiterer Regulationen anderer Prozesse der Proteinbiosynthese sowie epigenetischer Modifikationen erfolgen. Expressionskontrolle umfasst z. B. auch die Steuerung, ob ein Transkriptionsfaktor in den Kern transportiert wird (189). U. a. von der Chromatinstruktur hängt dann wiederum ab, ob das Gen transkribiert werden kann (190). *In vivo* sind die Halbwertszeiten der meisten Transkriptionsfaktoren eher kurz. Und aufgrund der Regulation der mRNA-

5. Diskussion

Translation sowie der mRNA- und Proteinhalbwertszeit u. a. durch posttranskriptionelle Modifikationen (191) entspricht die zelluläre Proteinmenge am Ende nicht unbedingt der Genpromotoraktivität.

Wie in Tabelle 13 dargestellt, sind die verwendeten Reporterplasmide sehr heterogen. Sie variieren sowohl in der Größe als auch in der Anzahl der enthaltenen Bindesequenzen (vgl. auch Tabelle 10). Außerdem wurden unterschiedliche Plasmide für diese Arbeit verwendet (u.a. pGL2, pGL3 und pGL4). Durch eine Weiterentwicklung der Plasmide über mehrere Generationen wird die Spezifität und Sensitivität erhöht. Die Heterogenität der in dieser Arbeit verwendeten Reporter erschwert also den Vergleich. Nach dieser explorativen Untersuchung sollten in zukünftigen systematischen Analysen idealerweise folgende Änderungen vorgenommen werden: a) die Bindungselemente sollten in demselben Plasmid vorhanden sein, vorzugsweise pGL4, b) pGL4.13[luc2/SV40] und pGL4.10[luc2] sollten als Kontrollplasmide verwendet werden, c) pGL4.74[hRluc/TK] sollte pRL-TK ersetzen, d) die Spezifität der Bindung sollte durch Mutation der Bindungselemente validiert werden.

Die meisten endogenen Reporter werden erst durch Binden an mehrere der Bindungssequenzen aktiviert. Viele Transkriptionsfaktoren werden wiederum durch Interaktion mit anderen DNA-bindenden Proteinen moduliert (122). Ein Beispiel hierfür ist der Smad-abhängige TGF β -Signalweg. Smad2 und Smad3 haben jeweils eine sehr geringe DNA-Affinität. Erst durch Interaktionspartner wie Coaktivatoren/-repressoren und sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren wie AP1 oder C/EBP wird die DNA-Affinität moduliert (192). Diese Interaktion von Signalproteinen mit anderen Cofaktoren wird wiederum durch posttranslationale Modifikationen (z. B. Acetylierung, Phosphorylierung) weiter moduliert. Auch der Transport der GTPase Ras innerhalb der Zelle wird auf diese Weise vielfach reguliert, was wiederum wesentlich für die Funktion von Ras ist (193). Mithilfe des Reporterassays wird demzufolge ein komplexer Prozess abstrahiert (u. a. zelluläre Mikroumgebung, regulierende Enzyme, Transkriptionsfaktoren, posttranskriptionelle Modifikationen, translationale Regulierung durch microRNAs, posttranslationale Modifikation), um diesen messbar zu machen.

Außerdem wird diskutiert, inwieweit das Reporterplasmid pRLTK zur internen Kontrolle für transiente Cotransfektions-Assays mit Ras-vermittelter Transkriptionsaktivierung geeignet ist, da bereits gezeigt wurde, dass onkogenes Ras Reporter, die wie pRLTK einen HSV-1-TK-Promotor beinhalten, hochregulieren kann (194).

5. Diskussion

Für die Reporterassays wurde die NSCLC-Zelllinie H1299 ausgewählt, da die Zellen leicht transfizierbar sind. Im Rahmen der Reporterassays kann aber nicht zwischen direkter und indirekter DNA-Interaktion unterschieden werden. Daher kann auch eine Interaktion der transfizierten Proteine mit endogenen Signalproteinen nicht ausgeschlossen werden. Für den Nachweis von Protein-DNA-Bindungen sind also im nächsten Schritt weiterführende Analysen z. B. mittels ChIP-Assay nötig.

Darüber hinaus können Transkriptionsfaktoren mit geringerer Affinität an Sequenzen binden, die strukturähnlich zu der eigentlichen Konsensussequenz sind (195), weshalb in dieser Arbeit nicht alle regulatorischen Stellen in den Promotoren erfasst werden. Insbesondere die Luziferase-Ergebnisse der endogenen Promotorfragmente sind demzufolge schwieriger zu interpretieren. Deshalb wurde in einem integrativen Ansatz analysiert, welche endogenen Reporter Bindungssequenzen aus synthetischen Reportern enthalten. Eine subjektive Auswahl ist schematisch in der Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Vergleich der enthaltenen Bindestellen zwischen synthetischen und endogenen Reportern

Synthetische Reporter	Ets	AP1	NFκB	C/EBP	TCF/LEF (TopFlash)	Smad (AP1-ähnlich) (3TP-Lux)	SRE	Weitere enthaltene Bindestellen
endogene Reporter								
E-Cadherin		2						3 E-Box 1 E-pal 2 Sp1
N-Cadherin						2		1 E-Box
c-myc					2			
Slug								3 E-Boxen 1 Sp1
Cyclin D1	3	1	3		1 (+4 potentielle)			1 CREB 1 E-Box 2 Sp1
P21Cip1				1				Mehrere Sp1- und p53
MMP9	1	2	1			1		1 Sp1

Wie in Kapitel 1.5 erläutert, können die DNA-Bindestellen von DNA-assoziierten Proteinen z. B. mittels ChIP-Analyse, nicht jedoch mittels Reporterassay detektiert werden. Dennoch lassen sich Hypothesen zum Bindevverhalten der Transkriptionsfaktoren aufstellen, wenn man deren genregulatorische Wirkung auf synthetische Reporter mit endogenen Reportern, die diese Sequenzen enthalten, vergleicht. In den nachfolgenden Kapiteln wird daher auch dieser Aspekt diskutiert.

5. Diskussion

In der Analyse der Lysate aus Luziferaseassays mittels Western Blot Abb. 2 fällt auf, dass für ZEB1 Isoform 1 und Cut-like 1 mehrere Banden erkennbar sind. Dabei kann es sich um posttranslational modifizierte Proteine, aber auch um weitere Isoformen handeln. Für die Isoformen beider genannten Proteine sind jedoch funktionelle Unterschiede beschrieben worden, die in dem Rahmen dieses Versuchsaufbaus nicht unterschieden werden können (104) (196).

Die ZEB Isoformen 1 und 2 wirken sehr unterschiedlich. ZEB1 Isoform 1 (Expressionsplasmid pCMV3/ZEB1-t1) wirkt stark aktivierend auf alle getesteten Reporter. Dieser Effekt ist unabhängig von der Zelllinie H1299. Auch in der Zelllinie H358 steigert ektop exprimiertes ZEB1 Isoform 1 deutlich die Promotoraktivität von Slug (34,61 rU) und C/EBP (11,98 rU) (Ergebnisse nicht abgebildet). Diese Ergebnisse sind funktionell jedoch nicht erklärbar. Die Sequenzen der verwendeten Expressionsplasmide stimmen mit den publizierten Sequenzen überein. Insgesamt ist daher von einer unspezifischen Wirkung des Plasmids oder einem technischen Artefakt auszugehen. Ein Grund könnte sein, dass der CMV-Promotor des Expressionsplasmides von ZEB1 Isoformen 1 einer der stärksten Promotoren ist. Das kann dazu führen, dass das rekombinante Protein vermehrt gebildet wird und dadurch die sehr hohe Konzentration des Proteins zu unspezifischen Bindungen führt (197). Für diese Hypothese spricht, dass in der Western Blot Analyse der Luziferase-Lysate ZEB1 Isoform 1 die stärkste Bande hat (siehe Abb. 2). Die entsprechenden Daten aus den Reporterassays lassen sich daher nur sehr begrenzt verwenden und werden hier nicht weiter diskutiert.

In den beiden hauptsächlich verwendeten Zelllinien H1299 und H358 wurde ein Teil der genutzten Reporterplasmide (z. B. NFAT, Glucose-6-Phosphatase, Snail 1) nur gering aktiviert. Die Luziferase-Werte dieser Reporter lagen in allen Versuchen deutlich unterhalb von 300 Lumeneinheiten bei einem gemessenen Hintergrund von 15-40 Lumeneinheiten. Gleichzeitig hohe Renilla-Werte von 10.000-70.000 Lumeneinheit zeigen, dass die Transfektion erfolgreich war. Da die entsprechenden Bindungssequenzen nicht aktiv waren, lassen sich eventuelle Aktivitätsänderungen nicht hinreichend verlässlich reproduzieren und interpretieren. Diese Messergebnisse sind demnach nicht valide und wurden daher aus den in den Kapiteln 4.2.6 und 4.5 dargestellten tabellarischen Zusammenfassungen der Reporter-Assays herausgenommen und im Anhang dargestellt.

Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist, dass für die experimentellen Analysen Zellen mit einer Passagezahl von bis zu 42 verwendet wurden. Dabei weichen einzelne Messergebnisse aus Versuchsansätzen mit einer Passagezahl über 37 deutlich ab

5. Diskussion

(Messungen vom 15.10.2020 und 21.10.2020, folgende Transkriptionsfaktoren steigerten einmalig enorm die Ets- und/oder die AP1-Reporteraktivität: TGF β R1 ca, TAK ca, ZEB1 Isoform 2 und p110 α , LEF1). Diese Einzelwerte sind als Ausreißer zu werten, da sie in weiteren Messungen mit Zellen einer geringeren Passagenzahl nicht reproduzierbar waren. Dennoch sind sie in der Statistik wie auch in den Abbildungen berücksichtigt und bedingen dadurch hohe Standardabweichungen. Die Ergebnisse unterstützen die allgemeine Literaturmeinung, dass mit zunehmender Passagezahl eine positive Selektion v. a. schnell wachsender Zellsubpopulationen stattfindet, wodurch einige Signalwege stark beeinflusst und Genexpressionsmuster, Proliferation und Migration verändert werden (198), (199).

5.2 Genexpressionsanalyse der analysierten Transkriptionsfaktoren und Signalproteine in Lungenadenokarzinomen

In der Datenbank COSMIC (Katalog der somatischen Mutationen bei Krebs) sind u. a. Genexpressionsanalysen verschiedener Lungentumorgewebeproben aufgeführt. Die Überexpression eines Gens führt tendenziell auch zu einer höheren Proteinmenge, wodurch wiederum nachgeschaltete Signalwege beeinflusst werden. In der nachfolgenden Tabelle ist der Anteil der Lungenadenokarzinom-Gewebeproben mit nachgewiesener verstärkter bzw. verminderter Expression verschiedener Gene dargestellt. Aus den Daten geht hervor, dass die meisten Gene, die in dieser Arbeit untersuchten Signalproteine häufiger verstärkt als vermindert exprimiert werden (TGF β R1 ca, TAK ca, ZEB1 Isoform 1 und 2, Snail1, Slug, Twist1, p110 α , Cut-like 1 und 2) (Tabelle 14). Die Daten legen nahe, dass in Lungenadenokarzinomen nicht ein Signalprotein allein, sondern vielmehr die Variabilität von für die Karzinogenese mitverantwortlichen Signalproteinen eine Rolle spielt.

Tabelle 14: Genexpressionsanalyse von Signalproteinen in Lungenadenokarzinomen

Gen (Protein)	Anteil der Gewebeproben mit Überexpression [%]	Anteil der Gewebeproben mit verminderter Expression [%]	Anzahl der untersuchten Gewebeproben insgesamt
<i>TGFBR1</i> (TGF β R1 ca)	4,0	-	378
<i>MAP3K7</i> (TAK ca)	3,7	2,6	378
<i>ZEB1</i> (ZEB1 Isoform 1 und 2)	3,7	0,5	378
<i>ZEB2</i> (ZEB2)	1,2	-	84
<i>SNAI1</i> (Snail1)	2,4	-	378
<i>SNAI2</i> (Slug)	3,4	-	378
<i>TWIST1</i> (Twist1)	2,1	-	378
<i>PIK3CA</i> (p110 α)	9,0	1,3	378

5. Diskussion

<i>PTEN</i> (PTEN)	3,4	6,1	378
<i>LEF1</i> (LEF1)	1,3	-	378
<i>FOXO3</i> (FOXO3a)	2,1	3,2	378
<i>CUX1</i> (Cut-like 1)	8,2	0,5	378
<i>CUX2</i> (Cut-like 2)	2,4	-	84

Es ist interessant die Funktion dieser Proteine als Signalprotein bzw. Transkriptionsfaktor in Lungenadenokarzinomzellen näher zu charakterisieren. Für die Reporterassays wurden in dieser Arbeit daher die Lungenadenokarzinom-Zelllinie (H1299) sowie die Zelllinie eines bronchoalveolären Karzinoms (H358) ausgewählt. In den nachfolgenden Kapiteln wird der Einfluss ausgewählter Signalproteine auf EMT und Metastasierung auf Grundlage der aktuellen Literatur diskutiert sowie anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse nach ihrem möglichen Einfluss auf die Induktion einer EMT eingeordnet.

5.3 Einfluss von TGF β -assoziierten Signalproteinen auf EMT und Metastasierung

Bereits in den einleitenden Kapiteln wurde näher auf die Schlüsselrolle von TGF β im Rahmen der EMT-assoziierten Genregulation eingegangen. Die Arbeitsgruppe um Thuaud et al. hat gezeigt, dass TGF β Smad-vermittelt die Genexpression von Snail1, Slug und Twist1 steigern kann (200). Die hier vorgestellten Daten zeigen jedoch, dass der TGF β R1 den Slug-Promotor hemmt. Möglicherweise ist die beobachtete Reprimierung von Slug auf Smad-unabhängige Signalwege zurückzuführen.

Die Smad-vermittelte Genexpression wird z. B. über AP1-Bindestellen aktiviert (201). Smad3-Proteine können durch Interaktion mit dem sequenzspezifischen Transkriptionsfaktor AP1 einen Aktivorkomplex bilden, der die Genexpression von Vimentin und Endothelin-1 steigern und darüber EMT und Proliferation steuern kann (58). Smad-Proteine können außerdem mit AP1 im Rahmen der Transkription von Proteinen der EZM interagieren (202). Chang et al. untersuchten *in vitro* die zeitliche Dynamik des Transkriptoms im Verlauf der EMT in NSCLC-Zellen. Dabei fanden sie heraus, dass JUNB neben ETS2 als einer der Haupttranskriptionsfaktoren der partiellen EMT gesehen werden kann (203). Die Wirkungen der Ets- und AP1-Transkriptionsfaktoren sind miteinander verknüpft. Als Teil des MAPK-Signalweges binden Ets-Transkriptionsfaktoren über zusammengesetzte Ets-AP-1-Bindestellen an Ras-responsive Promotoren (125). Darüber induziert Ets1 u. a. die Expression von Proteinen der AP1-Familie (204). Obwohl Smad-Proteine neben AP1- auch mit Ets-Transkriptionsfaktoren interagieren können (201) (124), zeigen die Daten der hier durchgeführten Genreporter-Assays, dass TGF β R1 nur auf kombinierte Ets-AP1-Bindungselemente, nicht aber auf alleinige Ets-

5. Diskussion

oder AP1-Bindungsmotive hemmend wirkt. Der verwendete AP1-Reporter enthält vier AP1-Bindesequenzen, der Ets-Reporter neben drei Ets-Bindestellen auch eine AP1- sowie eine TCF/Lef-Sequenz und der Ets-AP1-Reporter enthält jeweils drei Ets- und drei AP1-Sequenzen (siehe Tabelle 10). Die im Ets-AP1-Reporter enthaltene Ets-Bindesequenz 5'-GGAA-3' ist kurz und kann potenziell auch in anderen Konsensussequenzen enthalten sein (z. B. NF κ B, C/EBP, NFAT). Die Ets-Konsensussequenz 5'-GGAA/T-3' könnte im TGF β -Bindungselement 5'-GNNTTGGNGN-3' enthalten sein und weicht invers orientiert nur in einer Base von einem in der SMAD-Konsensussequenz 5'-GTCTAGAC-3' enthaltenen Sequenzausschnitt ab. Die im Ets-AP1-Reporter enthaltene AP1-Bindestelle 5'-TGACTCA-3' unterscheidet sich hingegen von den genannten Konsensussequenzen. Die beschriebenen Unterschiede zwischen den Sequenzen können Unterschiede im Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren und daraus resultierende Unterschiede der Genregulation erklären. Darüber hinaus könnte die räumliche Nähe von Ets- und AP1-Bindestellen (Ets-AP1-Reporter) eine Bindung von Cofaktoren von z. B. Smad begünstigen. Auch das Vorkommen zweier verschiedener potenzieller Bindestellen für Cofaktoren wie Ets und AP1 könnte statistisch gesehen eine Bindung wahrscheinlicher machen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der AP1-Reporter durch den TGF β R1 in zwei von vier Versuchen aktiviert. Da auch der 3TP-Lux-Reporter, welcher drei AP1- sowie weitere drei AP1-ähnliche Bindestellen enthält, durch TGF β R1 aktiviert wird, könnte die aktivierende Wirkung über diese vermittelt sein. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass es vom zellulären Kontext abhängt, ob die aktivierende Wirkung vermittelt wird, da in den anderen zwei von vier Versuchen TGF β R1 die Reporteraktivität von AP1 nicht beeinflusst.

Anhand der hier vorgestellten Daten ergibt sich darüber hinaus kein Anhalt für eine direkte oder indirekte Wirkung der klassischen EMT-Transkriptionsfaktoren (ZEB, Snail1, Slug, Twist1) auf den Smad-Reporter 3TP-Lux.

Wie in den nachfolgenden Kapiteln näher ausgeführt wird, vermitteln viele weitere mit EMT- und Metastasierung-assoziierte Signalproteine ihre Wirkung über AP1- und Ets-Transkriptionsfaktoren. Dazu passt, dass viele in der vorliegenden Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren (ZEB1 Isoform 2, Snail1, Slug, Twist1, LEF1, Cut-like 1 und 2) und Signalproteine (p110 α , TGF β R1) Ets-AP1-Bindesequenzen (Ets-AP1-Reporter) regulieren.

5.4 Einfluss von klassischen EMT-Transkriptionsfaktoren auf EMT und Metastasierung

Smad-Proteine können mit weiteren EMT-Transkriptionsfaktoren wie ZEB1, ZEB2 und TCF/LEF interagieren (58). Dabei bilden u. a. Smad2 und Smad3 mit ZEB1 oder ZEB2 einen Repressorkomplex, der u. a. die Genexpression von E-Cadherin hemmen kann. Darüber hinaus regulieren die ZEB-Transkriptionsfaktoren die Transkriptionsaktivität der Smad-Proteine antagonistisch (ZEB1 wirkt aktivierend, ZEB2 wirkt reprimierend) (205).

Auch ZEB1 kann über Bindung an AP1-Transkriptionsfaktoren an die DNA rekrutiert werden. In Brustkrebszellen führt die Bildung eines Aktivator-Komplexes, bestehend aus ZEB1, AP1 und Coaktivator YAP (Yes1 associated transcriptional regulator), zu einer verstärkten Expression tumorfördernder Zielgene (206). Die vorgestellten Daten der Reporterassays demonstrieren, dass ZEB1 neben AP1- auch Ets-, SRE- und NFκB-Motive aktivieren kann. Des Weiteren zeigen die Daten, dass ZEB1 die Promotorsequenzen von c-MYC und Slug aktivieren kann. Da die beiden Reporter keine der genannten Bindesequenzen beinhalten und lediglich für den Slug-Reporter E-Boxen beschrieben sind, könnte die Wirkung auf andere enthaltene Bindestellen zurückzuführen sein (siehe Tabelle 13). Es ist aber auch denkbar, dass ZEB1 hier über Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren genregulatorisch wirkt. Die NFκB-Bindestelle wird nicht nur durch ZEB1, sondern auch durch Slug aktiviert. Es wurde bereits beschrieben, dass der Transkriptionsfaktor NFκB die Promotoraktivität von *SNAI2* (Slug) und *ZEB1* steigert (207), (208). Demzufolge könnten NFκB und ZEB1 bzw. Slug sich reziprok in ihrer EMT-Wirkung verstärken.

Obwohl für die ZEB-Proteine eine funktionelle Ähnlichkeit in Bezug auf ihre DNA-Bindung beschrieben wurde (209), hat ZEB1 in den Reporterassays ein von ZEB2 deutlich verschiedenes Regulationsprofil. ZEB2 wirkt aktivierend auf AP1-Bindeelemente und die Promotorregulation von *SNAI2* und *MnSOD*. Da der MnSOD-Reporter auch AP1-Bindestellen enthält, könnte die aktivierende Wirkung über diese vermittelt sein. Außerdem wirkt ZEB2 schwach reprimierend auf den TCF/LEF1-Reporter TOPflash.

Gemmill et al. haben weitere EMT-relevante ZEB-responsive Targetgene des NSCLC identifizieren können. Hierzu zählen u. a. die Gene des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls EpCAM sowie des mesenchymalen Filamentproteins *VIM* (Vimentin). Dabei war eine vermehrte mRNA-Expression von ZEB1 positiv mit einer vermehrten mRNA-Expression von Vimentin, jedoch negativ mit der mRNA-Expression von EpCAM assoziiert (52). Interessanterweise stellten sie außerdem fest, dass dieses mesenchymale

5. Diskussion

Expressionsmuster signifikant mit ZEB 1 und 2, nicht jedoch mit Twist1, Snail1 oder Slug assoziiert war. Die Daten der vorliegenden Reporterassays deuten jedoch darauf hin, dass alle klassischen EMT-Transkriptionsfaktoren (ZEB1, ZEB2, Slug, Snail1 und Twist1) die *CDH1*-Promotoraktivität (E-Cadherin) in *KRAS*-mutierten NSCLC-Zellen deutlich reprimieren. Obwohl Snail1 eigentlich als der effektivere E-Cadherin-Repressor gilt (210), hemmt Slug verglichen mit Snail1 die Aktivität des *CDH1*-Promotors in dem in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Setup deutlich stärker. Darüber hinaus steigert Slug als einziger der getesteten EMT-Transkriptionsfaktoren zusätzlich die *CDH2*-Promotoraktivität (N-Cadherin) deutlich. Demnach weist in NSCLC-Zellen mit aktivierender *KRAS*-Mutation v. a. Slug ein mesenchymales Expressionsmuster auf. Insbesondere deuten die Ergebnisse auf eine genregulatorische Funktion von Slug für den Cadherin-*Switch* in Lungenkarzinomzellen hin (siehe Abb. 14).

Die alleinige Inhibition von K-Ras beeinflusst weder die *CDH1*-Promotoraktivität (siehe Kapitel 4.3.6) noch die Proteinexpression von E-Cadherin (Ergebnisse nicht dargestellt) in *KRAS*-mutierten Zellen. In einer parallel durchgeführten Arbeit konnte Liz Nagel anhand von Western Blot-Analysen zeigen, dass in H358-Zellen insbesondere die *KRAS*-mutierte Zelllinie H358 vergleichsweise viel endogenes Snail1 und Slug enthält. Ihre Daten deuten darauf hin, dass *KRAS* G12C auf Proteinebene zu einer verminderten Expression von Slug, nicht aber von Snail1 führt (Liz Nagel, Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, in Vorbereitung). Dies verdeutlicht, dass EMT-Transkriptionsfaktoren komplexer reguliert werden als stellenweise angenommen.

Slug interagiert mit mehr Reportern als Snail1 oder Twist1. Neben EMT-assoziierten Promotorfragmenten und Bindungselementen (NF κ B, Slug) reguliert Slug auch viele weitere Reporter (SRE, C/EBP, c-MYC, Cyclin D1, p21Cip1). Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass Slug in der EMT- und Metastasierungs-assoziierten Genregulation des NSCLC eine Schlüsselrolle spielen könnte.

SNAI2 (Slug) wird transkriptionell u. a. direkt TGF β 1-abhängig durch Smad-Proteine und Wnt-abhängig durch den TCF/ β -Catenin-Komplex reguliert (168). Diese Wirkung wird u. a. ebenfalls über mehrere im *SNAI2*-Promotor (Slug) enthaltene AP1-Konsensussequenzen vermittelt (168). Darüber hinaus kann Slug seinen eigenen Promotor transkriptionell aktivieren (211), was auch die Daten der hier vorgestellten Reporterassays bestätigen. Da der *SNAI2*-Promotor mehrere AP1-Konsensussequenzen enthält (168), könnten AP1 und Slug sich reziprok in ihrer Wirkung verstärken. Eine regulatorische Wirkung über andere enthaltene Bindemotive kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die

5. Diskussion

Ergebnisse der Reporterassays zeigen darüber hinaus, dass Snail1 Ets-Elemente und Slug AP1-Elemente aktiviert. Beide Transkriptionsfaktoren wirken aktivierend auf kombinierte Ets-AP1-Elemente. Dieser Unterschied könnte auf einen möglichen molekularen Mechanismus deuten, der zu den unterschiedlichen Effekten von Snail1 und Slug führt. Das müsste in weiterführenden Experimenten detaillierter untersucht werden.

Slug ist außerdem für die Einleitung der EMT durch Twist1 essenziell. Im Mausmodell konnten Casas et al. feststellen, dass die Expression von Twist1 nur in Kombination mit Slug Fernmetastasierung auslöste. Daher ist es nicht verwunderlich, dass Twist1 durch Bindung an im *SNAI2*-Promotor enthaltenen E-Boxen die Transkription von Slug direkt induzieren kann (83). Diese Beobachtung ist jedoch anhand der hier vorgestellten Ergebnisse eher nicht auf NSCLC-Zellen übertragbar, da Twist1 den Slug-Reporter in diesem experimentellen *Setup* nicht direkt reguliert.

Der Transkriptionsfaktor NFκB induziert EMT durch Reprimierung der Genexpression von E-Cadherin und Steigerung der Genexpression von Vimentin (208). Pires et al. haben die Interaktion von NFκB mit den klassischen EMT-Transkriptionsfaktoren als mögliche *downstream targets* untersucht und dabei herausgefunden, dass ein *Knockdown* von NFκB in Brustkrebszelllinien zu einer verringerten Genexpression von Slug, Snail1, Twist1 und ZEB1 führt (207). In weiterführenden CHIP- und Luziferase-Assays konnte die Arbeitsgruppe außerdem zeigen, dass NFκB an den *SNAI2*-Promotor bindet und diesen aktiviert. Darüber hinaus wurde für NFκB beschrieben, dass es in Transfektionsversuchen die ZEB1-Promotoraktivität steigern und darüber EMT-Prozesse auslösen kann (208). Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten der Reporterassays unterstützen diese Hypothesen, da Slug und ZEB1, auf NFκB-Bindestellen aktivierend wirken können.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der hier vorgestellten Reporterassays darauf hin, dass im NSCLC vor allem ZEB 1 Isoform 2 und Slug an der EMT-Auslösung beteiligt sein können.

5.5 Einfluss von Cut-like-Proteinen auf EMT und Metastasierung

Neben den klassischen EMT-Transkriptionsfaktoren wird zunehmend auch die Rolle der Cut-like Proteine in der EMT-assoziierten Genregulation diskutiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass TGFβ auch die Proteinexpression von Cut-like 1 steigert, welches wiederum reziprok den TGFβR1 aktivieren und darüber potenziell EMT-Prozesse auslösen kann (178), (212). Die vorliegende Arbeit unterstützt eine synergistische Wirkung

5. Diskussion

zwischen Cut-like 1 und TGF β 1 über Smad-vermittelte Genregulation (3TP-Lux-Reporter). Die Daten der Reporterassays deuten außerdem darauf hin, dass Cut-like 1 die *CDH1*-Promotoraktivität deutlich reprimiert. Allerdings reprimiert Cut-like 1 auch die *CDH2*-Promotoraktivität (siehe Kapitel 4.4).

Cut-like 1 fungiert durch kurzzeitiges Binden an CCAAT- oder Sp1-Bindestellen häufig als Transkriptionsrepressor (213). Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten darüber hinaus darauf hin, dass Cut-like-Proteine C/EBP- und kombinierte Ets-AP1-Bindesequenzen regulieren können. Coqueret et al. stellten anhand von embryonalen Zellen bereits fest, dass die Bindung von Cut-like 1 an die Konsensus-Bindestelle je nach Proteinkonzentration und je nach posttranslationaler Modifikation während des Zellzyklus variiert. Ihren Beobachtungen entsprechend könnte Cut-like 1 ein zellzyklusabhängiger Transkriptionsrepressor sein, der die *CDKN1A*-Genexpression (Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor p21Cip1) in der S-Phase hemmt und darüber den Zellzyklus fördert (214). Die Daten der Reporterassays deuten jedoch darauf hin, dass Cut-like 1 in NSCLC-Zellen den *CDKN1A*-Promotor aktiviert.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Reporterassays darauf hin, dass Cut-like 1 kein klassischer EMT-Transkriptionsfaktor ist. Allerdings könnte das Protein durch Interaktion z. B. mit TGF β EMT fördern.

5.6 Einfluss von ausgewählten Signalproteinen auf verwendete Zellzyklus-Reporter

Ein wichtiges Kennzeichen der Tumorzelle ist nach Hanahan et al. u. a. auch die Umgehung der Apoptose durch Interaktion mit Zellzyklusproteinen (3). Untersucht man EMT- und Metastasierungs-assoziierte Genregulation, ist daher auch eine ergänzende Analyse der Genregulation von Zellzyklusproteinen sinnvoll.

Die Forschungsergebnisse von Bottazzi et al. sprechen dafür, dass p21Cip1 zu Beginn der G1-Phase induziert wird. Diese p21Cip1-Induktion erfordert die Interaktion mit Wachstumsfaktoren und ist ERK-abhängig (215). Neuere Forschungsergebnisse legen nahe, dass Ras in der G1-Phase hauptsächlich über Erk signalisiert, jedoch auch über PI3K/Akt und Cyclin D, was den Eintritt in die S-Phase fördert (216). Der Wachstumsfaktor TGF β z. B. kann den Zellzyklus in der G1-Phase noch durch Induktion von p21Cip1 hemmen (217). Hierfür interagieren Smad-Proteine mit dem Sp1-Transkriptionsfaktor, welcher über Sp1-Bindesequenzen den *CDKN1A*- (p21Cip1) Promotor

5. Diskussion

aktiviert (218). Erst im Verlauf der G1-Phase wird p21Cip1 schließlich reprimiert, was Zellwachstum ermöglicht (215).

Die Daten der hier vorgestellten H1299-Reporterassays deuten jedoch darauf hin, dass der TGF β R1 den *CDKN1A*-Promotor in NSCLC-Zellen hemmt und damit prinzipiell eine Zellzyklusprogression bewirken kann. Allerdings kann keine Aussage darüber getroffen werden in welcher Phase des Zellzyklus die Mehrheit der Zellen zum Messzeitpunkt war. Wie vorangegangen dargestellt hängt jedoch vom Zellkontext ab, wie p21Cip1 wirkt.

Die Ergebnisse der H358-Reporterassays wiederum zeigen für *KRAS*-mutierte NSCLC-Zellen, dass TGF β 1 entsprechend der Literaturmeinung (217) den p21Cip1-Promotor aktiviert. Interessanterweise ist die p21Cip1-Promotoraktivität bereits bei K-Ras-Inhibition in der geringeren Konzentration signifikant vermindert. Eine Inhibition von K-Ras in der wirksamen Konzentration hebt schließlich die Aktivierung des p21Cip1-Promotors auf. Diese Beobachtung deutet auf eine Interaktion zwischen TGF β 1 und K-Ras hin. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe um Kivinen et al.: Anhand muriner Fibroblastenzellen konnten sie auf Proteinebene zeigen, dass die TGF- β 1 induzierte Phosphorylierung von p21Cip1 durch MEK1(/2)-Inhibition nach zwölf-stündiger Behandlung aufgehoben wurde (219).

Die im Ergebnisteil dargestellte Aktivierung der beiden Zellzyklus-Reporter p21Cip1 und Cyclin D1 durch Slug könnte über die jeweils enthaltenen Bindestellen AP1, NF κ B bzw. C/EBP vermittelt werden, da Slug die jeweiligen synthetischen Reporter ebenfalls aktiviert. Snail1 hingegen wirkt aktivierend auf Ets- und C/EBP-Motive. Da der Cyclin D1-Reporter viele Ets-Elemente enthält und für den p21Cip1-Promotor ein C/EBP-Element beschrieben ist, könnte Snail1 jeweils über diese Elemente aktivierend wirken.

5.7 Einfluss von K-Ras-Inhibition auf die verwendeten Reporter

Die in dieser Arbeit durchgeführten Reporterassays in der Zelllinie H358, die eine endogene *KRAS* G12C Mutation enthält, zeigen, dass eine K-Ras-Inhibition durch MRTX-849 oder AMG-510 nicht nur Einfluss auf klassische Proliferationszusammenhänge (Ets-AP1, NF κ B, C/EBP), sondern z. B. auch auf E-Cadherin und MMP9 hat (siehe Tabelle 12).

Insgesamt fällt bei detaillierter Betrachtung der Ergebnisse auf, dass die K-Ras-Inhibition häufig konzentrationsabhängig wirkt. Interessanterweise werden viele Reporter eher durch K-Ras-Inhibition in der niedrigeren Konzentration aktiviert (NF κ B, C/EBP, Cyclin D1, Topflash, N-Cadherin) (siehe Kapitel 4.3.2 bis 4.3.5). Diese Beobachtung kann durch

5. Diskussion

das in der Literatur bisher wenig beachtete pharmakologische Phänomen der Hormesis erklärt werden. Diese Dosis-Wirkungs-Beziehung ist dadurch gekennzeichnet, dass eine Stimulation bei Einsatz einer niedrigen Konzentration und eine Hemmung bei Einsatz einer höheren Konzentration erreicht wird. Dieser Effekt wurde in mehreren Studien beobachtet (220). Es wurden bereits für mehr als 130 verschiedenen humanen Tumorzelllinien, darunter auch NSCLC-Zelllinien, hormetik-ähnliche, biphasische Dosis-Konzentrations-Reaktionen beschrieben (221). Diese stimulierende Reaktion im niedrigen Dosisbereich wird über eine kompensatorische Reaktion erklärt, welche jedoch mit Verlängerung der Versuchsdauer wieder nachlässt. Da in dieser Arbeit der Fokus auf der kurzfristigen Genregulation lag und die Versuchsdauer daher mit 24 h eher kurz gewählt wurde, könnte dieses Phänomen die Beobachtung erklären. Letztendlich ist jedoch auch ein methodischer Einfluss im Sinne experimenteller Fehlermöglichkeiten als Ursache nicht auszuschließen.

Für K-Ras wurde der Hormesis-Effekt bisher nur für die Wirkung von Strahlentherapie diskutiert, nicht jedoch für die Wirkung der neuen sogenannten zielgerichteten Therapien. So konnten Kim et al. anhand humaner Zellen demonstrieren, dass besonders niedrig dosierte Bestrahlung die K-Ras-induzierte Zelltransformation durch Verringerung von ROS-Bildung reduziert (222). Bereits in den ersten pharmakokinetischen Analysen von MRTX-849 wurde allerdings gezeigt, dass die maximale und dauerhafte Antitumoraktivität dosisabhängig in den höheren Dosierungen wirksamer war (223). Insgesamt könnte der Versuchszeitraum mit 24 h demnach zu kurz gewählt sein.

Da beide verwendeten K-Ras-Inhibitoren als kovalente, irreversible K-Ras G12C-Inhibitoren molekular und atomistisch sehr ähnlich wirken (224), unterscheiden sich die jeweiligen Ergebnisse in dieser Arbeit nicht nennenswert voneinander.

Aufgrund von eingeschränkter Plasmidexpression in der *KRAS*-mutierten Vergleichszelllinie H23 und teilweise auch in HCC-44, sind die Ergebnisse nur eingeschränkt mit den Daten der Reporterassays von H358 vergleichbar. Sowohl in H358- als auch in HCC-44-Zellen bewirkt die K-Ras-Inhibition eine konzentrationsabhängige Reprimierung von Ets-AP1-Elementen. In HCC-44-Zellen ist diese Reprimierung deutlich stärker ausgeprägt. Dies kann durch die Homozygotie von HCC-44-Zellen für die *KRAS*-Mutation G12C erklärt werden. In beiden Zelllinien führt die K-Ras-Inhibition außerdem zu einer Hemmung von SRE-Motiven. In HCC-44-Zellen kann diese Wirkung v. a. bei der niedrigsten Inhibitorkonzentration (AMG-510 bzw. MRTX-849 2 nM) beobachtet werden, während in H358-Zellen nur die jeweils höchste eingesetzte Inhibitorkonzentration von 25 nM SRE-Motive reprimiert. An SRE-Motive binden u. a. SRF-Transkriptionsfaktoren (225). Diese

5. Diskussion

regulieren z. B. als *Downstream Target* des MAPK-Signalwegs die Expression von Genen, die die Aktindynamik modulieren und dadurch Zellmigration steuern können (226). Die Inhibition von onkogenem K-Ras könnte demnach über die Hemmung von SRE-Elementen Migration und Metastasierung unterdrücken. Darüber hinaus bewirkt die K-Ras-Inhibition ebenfalls in beiden Zelllinien die Hemmung des MMP9-Promotors. In H358-Zellen ist diese Wirkung vor allem in der höheren eingesetzten Inhibitorkonzentration von 10 nM zu beobachten. In HCC-44-Zellen eher in der geringeren Konzentration von 2 nM. Die Matrixmetalloprotease MMP9 baut extrazelluläre Matrix ab. Im Rahmen der Karzinogenese erleichtert dieser Prozess die Invasion maligner Zellen (47). Durch Herunterregulierung der MMP9-Promotoraktivität könnte demzufolge die Inhibition von onkogenem K-Ras die Invasivität von Tumorzellen hemmen.

6. Zusammenfassung

6. Zusammenfassung

Viele Tumorzellen durchlaufen während der Karzinogenese einen EMT-Prozess, in dessen Rahmen die Zelle epitheliale Charakteristika zugunsten mesenchymaler Eigenschaften verliert. Dieser Vorgang wird durch eine veränderte Genregulation mit konsekutiv veränderter Proteinexpression hervorgerufen. Für die Zell-Zell-Kontakte bedeutet dies durch den sog. *Cadherin Switch* mit Hochregulation von N-Cadherin und Reprimierung von E-Cadherin eine Dedifferenzierung und Stabilitätsverlust, der Metastasierung erleichtert. Dabei spielt neben dem Zytokin TGF β 1 auch das Proto-Onkoprotein K-Ras, welches in vielen NSCLC-Adenokarzinomen mutiert ist, eine Schlüsselrolle in der EMT-Induktion. Ihre Wirkung vermitteln die beiden Proteine über verschiedene nachgeschaltete Signalwege u. a. durch Induktion und/oder Interaktion mit den klassischen EMT-Transkriptionsfaktoren Snail1, Slug, Twist1, ZEB1 oder ZEB2.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Reporterassays die Rolle von K-Ras und TGF β 1 in der EMT-assoziierten Genregulation von NSCLC-Zelllinien untersucht. Neben den klassischen EMT-Transkriptionsfaktoren wurden auch weitere potenziell relevante Transkriptionsfaktoren und häufig vorkommende DNA-Bindesequenzen betrachtet.

Dabei deuten die Ergebnisse auf eine genregulatorische Schlüsselrolle von Slug hin, während Snail1 und Twist1 eine deutlich untergeordnete Rolle spielen. ZEB1 Isoform 2 und ZEB2 wiederum regulieren EMT-assoziierte Gene sehr unterschiedlich. Diese Arbeit verdeutlicht, dass die in der Literatur häufig unter dem Sammelbegriff EMT-Transkriptionsfaktoren zusammengefassten Proteine die Genregulation differenzierter und individueller steuern als stellenweise angenommen. Darüber hinaus war auch eine genregulatorische Funktion der Smad-Transkriptionsfaktoren nach TGF β -Rezeptor-1-Aktivierung nachweisbar. Für Cut-like 1 deuten die erzielten Daten auf eine mögliche Rolle in der EMT-assoziierten Genregulation des NSCLC hin und sollten weiter untersucht werden.

In einem weiteren Schritt wurde außerdem der Einfluss der K-Ras-Inhibition auf die EMT-assoziierte Genregulation analysiert. Hier weisen die Ergebnisse auf eine hormetik-ähnliche Dosis-Wirkungs-Beziehung beider K-Ras-Inhibitoren (MRTX-849 und AMG-510) bei einer Behandlungsdauer von 24 h in der Zelllinie H358, die eine heterozygote Mutation im *KRAS*-Gen hat, hin. Interessanterweise wurden unter K-Ras-Inhibition insbesondere kombinierte Ets-AP1- und C/EBP-Sequenzen sowie der Promotor von NF κ B reguliert, welcher bis dato in der Literatur eher wenig beachtet wurden.

Aufgrund der methodischen Limitationen kann die vorliegende Arbeit nur auf genregulatorische Zusammenhänge hindeuten. Für den Nachweis von Protein-DNA-Bindungen und deren molekulare Auswirkungen auf die Regulation der EMT müssen hierauf aufbauende, weiterführende Analysen angeschlossen werden.

7. Abstract

7. Abstract

During carcinogenesis, many tumor cells undergo an EMT process in which the cell loses epithelial characteristics in favour of mesenchymal properties. This process is caused by altered gene regulation. For the cell-cell contacts, this means dedifferentiation and loss of stability due to the so-called cadherin switch with upregulation of N-cadherin and repression of E-cadherin, which supports metastatic processes. In addition to the cytokine TGF β 1, the proto-oncoprotein K-Ras, which is mutated in many NSCLC adenocarcinomas, also plays a key role in EMT induction. The two proteins mediate their effect via various downstream signaling pathways, including induction and/or interaction with the classical EMT transcription factors Snail1, Slug, Twist1, ZEB1 and ZEB2. In the present study, the role of K-Ras and TGF β 1 in EMT-associated gene regulation of NSCLC cell lines was investigated using reporter assays. In addition to the classical EMT transcription factors, other potentially relevant transcription factors and frequently occurring DNA binding sequences were examined.

The results indicate a key gene regulatory role of Slug, while Snail1 and Twist1 play a minor role. ZEB1 isoform 2 and ZEB2 in turn regulate EMT-associated genes very differently.

This work illustrates that proteins often summarized in the literature under the collective term “EMT transcription factors” control gene regulation in a more differentiated and individual way than sometimes assumed.

In addition, a gene regulatory function of the Smad transcription factors after TGF β receptor 1 activation was also detectable. For Cut-like 1, the obtained data indicate a possible role in EMT-associated gene regulation of NSCLC and should be further investigated.

In a further step, the influence of K-Ras inhibition on EMT-associated gene regulation was also analyzed. Here, the results indicate a hormetic-like dose-response relationship of both KRAS inhibitors (MRTX-849 and AMG-510) after a treatment of 24 h in the cell line H358, which has a heterozygous mutation in the *KRAS* gene. Interestingly, K-Ras inhibition particularly regulated combined Ets-AP1 and C/EBP sequences, as well as the promoter of NF κ B.

Due to methodological limitations, the present work can only suggest gene regulatory relationships. For the detection of resulting protein changes and of additional protein-DNA interactions and their molecular effects on the regulation of EMT, further analyses are necessary to provide more detailed insights.

8. Anhang

8.1 Einfluss von Transkriptionsfaktoren und Kinasen auf die Regulation der Reporter für MnSOD-, G6Pase- MMP9- und Snail1-Promotoren sowie des Transkriptionsfaktors NFAT

Die im Luziferase-Experiment in H1299-Zellen bestimmten Aktivitäten der genannten Reporter sind in Abb. 20 zusammengefasst dargestellt.

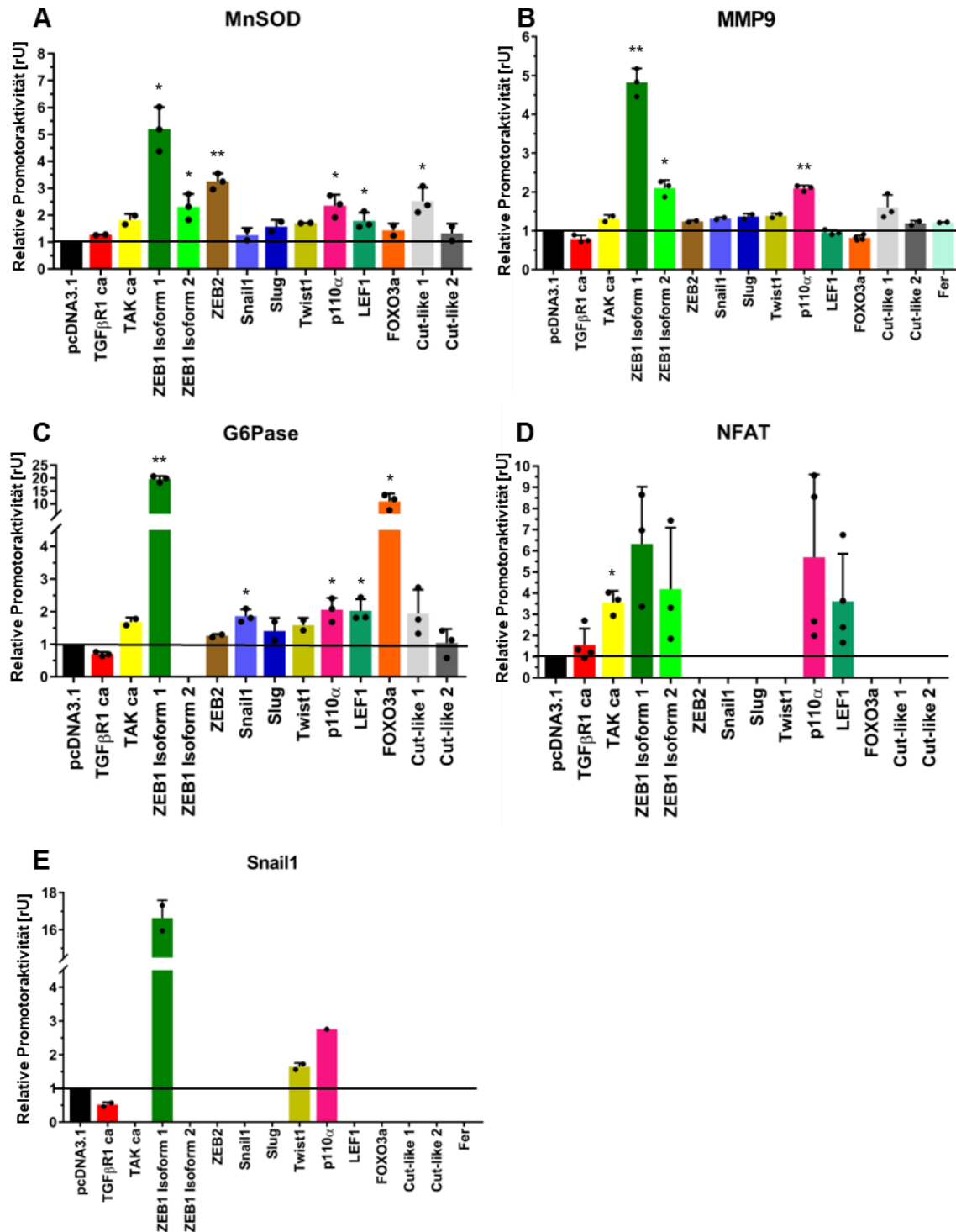


Abb. 20 Regulation der relativen Promotoraktivität von MnSOD, MMP9 und G6Pase sowie eines Fragmentes eines IL-2-Promotors (NFAT)

8. Anhang

H1299-Zellen wurden zeitgleich mit einem Firefly-Promotorkonstrukt, einem Expressionsplasmid oder pcDNA3.1 und dem Renilla-Reporterkonstrukt pRL-TK cotransfiziert. Die Inkubation erfolgte über 24 h. Die Luziferase-Transfektion erfolgte jeweils in Doppelwerten. Die dargestellten relativen Promotoraktivitäten entsprechen dem auf pcDNA3.1 normierten Verhältnis von Firefly-Luziferase-Aktivität zur Renilla-Luziferase-Aktivität. Abgebildet sind die MW + SD von i.d.R. drei unabhängigen Experimenten mit Darstellung der Einzelwerte. Die statistische Signifikanz wurde mittels *one sample* t-Test bestimmt und wird wie folgt abgebildet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$. Abkürzung: *relative Units* [rU].

Trotz einzelner Übereinstimmungen zeigen die vier genannten Reporter deutliche Unterschiede in ihrem Aktivitätsprofil.

ZEB1 Isoform 1 steigert die relative Promotoraktivität des MnSOD- ($5,20 \pm 0,82$), des G6Pase- ($19,61 \pm 1,20$), des NFAT- ($6,33 \pm 2,70$) und des MMP9-Reporters ($4,82 \pm 0,36$). ZEB1 Isoform 2 erhöht die Promotoraktivität der drei gemessenen Reporter für NFAT- ($4,20 \pm 2,9$), MnSOD- ($2,31 \pm 0,48$) und MMP9-Promotoren ($2,10 \pm 0,21$) in jeweils zwei von drei Versuchen.

P110 α steigert die relative Promotoraktivität des MnSOD- ($2,36 \pm 0,41$) und des MMP9-Reporters ($2,10 \pm 0,08$). Darüber hinaus erhöht p110 α die relative Promotoraktivität des Reporters G6Pase in zwei von drei Versuchen ($2,06 \pm 0,36$) sowie, unter starker Streuung der Einzelwerte, des Reporters für NFAT in allen vier Versuchsansätzen ($5,70 \pm 3,91$).

LEF1 aktiviert den NFAT-Reporter ($3,611 \pm 2,25$) in drei von vier Experimenten stark, zeigt bezüglich des MnSOD- ($1,79 \pm 0,31$) und des G6Pase-Reporters ($2,02 \pm 0,36$) allerdings keinen Einfluss auf die Reporteraktivität.

TAK ca wirkt aktivierend auf die relative Aktivität des NFAT-Reporters ($3,55 \pm 0,56$).

ZEB2 steigert wie auch Cut-like 1 nur die MnSOD-Reporteraktivität ($3,26 \pm 0,29$; $2,52 \pm 0,50$).

Als Positivkontrolle wirkt FOXO3a aktivierend auf den G6Pase-Reporter ($10,92 \pm 3,06$), während TGF β R1 ca tendenziell die Luziferaseaktivität des G6Pase-Reporters ($0,70 \pm 0,06$) reprimiert.

Snail1, Slug, Twist1 und Cut-like 2 beeinflussen im Vergleich zu pcDNA3.1 weder die relative Promotoraktivität des MnSOD- ($1,26 \pm 0,27$; $1,58 \pm 0,25$; $1,71 \pm 0,01$; $1,32 \pm 0,37$), noch des G6Pase- ($1,86 \pm 0,21$; $1,41 \pm 0,40$; $1,58 \pm 0,23$; $1,04 \pm 0,43$), noch des MMP9-Reporters ($1,32 \pm 0,03$; $1,37 \pm 0,08$; $1,39 \pm 0,07$; $1,19 \pm 0,07$).

In den H1299-Zellen war das Promotorfragment von Snail1 kaum aktiv. Aus diesem Grund ist die Aussagekraft des Snail1-Reporters entsprechend eingeschränkt. ZEB1 Isoform 1 und p110 α erhöhten in Pilotexperimenten die Aktivität des Snail1-Reporters, während TGF β R1 ca diese etwa halbierte.

8.2 Einfluss der KRAS-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Regulation der relativen Promotoraktivität der MnSOD-, MMP9- und NFAT-Reporter

Die experimentell bestimmten relativen Promotoraktivitäten der oben genannten Reporter sind in Abb. 21 zusammengefasst dargestellt.

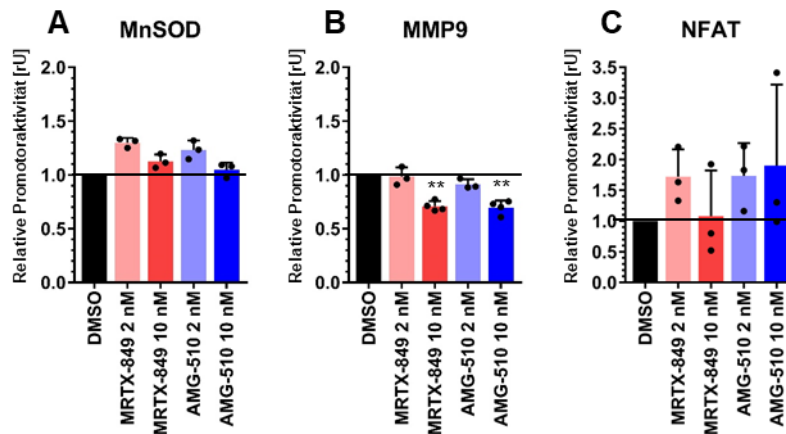


Abb. 21 Regulation der relativen Promotoraktivität von MnSOD und MMP9 sowie eines Fragmentes eines IL-2-Promotors (NFAT) durch K-Ras-Inhibition.

H358-Zellen wurden zeitgleich mit einem *Firefly*-Promotorkonstrukt, einem Expressionsplasmid oder pcDNA3.1 und dem *Renilla*-Reporterkonstrukt pRL-TK cotransfiziert. Die Inkubation erfolgte über 24 h. Die Luziferase-Transfektion erfolgte jeweils in Doppelwerten. Die dargestellten relativen Promotoraktivitäten entsprechen dem auf pcDNA3.1 normierten Verhältnis von *Firefly*-Luziferase-Aktivität zur *Renilla*-Luziferase-Aktivität. Abgebildet sind MW + SD von mind. drei unabhängigen Experimenten mit Darstellung der Einzelwerte. Die statistische Signifikanz wurde mittels *one sample* t-Test bestimmt und wird wie folgt abgebildet: $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$. Abkürzung: rU: *relative Units*.

Die Behandlung mit den KRAS-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 hat verglichen mit der DMSO-Kontrolle keinen Einfluss auf die relative Aktivität des MnSOD-Reporters (mittlere relative Promotoraktivitäten zwischen 1,05 und 1,30).

Die niedrige Konzentration von 2 nM der Inhibitoren MRTX-849 ($0,98 \pm 0,09$) und AMG-510 ($0,91 \pm 0,05$) beeinflusst die relative Aktivität des MMP9-Konstruktes nicht. Die Ergebnisse der Behandlung des MMP9-Reporters mit einer Inhibitor-Konzentration von 10 nM sind heterogen. In jeweils zwei von vier Versuchsansätzen reprimiert MRTX-849 10 nM ($0,71 \pm 0,05$) wie auch AMG-510 10 nM ($0,70 \pm 0,06$) die Promotoraktivität des Genreporters für MMP9. Eine weitere Steigerung der Konzentration auf AMG-510 25 nM (mittlere relative Promotoraktivität 0,61) hat die Aktivität ebenfalls reprimiert. Die Behandlung mit MRTX-849 25 nM (mittlere relative Promotoraktivität 0,85) hingegen hat vergleichsweise keinen Einfluss auf die relative Promotoraktivität des MMP9-Reporters. Die Ergebnisse der letzten beiden Einzelwerte sind nicht abgebildet.

Die relative Aktivität des NFAT-Reporters erhöht sich unter Behandlung mit MRTX-849 2 nM ($1,72 \pm 0,44$) und AMG-510 2 nM ($1,73 \pm 0,53$) in jeweils zwei von drei Versuchen. Eine Behandlung mit der höheren Konzentration MRTX-849 10 nM ($1,08 \pm 0,74$) und AMG-510 10 nM ($1,90 \pm 1,32$) steigert je in einem von drei Versuchen die Aktivität des

8. Anhang

NFAT-Reporters deutlich, wobei die Behandlung mit MRTX-849 10 nM zusätzlich einmalig die relative Reporteraktivität von NFAT deutlich reprimiert. Insgesamt streuen die gemessenen Einzelwerte stark, woraus jeweils hohe Standardabweichungen resultieren.

8.3 Einfluss der KRAS-Inhibitoren MRTX-849 und AMG-510 auf die Regulation der Reporteraktivität von Ets-AP1, Ets, TOPflash, p21Cip1 und Claudin 1 in H23-Zellen

Tabelle 15: Einfluss der verwendeten KRAS-Inhibitoren auf die Regulation der Reporteraktivität von Ets-AP1, Ets, TOPflash, p21Cip1 und Claudin 1 in H23-Zellen

H23-Zellen				
Reporter	Reporteraktivität MW \pm SD, n=2			
	MRTX-849 2 nM	MRTX-849 10 nM	AMG-510 2 nM	AMG-510 10 nM
Ets-AP1	0,98 \pm 0,03	0,95 \pm 0,02	1,05 \pm 0,14	0,99 \pm 0,26
Ets	0,60 \pm 0,00	1,06 \pm 0,14	0,59 \pm 0,11	1,03 \pm 0,00
TOPflash	0,58 \pm 0,18	0,79 \pm 0,48	0,70 \pm 0,00	0,75 \pm 0,49
p21Cip1	0,81 \pm 0,37	1,15 \pm 0,16	0,69 \pm 0,28	0,79 \pm 0,31
Claudin 1	0,67 \pm 0,18	1,31 \pm 0,37	0,62 \pm 0,12	1,24 \pm 0,34

8.4 Beispielhafte Darstellung von Primärdaten der Luziferase Assays

Die Luziferase Assays wurden wie in den Kapitel 3.1.3 bis 3.1.5 und 3.2.7 beschrieben durchgeführt. Die Detektion der Biolumineszenz erfolgte mittels Luminometer Centro XS3 LB 960. Zur Darstellung der Primärergebnisse (siehe Abb. 22) wurde die Software MikroWin 2000 Version 4.41 verwendet. Anschließend wurden die Daten tabellarisch ausgewertet (siehe Abb. 23).

8. Anhang

Messdaten Datei : LH_2021_03_19.dat		Gültige Auswertung						Datum der Messung : 19.03.2021				
Parameter Datei : Dual-Luziferase Reporter Assay.par								Zeit der Messung : 17:32:39				
----- Sample / Firefly / Renilla / Ratio -----												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
	19	24	3652	3667	6238	5641	5350	3808	2668	2745	5913	5695
	24	19	30931	28635	17883	15689	19475	14792	16359	17553	22416	21178
	0,792	1,263	0,118	0,128	0,349	0,360	0,275	0,257	0,163	0,156	0,264	0,269
B	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12
	3749	2862	27513	28125	13224	10066	8581	10721	15233	15529	8664	6776
	24387	22305	34466	43767	26329	19213	14442	16912	30494	26557	18485	16398
	0,154	0,128	0,798	0,643	0,502	0,524	0,594	0,634	0,500	0,585	0,469	0,413
C	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12
	29	24	24834	24358	13433	16767	9464	7975	13642	13477	10658	16301
	24	29	34097	31640	23960	21984	15689	15490	21237	27630	19480	26348
	1,208	0,828	0,728	0,770	0,561	0,763	0,603	0,515	0,642	0,488	0,547	0,619
D	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10		
	6805	5981	6495	5695	3977	3148	7378	6369	3939	3764		
	58996	52007	31436	28460	30625	27800	35083	35865	34908	33578		
	0,115	0,115	0,207	0,200	0,130	0,113	0,210	0,178	0,113	0,112		
E	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
	15	15	30684	33320	17888	17538	10032	8183	16990	20169	8591	9134
	39	39	99177	110058	64469	65514	33116	25523	78240	91083	39532	41747
	0,385	0,385	0,309	0,303	0,277	0,268	0,303	0,321	0,217	0,221	0,217	0,219
F	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10		
	58378	34112	21295	25499	11419	12628	31014	26921	12482	12705		
	75356	47348	34588	41295	24567	23673	49903	45609	27038	25785		
	0,775	0,720	0,616	0,617	0,465	0,533	0,621	0,590	0,462	0,493		
G	G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
	19	34	30616	30383	23445	19470	11676	14976	20975	16058	15097	12375
	34	34	117850	127247	88806	75263	37269	41703	96432	91322	53426	47494
	0,559	1,000	0,260	0,239	0,264	0,259	0,313	0,359	0,218	0,176	0,283	0,261
H												

Allgemeine Daten	
Messung	Multi Label Kinetik, Zeitpunkt der Messung : 19.03.2021 / 17:32:39, Status der Messung : Gültige Messung
Parameter	1 Messungen durchgeführt, 0.001 durchschnittliche Intervallzeit, Messung Nr.1 ausgewählt, Label Nr.2 ausgewählt
Dateien	Zum Messzeitpunkt geladene Parameterdatei : c:\programme\mikrowin 2000\para\dual-luziferase reporter assay.par Datendatei : LH_2021_03_19 - 19.03.2021 / 17:46:04 - Erstellt mit Version 4.41 Parameterdatei : Dual-Luziferase Reporter Assay - 14.03.2011 / 18:00:28 - Erstellt mit Version 4.41
Reader	BertholdTech CENTRO, Driver Version: 1.13 , (1.0.13.0), S/N: 50-6609, Embedded Version: 2.04 Plate Type: Berthold 96 Injector 2 Measurement Mode by Well Volume 40 Speed low Name Shake Duration [s] 2.0 Measurement Mode by Well Name Luzi Counting Time [s] 2.00 Measurement Mode by Well Injector 3 Measurement Mode by Well Volume 40 Speed low Name Shake Duration [s] 2.0 Measurement Mode by Well Name Renilla Counting Time [s] 2.00 Measurement Mode by Well
Berechnung	Berechnungsstatus : Gültige Auswertung, Berechnungszeitpunkt : 19.03.2021 / 17:46:04
Programm	MikroWin, Version 4.41; Lizenz Nr. : 14149; Assembly Code : 0066 0001 BFFB FTBF Operating System : Windows XP Professional; User Name : Labor; Printer Name : Microsoft Office Document Image

----- Grenzwert - Statistik -----		
Gruppe	Test	Grenzwert, Set 1
Gr. 1	Default	+oo > Overload >= 2,1475E9 > #Value >= 0,0000 > _ > -oo

----- Kinetik Statistik -----	
Kinetik Zeiteinstellung:	Gesamtmesszeit = 00:00:00, Intervallzeit = 00:00:00
Berechnungspunkte:	Kinetik Minimum = 1, Kinetik Maximum = 1, Maximale Steigung = 2
Onsettime:	Berechnungsformel = RMIN(MEA) + 0.5
Auswertebereich:	Start bei 0.000 - Messung Nr.1, Stopp bei 0.000 - Messung Nr.1

Abb. 22 Beispielhafte Darstellung von Primärergebnissen eines Luziferase Assays mit MikroWin 2000 Version 4.41

8. Anhang

H358 mit Lipofektamin 3001 transfiziert am 16.03.2021			LH	I.						
Well Nummer	Bezeichnung	Behandlung	Luziferase	Renilla	norm. Luziferase	norm. Renilla	Ratio(Luzi/Renilla)	Mittelwert Ratio	Normalisierung	Standartabweichung
1	pEGFP	Transfektionskontrolle	19	24	21,5	21,5				
2	pEGFP	Transfektionskontrolle	24	19						
3	pGL2/p21	DMSO	3652	30931	3630,5	30909,5	0,117	0,122	1,000	0,007
4	pGL2/p21	DMSO	3667	28635	3645,5	28613,5	0,127			
5	pGL2/p21	TGFβ1 10ng/ml	6238	17883	6216,5	17861,5	0,348	0,353	2,886	0,008
6	pGL2/p21	TGFβ1 10ng/ml	5641	15689	5619,5	15667,5	0,359			
7	pGL2/p21	TGFβ1 10ng/ml+MRTX 2nM	5350	19475	5328,5	19453,5	0,274	0,265	2,166	0,012
8	pGL2/p21	TGFβ1 10ng/ml+MRTX 2nM	3808	14792	3786,5	14770,5	0,256			
9	pGL2/p21	TGFβ1 10ng/ml+MRTX 10nM	2668	16359	2646,5	16337,5	0,162	0,159	1,296	0,005
10	pGL2/p21	TGFβ1 10ng/ml+MRTX 10nM	2745	17553	2723,5	17531,5	0,155			
11	pGL2/p21	TGFβ1 10ng/ml+AMG 2nM	5913	22416	5891,5	22394,5	0,263	0,266	2,170	0,004
12	pGL2/p21	TGFβ1 10ng/ml+AMG 2nM	5695	21178	5673,5	21156,5	0,268			
13	pGL2/p21	TGFβ1 10ng/ml+AMG 10nM	3749	24387	3727,5	24365,5	0,153	0,140	1,145	0,018
14	pGL2/p21	TGFβ1 10ng/ml+AMG 10nM	2862	22305	2840,5	22283,5	0,127			
15	pGL2/MMP9	DMSO	27513	34466	27491,5	34444,5	0,798	0,720	1,000	0,110
16	pGL2/MMP9	DMSO	28125	43767	28103,5	43745,5	0,642			
17	pGL2/MMP9	MRTX 10nM	13224	26329	13202,5	26307,5	0,502	0,513	0,712	0,015
18	pGL2/MMP9	MRTX 10nM	10066	19213	10044,5	19191,5	0,523			
19	pGL2/MMP9	MRTX 25nM	8581	14442	8559,5	14420,5	0,594	0,614	0,852	0,028
20	pGL2/MMP9	MRTX 25nM	10721	16912	10699,5	16890,5	0,633			
21	pGL2/MMP9	AMG 10nM	15233	30494	15211,5	30472,5	0,499	0,542	0,752	0,060
22	pGL2/MMP9	AMG 10nM	15529	26557	15507,5	26535,5	0,584			
23	pGL2/MMP9	AMG 25nM	8664	18485	8642,5	18463,5	0,468	0,440	0,611	0,039
24	pGL2/MMP9	AMG 25nM	6776	16398	6754,5	16376,5	0,412			

Abb. 23 Beispielhafte tabellarische Auswertung von Primärdaten eines Luziferase Assays

9. Literaturverzeichnis

1. **Otremba, H.** *Rudolf Virchow. Begründer der Zellulärpathologie. Eine Dokumentation.* Würzburg : Echter-Verlag, 1991. S. 5.
2. **Vogelstein, B., & Kinzler, K. W.** The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics* (9). 1993, S. 138-141.
3. **Hanahan, D. & Weinberg, R. A.** The hallmarks of cancer. *Cell* 100. 2000, S. 57-70.
4. **Ferlay, J. Ervik, M. Lam, F. Laversanne, M. Colombet, M. Mery, L. Piñeros, M. Znaor, A. Soerjomataram, I. & Bray, F.** Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer. [Online] 2020. [Zitat vom: 26. 03 2023.] <https://gco.iarc.fr/today>.
5. **Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., Chirieac, L. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., & Powell, C. A.** The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *Journal of thoracic oncology* (10,9). 2015, S. 1243-1260.
6. **Socinski, M. A., Obasaju, C., Gandara, D., Hirsch, F. R., Bonomi, P., Bunn, P., Kim, E. S., Langer, C. J., Natale, R. B., Novello, S., Paz-Ares, L., Pérol, M., Reck, M., Ramalingam, S. S., Reynolds, C. H., Spigel, D. R., & Stinchcombe, T. E.** Clinicopathologic Features of Advanced Squamous NSCLC. *Journal of thoracic oncology* (11,9). 2016, S. 1411-22.
7. **Kadara, H., Kabbout, M., & Wistuba, I. I.** Pulmonary adenocarcinoma: a renewed entity in 2011. *Respirology* (17,1). 2012, S. 50-65.
8. **Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., & Adjei, A. A.** Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic proceedings* (83,5). 2008, S. 584-94.
9. **Riely, G. J., Kris, M. G., Rosenbaum, D., Marks, J., Li, A., Chitale, D. A., Nafa, K., Riedel, E. R., Hsu, M., Pao, W., Miller, V. A., & Ladanyi, M.** Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clinical cancer research* (14,18). 2008, S. 5731-4.
10. **Judd, J., Abdel Karim, N., Khan, H., Naqash, A. R., Baca, Y., Xiu, J., VanderWalde, A. M., Mamdani, H., Raez, L. E., Nagasaka, M., Pai, S. G., Socinski, M. A., Nieva, J. J., Kim, C., Wozniak, A. J., Ikpeazu, C., de Lima Lopes, G., Jr, & Spira, A. I.** Characterization of KRAS Mutation Subtypes in Non-small Cell Lung Cancer. *Molecular cancer therapeutics* (20,12). 2021, S. 2577-2584.

9. Literaturverzeichnis

11. **Ostrem, J. M., Peters, U., Sos, M. L., Wells, J. A., & Shokat, K. M.** K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* (503,7477). 2013, S. 548-51.
12. **Kosaka, T., Yatabe, Y., Endoh, H., Kuwano, H., Takahashi, T., & Mitsudomi, T.** Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer research* (64,24). 2004, S. 8919-23.
13. **Leiter, A., Veluswamy, R. R., & Wisnivesky, J. P.** The global burden of lung cancer: current status and future trends. *Nature reviews. Clinical oncology* (20,9). 2023, S. 624-39.
14. **Liu, P., Morrison, C., Wang, L., Xiong, D., Vedell, P., Cui, P., Hua, X., Ding, F., Lu, Y., James, M., Ebben, J. D., Xu, H., Adjei, A. A., Head, K., Andrae, J. W., Tschannen, M. R., Jacob, H., Pan, J., Zhang, Q., & Van den Bergh, F.** Identification of somatic mutations in non-small cell lung carcinomas using whole-exome sequencing. *Carcinogenesis* (33,7). 2012, S. 1270-6.
15. **Wood, S. L., Pernemalm, M., Crosbie, P. A., & Whetton, A. D.** Molecular histology of lung cancer: from targets to treatments. *Cancer treatment reviews* (41,4). 2015, S. 361-75.
16. **Padinharayil, H., Varghese, J., John, M. C., Rajanikant, G. K., Wilson, C. M., Al-Yozbaki, M., Renu, K., Dewanjee, S., Sanyal, R., Dey, A., Mukherjee, A. G., Wanjari, U. R., Gopalakrishnan, A. V., & George, A.** Non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Implications on molecular pathology and advances in early diagnostics and therapeutics. *Genes & diseases* (10,3). 2022, S. 960-89.
17. **Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe.** Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. [Online] 2.1, 2022. [Zitat vom: 11. 03 2023.] <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/lungenkarzinom/>.
18. **Travis, W. D.** Pathology of Lung Cancer. *Clinics in Chest Medicine* (32,4). 2011, S. 669-692.
19. **Skoulidis, F., Li, B. T., Dy, G. K., Price, T. J., Falchook, G. S., Wolf, J., Italiano, A., Schuler, M., Borghaei, H., Barlesi, F., Kato, T., Curioni-Fontecedro, A., Sacher, A., Spira, A., Ramalingam, S. S., Takahashi, T., Besse, B., & Anderson, A.** Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *The New England journal of medicine* (384,25). 2021, S. 2371-2381.
20. **Canon, J., Rex, K., Saiki, A. Y., Mohr, C., Cooke, K., Bagal, D., Gaida, K., Holt, T., Knutson, C. G., Koppada, N., Lanman, B. A., Werner, J., Rapaport, A. S., San Miguel, T., Ortiz, R., Osgood, T., Sun, J. R., Zhu, X., McCarter, J. D., Volak,**

9. Literaturverzeichnis

- L. P., Li.** The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature* (575,7781). 2019, S. 217-223.
21. **Cox, A. D., Fesik, S. W., Kimmelman, A. C., Luo, J., & Der, C. J.** Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nature reviews* (13,11). 2014, S. 828-51.
22. **Jänne, P. A., Riely, G. J., Gadgeel, S. M., Heist, R. S., Ou, S. I., Pacheco, J. M., Johnson, M. L., Sabari, J. K., Leventakos, K., Yau, E., Bazhenova, L., Negrao, M. V., Pennell, N. A., Zhang, J., Anderes, K., Der-Torossian, H., & Kheoh, T.** Adagrasib in Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring a KRASG12C Mutation. *The New England journal of medicine* (387,2). 2022, S. 120-31.
23. **Hall, R. D., Gray, J. E., & Chiappori, A. A.** Beyond the standard of care: a review of novel immunotherapy trials for the treatment of lung cancer. *Cancer control* (20,1). 2013, S. 22-31.
24. **Gerstberger, S., Jiang, Q., & Ganesh, K.** Metastasis. *Cell* (186,8). 2023, S. 1564-79.
25. **Gupta, G. P., & Massagué, J.** Cancer metastasis: building a framework. *Cell* (127,4). 2006, S. 679-95.
26. **Li, D., Xia, L., Huang, P., Wang, Z., Guo, Q., Huang, C., Leng, W., & Qin, S.** Heterogeneity and plasticity of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cancer metastasis: Focusing on partial EMT and regulatory mechanisms. *Cell proliferation* (56,6). 2023, S. e13423.
27. **Thiery, J. P.** Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews. Cancer* (2,6). 2002, S. 442-54.
28. **McFaline-Figueroa, J. L., Hill, A. J., Qiu, X., Jackson, D., Shendure, J., & Trapnell, C.** A pooled single-cell genetic screen identifies regulatory checkpoints in the continuum of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature genetics* (51,9). 2019, S. 1389-98.
29. **Kröger, C., Afeyan, A., Mraz, J., Eaton, E. N., Reinhardt, F., Khodor, Y. L., Thiru, P., Bierie, B., Ye, X., Burge, C. B., & Weinberg, R. A.** Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (116,15). 2019, S. 7353-62.
30. **Fustaino, V., Presutti, D., Colombo, T., Cardinali, B., Papoff, G., Brandi, R., Bertolazzi, P., Felici, G., & Ruberti, G.** Characterization of epithelial-mesenchymal transition intermediate/hybrid phenotypes associated to resistance to EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer cell lines. *Oncotarget* (8,61). 2017, S. 103340-63.

9. Literaturverzeichnis

31. **Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., Van Keymeulen, A., Brown, D., Moers, V., Lemaire, S., De Clercq, S., Minguijón, E., Balsat, C., Sokolow, Y., Dubois, C., De Cock, F., Scozzaro, S., & Sopena, F.** Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* (556,7702). 2018, S. 463-8.
32. **Tam, W. L. & Weinberg, R. A.** The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature medicine* (19,11). 2013, S. 1438-49.
33. **Hartsock, A., & Nelson, W. J.** Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta* (1778,3). 2008, S. 660-9.
34. **Campàs, O., Noordstra, I., & Yap, A. S.** Adherens junctions as molecular regulators of emergent tissue mechanics. *Nature reviews. Molecular cell biology* (25,4). 2024, S. 252-69.
35. **Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I., & Nelson, W. J.** Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* (123,5). 2005, S. 889-901.
36. **Huang, R. Y., Guilford, P., & Thiery, J. P.** Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal of cell science* (125,19). 2012, S. 4417-22.
37. **Schoenenberger, C. A. & Matlin, K. S.** Cell polarity and epithelial oncogenesis. *Trends in cell biology* (1,4). 1991, S. 87-92.
38. **Hazan, R. B., Qiao, R., Keren, R., Badano, I., & Suyama, K.** Cadherin switch in tumor progression. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1014). 2004, S. 155-63.
39. **Luo, Y., Yu, T., Zhang, Q., Fu, Q., Hu, Y., Xiang, M., Peng, H., Zheng, T., Lu, L., & Shi, H.** Upregulated N-cadherin expression is associated with poor prognosis in epithelial-derived solid tumours: A meta-analysis. *European journal of clinical investigation* (48,4). 2018, S. e12903.
40. **Lechuga, S., Amin, P. H., Wolen, A. R., & Ivanov, A. I.** Adducins inhibit lung cancer cell migration through mechanisms involving regulation of cell-matrix adhesion and cadherin-11 expression. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* (1866,3). 2019, S. 395-408.
41. **Brown, Michael C, and Christopher E Turner.** Paxillin: adapting to change. *Physiological reviews* (84,4). 2004, S. 1315-39.
42. **Nayal, A., Webb, D. J., Brown, C. M., Schaefer, E. M., Vicente-Manzanares, M., & Horwitz, A. R.** Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics. *The Journal of cell biology* (173,4). 2006, S. 587-9.

9. Literaturverzeichnis

43. **Wang, Y., Ding, X., Liu, B., Li, M., Chang, Y., Shen, H., Xie, S. M., Xing, L., & Li, Y.** ETV4 overexpression promotes progression of non-small cell lung cancer by upregulating PXN and MMP1 transcriptionally. *Molecular carcinogenesis* (59,1). 2020, S. 73-86.
44. **Thompson, E. W., Newgreen, D. F., & Tarin, D.** Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer research* (65,14). 2005, S. 5991-5.
45. **Toivola, D. M., Tao, G. Z., Habtezion, A., Liao, J., & Omary, M. B.** Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends in cell biology* (15,11). 2005, S. 608-17.
46. **Chalut, Kevin J, and Ewa K Paluch.** The Actin Cortex: A Bridge between Cell Shape and Function. *Developmental cell* (38,6). 2016, S. 571-3.
47. **Peixoto, P., Etcheverry, A., Aubry, M., Missey, A., Lachat, C., Perrard, J., Hendrick, E., Delage-Mourroux, R., Mosser, J., Borg, C., Feugeas, J. P., Herfs, M., Boyer-Guittaut, M., & Hervouet, E.** EMT is associated with an epigenetic signature of ECM remodeling genes. *Cell death & disease* (10,3). 2019, S. 205.
48. **Lin, C. Y., Tsai, P. H., Kandaswami, C. C., Lee, P. P., Huang, C. J., Hwang, J. J., & Lee, M. T.** Matrix metalloproteinase-9 cooperates with transcription factor Snail to induce epithelial-mesenchymal transition. *Cancer science* (102,4). 2011, S. 815-27.
49. **Gong, L., Wu, D., Zou, J., Chen, J., Chen, L., Chen, Y., Ni, C., & Yuan, H.** Prognostic impact of serum and tissue MMP-9 in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* (7,14). 2016, S. 18458-68.
50. **Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R.** Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology* (15,3). 2014, S. 178-96.
51. **Katsuno, Y., & Derynck, R.** Epithelial plasticity, epithelial-mesenchymal transition, and the TGF- β family. *Developmental cell* (56,6). 2021, S. 726-746.
52. **Gemmill, R. M., Roche, J., Potiron, V. A., Nasarre, P., Mitas, M., Coldren, C. D., Helfrich, B. A., Garrett-Mayer, E., Bunn, P. A., & Drabkin, H. A.** ZEB1-responsive genes in non-small cell lung cancer. *Cancer letters* (300,1). 2011, S. 66-78.
53. **Ramundo, V., Palazzo, M. L., & Aldieri, E.** TGF- β as Predictive Marker and Pharmacological Target in Lung Cancer Approach. *Cancers* (15,8). 2023, S. 2295.
54. **Li, J., Shen, C., Wang, X., Lai, Y., Zhou, K., Li, P., Liu, L., & Che, G.** Prognostic value of TGF- β in lung cancer: systematic review and meta-analysis. *BMC cancer* (19,1). 2019, S. 1-9.
55. **Saito, R. A., Watabe, T., Horiguchi, K., Kohyama, T., Saitoh, M., Nagase, T., & Miyazono, K.** Thyroid transcription factor-1 inhibits transforming growth factor-beta-

9. Literaturverzeichnis

- mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Cancer research* (69,7). 2009, S. 2783-91.
56. **Yu, Y., Xiao, C. H., Tan, L. D., Wang, Q. S., Li, X. Q., & Feng, Y. M.** Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. *British journal of cancer* (110,3). 2014, S. 724-32.
57. **Hao, Y., Baker, D., & Ten Dijke, P.** TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *International journal of molecular sciences* (20,11). 2019, S. 1-34.
58. **Fuxe, J., Vincent, T., & Garcia de Herreros, A.** Transcriptional crosstalk between TGF- β and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell cycle* (9,12). 2010, S. 2363-74.
59. **Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I., & Massagué, J.** A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes & development* (13,7). 1999, S. 804-16.
60. **Schwarz, L. C., Wright, J. A., Gingras, M. C., Kondaiah, P., Danielpour, D., Pimentel, M., Sporn, M. B., & Greenberg, A. H.** Aberrant TGF-beta production and regulation in metastatic malignancy. *Growth factors* (3,2). 1990, S. 115-27.
61. **Khan, P., Manna, A., Saha, S., Mohanty, S., Mukherjee, S., Mazumdar, M., Guha, D., & Das, T.** Aspirin inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and migration of oncogenic K-ras-expressing non-small cell lung carcinoma cells by down-regulating E-cadherin repressor Slug. *BMC cancer* (16 39). 2016, S. 1-18.
62. **Tzavlaki, K. & Moustakas, A.** TGF- β Signaling. *Biomolecules* (10,3). 2020, S. 1-38.
63. **Hartsough, M. T. & Mulder, K. M.** Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* (270,13). 1995, S. 7117-24.
64. **Yi, J. Y., Shin, I., & Arteaga, C. L.** Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* (280,11). 2005, S. 10870-6.
65. **Engel, M. E., McDonnell, M. A., Law, B. K., & Moses, H. L.** Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *The Journal of biological chemistry* (274,52). 1999, S. 37413-20.
66. **Yu, L., Hébert, M. C., & Zhang, Y. E.** TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *The EMBO journal* (21,14). 2002, S. 3749-59.
67. **Hamidi, A., von Bulow, V., Hamidi, R., Winssinger, N., Barluenga, S., Heldin, C. H., & Landström, M.** Polyubiquitination of transforming growth factor β (TGF β)-

9. Literaturverzeichnis

- associated kinase 1 mediates nuclear factor- κ B activation in response to different inflammatory stimuli. *The Journal of biological chemistry* (287,1). 2012, S. 123-33.
68. **Inokuchi, S., Aoyama, T., Miura, K., Osterreicher, C. H., Kodama, Y., Miyai, K., Akira, S., Brenner, D. A., & Seki, E.** Disruption of TAK1 in hepatocytes causes hepatic injury, inflammation, fibrosis, and carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (107,2). 2010, S. 844-9.
69. **Lawrence, M. S., Stojanov, P., Mermel, C. H., Robinson, J. T., Garraway, L. A., Golub, T. R., Meyerson, M., Gabriel, S. B., Lander, E. S., & Getz, G.** Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* (505,7484). 2014, S. 495-501.
70. **Glaviano, A., Foo, A. S. C., Lam, H. Y., Yap, K. C. H., Jacot, W., Jones, R. H., Eng, H., Nair, M. G., Makvandi, P., Georger, B., Kulke, M. H., Baird, R. D., Prabhu, J. S., Carbone, D., Pecoraro, C., Teh, D. B. L., Sethi, G., Cavalieri, V. & Lin, K. H.** PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Molecular cancer* (22,1). 2023, S. 1-37.
71. **Scheffler, M., Bos, M., Gardizi, M., König, K., Michels, S., Fassunke, J., Heydt, C., Künstlinger, H., Ihle, M., Ueckerth, F., Albus, K., Serke, M., Gerigk, U., Schulte, W., Töpelt, K., Nogova, L., Zander, T., Engel-Riedel, W., Stoelben, E., & Ko, Y. D.** PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies. *Oncotarget* (6,2). 2015, S. 1315-26.
72. **Yamamoto, H., Shigematsu, H., Nomura, M., Lockwood, W. W., Sato, M., Okumura, N., Soh, J., Suzuki, M., Wistuba, I. I., Fong, K. M., Lee, H., Toyooka, S., Date, H., Lam, W. L., Minna, J. D., & Gazdar, A. F.** PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. *Cancer research* (68,17). 2008, S. 6913-21.
73. **Myers, M. P., Pass, I., Batty, I. H., Van der Kaay, J., Stolarov, J. P., Hemmings, B. A., Wigler, M. H., Downes, C. P., & Tonks, N. K.** The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (95,23). 1998, S. 13513-8.
74. **Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., & Johnson, K. R.** Cadherin switching. *Journal of cell science* (121,6). 2008, S. 727-35.
75. **Saitoh, M.** Transcriptional regulation of EMT transcription factors in cancer. *Seminars in cancer biology* (97). 2023, S. 21-9.
76. **Nieto, M. A.** The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature reviews. Molecular cell biology* (3,3). 2002, S. 155-66.

9. Literaturverzeichnis

77. **Kumar, B., Uppuladinne, M. V., Jani, V., Sonavane, U., Joshi, R. R., & Bapat, S. A.** Auto-regulation of Slug mediates its activity during epithelial to mesenchymal transition. *Biochimica et biophysica acta (1849,9)*. 2015, S. 1209-18.
78. **Behrens, J., Löwrick, O., Klein-Hitpass, L., & Birchmeier, W.** The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (88,24)*. 1991, S. 11495-9.
79. **Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A.** Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature reviews. Cancer (7,6)*. 2007, S. 415-28.
80. **Stemmler, M. P., Eccles, R. L., Brabletz, S., & Brabletz, T.** Non-redundant functions of EMT transcription factors. *Nature cell biology (21,1)*. 2019, S. 102-12.
81. **Zhou, Y., Liao, Q., Han, Y., Chen, J., Liu, Z., Ling, H., Zhang, J., Yang, W., Oyang, L., Xia, L., Wang, L., Wang, H., Xue, L., Wang, H., & Hu, B.** Rac1 overexpression is correlated with epithelial mesenchymal transition and predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Journal of Cancer (7,14)*. 2016, S. 2100-9.
82. **Yin, Z., Xu, X. L., & Frasch, M.** Regulation of the twist target gene tinman by modular cis-regulatory elements during early mesoderm development. *Development (124,24)*. 1997, S. 4971-82.
83. **Casas, E., Kim, J., Bendesky, A., Ohno-Machado, L., Wolfe, C. J., & Yang, J.** Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer research (71,1)*. 2011, S. 245-54.
84. **Pallier, K., Cessot, A., Côté, J. F., Just, P. A., Cazes, A., Fabre, E., Danel, C., Riquet, M., Devouassoux-Shisheboran, M., Ansieau, S., Puisieux, A., Laurent-Puig, P., & Blons, H.** TWIST1 a new determinant of epithelial to mesenchymal transition in EGFR mutated lung adenocarcinoma. *PloS one (7,1)*. 2012, S. e29954.
85. **Tran, P. T., Shroff, E. H., Burns, T. F., Thiyagarajan, S., Das, S. T., Zabuawala, T., Chen, J., Cho, Y. J., Luong, R., Tamayo, P., Salih, T., Aziz, K., Adam, S. J., Vicent, S., Nielsen, C. H., Withofs, N., Sweet-Cordero, A., & Gambhir, S. S.** Twist1 suppresses senescence programs and thereby accelerates and maintains mutant Kras-induced lung tumorigenesis. *PLoS genetics (8,5)*. 2012, S. e1002650.
86. **Genetta, T., Ruezinsky, D., & Kadesch, T.** Displacement of an E-box-binding repressor by basic helix-loop-helix proteins: implications for B-cell specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Molecular and cellular biology (14,9)*. 1994, S. 6153-63.
87. **Verschueren, K., Remacle, J. E., Collart, C., Kraft, H., Baker, B. S., Tylzanowski, P., Nelles, L., Wuytens, G., Su, M. T., Bodmer, R., Smith, J. C., & Huylebroeck,**

9. Literaturverzeichnis

- D.** SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *The Journal of biological chemistry* (274,29). 1999.
88. **Brabletz, Thomas.** To differentiate or not--routes towards metastasis. *Nature reviews. Cancer* (12,6). 2012, S. 425-36.
89. **Li, X., Jin, J., Yang, S., Xu, W., Meng, X., Deng, H., Zhan, J., Gao, S., & Zhang, H.** GATA3 acetylation at K119 by CBP inhibits cell migration and invasion in lung adenocarcinoma. *Biochemical and biophysical research communications* (497,2). 2018, S. 633-8.
90. **Chiu, L. Y., Hsin, I. L., Yang, T. Y., Sung, W. W., Chi, J. Y., Chang, J. T., Ko, J. L., & Sheu, G. T.** The ERK-ZEB1 pathway mediates epithelial-mesenchymal transition in pemetrexed resistant lung cancer cells with suppression by vinca alkaloids. *Oncogene* (36,2). 2017, S. 242-53.
91. **Zhang, T., Guo, L., Creighton, C. J., Lu, Q., Gibbons, D. L., Yi, E. S., Deng, B., Molina, J. R., Sun, Z., Yang, P., & Yang, Y.** A genetic cell context-dependent role for ZEB1 in lung cancer. *Nature communications* (7). 2016, S. 12231.
92. **Ikeda, K. & Kawakami, K.** DNA binding through distinct domains of zinc-finger-homeodomain protein AREB6 has different effects on gene transcription. *European journal of biochemistry* (233,1). 1995, S. 73-82.
93. **Remacle, J. E., Kraft, H., Lerchner, W., Wuytens, G., Collart, C., Verschuere, K., Smith, J. C., & Huylebroeck, D.** New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites. *The EMBO journal* (18,18). 1999, S. 5073-84.
94. **Balestrieri, C., Alfarano, G., Milan, M., Tosi, V., Prosperini, E., Nicoli, P., Palamidessi, A., Scita, G., Diaferia, G. R., & Natoli, G.** Co-optation of Tandem DNA Repeats for the Maintenance of Mesenchymal Identity. *Cell* (173,5). 2018, S. 1150-64.
95. **Villarejo, A., Cortés-Cabrera, A., Molina-Ortíz, P., Portillo, F., & Cano, A.** Differential role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and epithelial to mesenchymal transition. *The Journal of biological chemistry* (289,2). 2014, S. 930-41.
96. **Chang, A. T., Liu, Y., Ayyanathan, K., Benner, C., Jiang, Y., Prokop, J. W., Paz, H., Wang, D., Li, H. R., Fu, X. D., Rauscher, F. J., 3rd, & Yang, J.** An evolutionarily conserved DNA architecture determines target specificity of the TWIST family bHLH transcription factors. *Genes & development* (29,6). 2015, S. 603-16.

9. Literaturverzeichnis

97. **Skrypek, N., Goossens, S., De Smedt, E., Vandamme, N., & Berx, G.** Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends in genetics : TIG* (33,12). 2017, S. 943-59.
98. **Neufeld, E. J., Skalnik, D. G., Lievens, P. M., & Orkin, S. H.** Human CCAAT displacement protein is homologous to the Drosophila homeoprotein, cut. *Nature genetics* (1,1). 1992, S. 50-5.
99. **Quaggin, S. E., Heuvel, G. B., Golden, K., Bodmer, R., & Igarashi, P.** Primary structure, neural-specific expression, and chromosomal localization of Cux-2, a second murine homeobox gene related to Drosophila cut. *The Journal of biological chemistry* (271,37). 1996, S. 22624-34.
100. **Ellis, T., Gambardella, L., Horcher, M., Tschanz, S., Capol, J., Bertram, P., Jochum, W., Barrandon, Y., & Busslinger, M.** The transcriptional repressor CDP (Cutl1) is essential for epithelial cell differentiation of the lung and the hair follicle. *Genes & development* (15,17). 2001, S. 2307-19.
101. **Weyemi, U., Lagente-Chevallier, O., Boufraquech, M., Prenois, F., Courtin, F., Caillou, B., Talbot, M., Dardalhon, M., Al Ghuzlan, A., Bidart, J. M., Schlumberger, M., & Dupuy, C.** ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. *Oncogene* (31,9). 2012, S. 1117-29.
102. **Ramdzan, Z. M., Vickridge, E., Faraco, C. C. F., & Nepveu, A.** CUT Domain Proteins in DNA Repair and Cancer. *Cancers* (13,12). 2021, S. 2953.
103. **An, N., Khan, S., Imgruet, M. K., Jueng, L., Gurbuxani, S., & McNerney, M. E.** Oncogenic RAS promotes leukemic transformation of CUX1-deficient cells. *Oncogene* (42,12). 2023, S. 881-93.
104. **Ramdzan, Z. M., & Nepveu, A.** CUX1, a haploinsufficient tumour suppressor gene overexpressed in advanced cancers. *Nature reviews. Cancer* (14,10). 2014, S. 673-82.
105. **Zhao, H., Ming, T., Tang, S., Ren, S., Yang, H., Liu, M., Tao, Q., & Xu, H.** Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target. *Molecular cancer* (21,1). 2022, S. 1-34.
106. **Zhan, T., Rindtorff, N., & Boutros, M.** Wnt signaling in cancer. *Oncogene* (36,11). 2017, S. 1461-73.
107. **Behrens, J., von Kries, J. P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., & Birchmeier, W.** Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* (382,6592). 1996, S. 638-42.
108. **Bleckmann, A., Siam, L., Klemm, F., Rietkötter, E., Wegner, C., Kramer, F., Beissbarth, T., Binder, C., Stadelmann, C., & Pukrop, T.** Nuclear LEF1/TCF4

9. Literaturverzeichnis

- correlate with poor prognosis but not with nuclear β -catenin in cerebral metastasis of lung adenocarcinomas. *Clinical & experimental metastasis* (30,4). 2013, S. 471-82.
109. Liu, F., Killian, J. K., Yang, M., Walker, R. L., Hong, J. A., Zhang, M., Davis, S., Zhang, Y., Hussain, M., Xi, S., Rao, M., Meltzer, P. A., & Schrupp, D. S. Epigenomic alterations and gene expression profiles in respiratory epithelia exposed to cigarette smoke condensate. *Oncogene* vol. 29,25. 2010, S. 3650-64.
110. Licchesi, J. D., Westra, W. H., Hooker, C. M., Machida, E. O., Baylin, S. B., & Herman, J. G. Epigenetic alteration of Wnt pathway antagonists in progressive glandular neoplasia of the lung. *Carcinogenesis* (29,5). 2008, S. 895-904.
111. Stewart, D. J. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* (106,1). 2014, S. djt356.
112. Moon, B. S., Jeong, W. J., Park, J., Kim, T. I., Min, doS., & Choi, K. Y. Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant Wnt/ β -catenin signaling. *Journal of the National Cancer Institute* vol. 106,2. 2014, S. djt373.
113. Caraci, F., Gili, E., Calafiore, M., Failla, M., La Rosa, C., Crimi, N., Sortino, M. A., Nicoletti, F., Copani, A., & Vancheri, C. TGF-beta1 targets the GSK-3beta/beta-catenin pathway via ERK activation in the transition of human lung fibroblasts into myofibroblasts. *Pharmacological research* (57,4). 2008, S. 274-82.
114. Guo, X., Ramirez, A., Waddell, D. S., Li, Z., Liu, X., & Wang, X. F. Axin and GSK3-control Smad3 protein stability and modulate TGF- signaling. *Genes & development* (22,1). 2008, S. 106-20.
115. Wu, Z. Q., Li, X. Y., Hu, C. Y., Ford, M., Kleer, C. G., & Weiss, S. J. Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (109,41). 2012, S. 16654-9.
116. Yook, J. I., Li, X. Y., Ota, I., Hu, C., Kim, H. S., Kim, N. H., Cha, S. Y., Ryu, J. K., Choi, Y. J., Kim, J., Fearon, E. R., & Weiss, S. J. A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nature cell biology* (8,12). 2006, S. 1398-406.
117. Schütz, S. V., Cronauer, M. V., & Rinnab, L. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta promotes nuclear export of the androgen receptor through a CRM1-dependent mechanism in prostate cancer cell lines. *Journal of cellular biochemistry* (109,6). 2010, S. 1192-200.
118. Coghlan, M. P., Culbert, A. A., Cross, D. A., Corcoran, S. L., Yates, J. W., Pearce, N. J., Rausch, O. L., Murphy, G. J., Carter, P. S., Roxbee Cox, L., Mills,

9. Literaturverzeichnis

- D., Brown, M. J., Haigh, D., Ward, R. W., Smith, D. G., Murray, K. J. & Reith, A. D.** Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chemistry & biology* (7,10). 2000, S. 793-803.
119. **Vaquerizas, J. M., Kummerfeld, S. K., Teichmann, S. A., & Luscombe, N. M.** A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nature reviews. Genetics* (10,4). 2009, S. 252-63.
120. **Wunderlich, Z., & Mirny, L. A.** Different gene regulation strategies revealed by analysis of binding motifs. *Trends in genetics : TIG* (25,10). 2009, S. 434-40.
121. **Carroll, Sean B.** Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution. *Cell* (134,1). 2008, S. 25-36.
122. **Thomas, M. C. & Chiang C.-M.** The general transcription machinery and general cofactors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* (41,3). 2006, S. 105-78.
123. **Itoh, S., Thorikay, M., Kowanetz, M., Moustakas, A., Itoh, F., Heldin, C. H., & ten Dijke, P.** Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor-beta type I receptor-induced responses. *The Journal of biological chemistry* (278,6). 2003, S. 3751-61.
124. **Koinuma, D., Tsutsumi, S., Kamimura, N., Taniguchi, H., Miyazawa, K., Sunamura, M., Imamura, T., Miyazono, K., & Aburatani, H.** Chromatin immunoprecipitation on microarray analysis of Smad2/3 binding sites reveals roles of ETS1 and TFAP2A in transforming growth factor beta signaling. *Molecular and cellular biology* (29,1). 2009, S. 172-86.
125. **Plotnik, J. P., Budka, J. A., Ferris, M. W., & Hollenhorst, P. C.** ETS1 is a genome-wide effector of RAS/ERK signaling in epithelial cells. *Nucleic acids research* (42,19). 2014, S. 11928-40.
126. **Wang, Y., Huang, Z., Sun, M., Huang, W., & Xia, L.** ETS transcription factors: Multifaceted players from cancer progression to tumor immunity. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer* (1878,3). 2023, S. 188872.
127. **Hollenhorst, P. C., McIntosh, L. P., & Graves, B. J.** Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annual review of biochemistry* (80). 2011, S. 437-71.
128. **Hollenhorst, P. C., Jones, D. A., & Graves, B. J.** Expression profiles frame the promoter specificity dilemma of the ETS family of transcription factors. *Nucleic acids research* (32,18). 2004, S. 5693-702.

9. Literaturverzeichnis

129. **Findlay, V. J., LaRue, A. C., Turner, D. P., Watson, P. M., & Watson, D. K.** Understanding the role of ETS-mediated gene regulation in complex biological processes. *Advances in cancer research* (119). 2013, S. 1-61.
130. **Théveneau, E., Duband, J. L., & Altabef, M.** Ets-1 confers cranial features on neural crest delamination. *PloS one* (2,11). 2007, S. e1142.7.
131. **Nakamura, Y., Esnault, S., Maeda, T., Kelly, E. A., Malter, J. S., & Jarjour, N. N.** Ets-1 regulates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 and tenascin expression in primary bronchial fibroblasts. *Journal of immunology* (172,3). 2004, S. 1945-52.
132. **Zhou, X., Zhou, R., Zhou, H., Li, Q., Hong, J., Meng, R., Zhu, F., Zhang, S., Dai, X., Peng, G., Wu, G., & Li, Z.** ETS-1 Induces Endothelial-Like Differentiation and Promotes Metastasis in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* (45,5). 2018, S. 1827-39.
133. **Wagner, E. F.** AP-1--Introductory remarks. *Oncogene* (20,19). 2001, S. 2334-5.
134. **Karin, M., Liu, Z.g, & Zandi, E.** AP-1 function and regulation. *Current opinion in cell biology* (9,2). 1997, S. 240-6.
135. **Luscombe, N. M., Austin, S. E., Berman, H. M., & Thornton, J. M.** An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome biology* (1,1). 2000, S. REVIEWS001.
136. **Haberle, V., & Stark, A.** Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nature reviews. Molecular cell biology* (19,10). 2018, S. 621-37.
137. **Maston, G. A., Evans, S. K., & Green, M. R.** Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annual review of genomics and human genetics* (7). 2006, S. 29-59.
138. **Ogbourne, S. & Antalis T. M.** Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *The Biochemical journal* (331,1). 1998, S. 1-14.
139. **Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., Chen, X., Taipale, J., Hughes, T. R., & Weirauch, M. T.** The Human Transcription Factors. *Cell* (172,4). 2018, S. 650-65.
140. **Rodenhuis, S., van de Wetering, M. L., Mooi, W. J., Evers, S. G., van Zandwijk, N., & Bos, J. L.** Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. *The New England journal of medicine* (317,15). 1987, S. 929-35.

9. Literaturverzeichnis

141. **Lee, Y. R., Chen, M., & Pandolfi, P. P.** The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nature reviews. Molecular cell biology* (19,9). 2018, S. 547-62.
142. **Berx, G., Becker, K. F., Höfler, H., & van Roy, F.** Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Human mutation* (12,4). 1998, S. 226-37.
143. **Garner, M. M. & Revzin, A.** The use of gel electrophoresis to detect and study nucleic acid-protein interactions. *Trends in Biochemical Sciences* 11(10). 1986, S. 395–6.
144. **Johnson, D. S., Mortazavi, A., Myers, R. M., & Wold, B.** Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science (New York, N.Y.)* (316,5830). 2007, S. 1497-502.
145. **Core, L. J., Waterfall, J. J., & Lis, J. T.** Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science (New York, N.Y.)* (322,5909). 2008, S. 1845-8.
146. **Bronstein, I., Fortin, J., Stanley, P. E., Stewart, G. S., & Kricka, L. J.** Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Analytical biochemistry* (219,2). 1994, S. 169-81.
147. **Stables, J., Scott, S., Brown, S., Roelant, C., Burns, D., Lee, M. G., & Rees, S.** Development of a dual glow-signal firefly and Renilla luciferase assay reagent for the analysis of G-protein coupled receptor signalling. *Journal of receptor and signal transduction research* (19,1-4). 1999, S. 395-410.
148. **Zhao, S., Hong, C. K. Y., Myers, C. A., Granas, D. M., White, M. A., Corbo, J. C., & Cohen, B. A.** A single-cell massively parallel reporter assay detects cell-type-specific gene regulation. *Nature genetics* (55,2). 2023, S. 346-54.
149. **Bairoch, Amos.** The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource. *Journal of biomolecular techniques : JBT* (29,2). 2018, S. 25-38.
150. **Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Clevers, H.** Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science (N.Y)* (275,5307). 1997, S. 1784-7.
151. **Wrana, J. L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X. F., & Massagué, J.** TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* (71,6). 1992, S. 1003-14.
152. **He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W.** Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science (New York, N.Y.)* (281,5382). 1998, S. 1509-12.

9. Literaturverzeichnis

153. **Lernbecher, T., Müller, U., & Wirth, T.** Distinct NF-kappa B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. *Nature* (365,6448). 1993, S. 767-70.
154. **Wirth, T. & Baltimore, D.** Nuclear factor NF-kappa B can interact functionally with its cognate binding site to provide lymphoid-specific promoter function. *The EMBO journal* (7,10). 1988, S. 3109-13.
155. **Lee, W., Mitchell, P., & Tjian, R.** Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell vol.* (49,6). 1987, S. 741-52.
156. **Tetsu, O. & McCormick, F.** Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* (398,6726). 1999, S. 422-426.
157. **Hill, C. S., Marais, R., John, S., Wynne, J., Dalton, S., & Treisman, R.** Functional analysis of a growth factor-responsive transcription factor complex. *Cell* (73,2). 1993, S. 395-406.
158. **Ichida, M. & Finkel, T.** Ras regulates NFAT3 activity in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* (276,5). 2001, S. 3524-30.
159. **Kim, H. P., Roe, J. H., Chock, P. B., & Yim, M. B.** Transcriptional activation of the human manganese superoxide dismutase gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate. *The Journal of biological chemistry* (274,52). 1999, S. 37455-60.
160. **Kops, G. J., Dansen, T. B., Polderman, P. E., Saarloos, I., Wirtz, K. W., Coffey, P. J., Huang, T. T., Bos, J. L., Medema, R. H., & Burgering, B. M.** Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* (419,6904). 2002, S. 316-21.
161. **Schmoll, D., Allan, B. B., & Burchell, A.** Cloning and sequencing of the 5' region of the human glucose-6-phosphatase gene: transcriptional regulation by cAMP, insulin and glucocorticoids in H4IIE hepatoma cells. *FEBS letters* (383,1-2). 1996, S. 63-6.
162. **Selvaraj, N., Budka, J. A., Ferris, M. W., Jerde, T. J., & Hollenhorst, P. C.** Prostate cancer ETS rearrangements switch a cell migration gene expression program from RAS/ERK to PI3K/AKT regulation. *Molecular cancer* (13,61). 2014.
163. **Ma, Z., Qin, H., & Benveniste, E. N.** Transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-9 gene expression by IFN-gamma and IFN-beta: critical role of STAT-1alpha. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167,9). 2001, S. 5150-9.
164. **Runkle, E. A., Rice, S. J., Qi, J., Masser, D., Antonetti, D. A., Winslow, M. M., & Mu, D.** Occludin is a direct target of thyroid transcription factor-1 (TTF-1/NKX2-1). *The Journal of biological chemistry* (287,34). 2012, S. 28790-801.

9. Literaturverzeichnis

165. **Nishio, H. & Walsh, M. J.** CCAAT displacement protein/cut homolog recruits G9a histone lysine methyltransferase to repress transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (101,31). 2004, S. 11257-62.
166. **Saramäki, A., Banwell, C. M., Campbell, M. J., & Carlberg, C.** Regulation of the human p21(waf1/cip1) gene promoter via multiple binding sites for p53 and the vitamin D3 receptor. *Nucleic acids research* (34,2). 2006, S. 543-54.
167. **Fujita, N., Jaye, D. L., Kajita, M., Geigerman, C., Moreno, C. S., & Wade, P. A.** Cell (113,2). *MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer.* 2003, S. 207-19.
168. **Shih, J. Y., & Yang, P. C.** The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. *Carcinogenesis* (32,9). 2011, S. 1299-304.
169. **Tsai, C. N., Tsai, C. L., Tse, K. P., Chang, H. Y., & Chang, Y. S.** The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (99,15). 2002, S. 10084-9.
170. **Castro-Mondragon, J. A., Riudavets-Puig, R., Rauluseviciute, I., Lemma, R. B., Turchi, L., Blanc-Mathieu, R., Lucas, J., Boddie, P., Khan, A., Manosalva Pérez, N., Fornes, O., Leung, T. Y., Aguirre, A., Hammal, F., Schmelter, D., Baranasic, D.** JASPAR 2022: the 9th release of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic acids research* (50,D1). 2022, S. D165-D173.
171. **Blonska, M., Shambharkar, P. B., Kobayashi, M., Zhang, D., Sakurai, H., Su, B., & Lin, X.** TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF-kappaB activation. *The Journal of biological chemistry* (280,52). 2005, S. 43056-63.
172. **Lunter, P. C., & Wiche, G.** Direct binding of plectin to Fer kinase and negative regulation of its catalytic activity. *Biochemical and biophysical research communications* (296,4). 2002, S. 904-10.
173. **Jesse, S., Koenig, A., Ellenrieder, V., & Menke, A.** Lef-1 isoforms regulate different target genes and reduce cellular adhesion. *International journal of cancer* (126,5). 2010, S. 1109-20.
174. **Didichenko, S. A., Tilton, B., Hemmings, B. A., Ballmer-Hofer, K., & Thelen, M.** Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47phox by a membrane-targeted phosphoinositide 3-kinase. *Current biology : CB* (6,10). 1996, S. 1271-8.

9. Literaturverzeichnis

175. **Imamichi, Y. & Menke, A.** Signaling pathways involved in collagen-induced disruption of the E-cadherin complex during epithelial-mesenchymal transition. *Cells, tissues, organs* (185,1-3). 2007, S. 180-90.
176. **Singh, M., Spoelstra, N. S., Jean, A., Howe, E., Torkko, K. C., Clark, H. R., Darling, D. S., Shroyer, K. R., Horwitz, K. B., Broaddus, R. R., & Richer, J. K.** ZEB1 expression in type I vs type II endometrial cancers: a marker of aggressive disease. *Modern pathology* (21,7). 2008, S. 912-23.
177. **Brunet, A., Bonni, A., Zigmund, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., & Greenberg, M. E.** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* (96,6). 1999, S. 857-68.
178. **Michl, P., Ramjaun, A. R., Pardo, O. E., Warne, P. H., Wagner, M., Poulsom, R., D'Arrigo, C., Ryder, K., Menke, A., Gress, T., & Downward, J.** CUTL1 is a target of TGF(beta) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer cell* (7,6). 2005, S. 521-32.
179. **Klein, P. S. & Melton, D. A.** A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (93,16). 1996, S. 8455-9.
180. **Fell, J. B., Fischer, J. P., Baer, B. R., Blake, J. F., Bouhana, K., Briere, D. M., Brown, K. D., Burgess, L. E., Burns, A. C., Burkard, M. R., Chiang, H., Chicarelli, M. J., Cook, A. W., Gaudino, J. J., Hallin, J., Hanson, L., & Hartley, D. P.** Identification of the Clinical Development Candidate MRTX849, a Covalent KRASG12C Inhibitor for the Treatment of Cancer. *Journal of medicinal chemistry* (63,13). 2020, S. 6679-93.
181. **Camacho, C., Boratyn, G. M., Joukov, V., Alvarez, R. V., & Madden, T. L.** ElasticBLAST: accelerating sequence search via cloud computing. *BMC bioinformatics* (24,1). 2023, S. 1-17.
182. **Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., & Skripchenko, Y.** Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research* (52,D1). 2024, S. 33-43.
183. **Guo, Z. Y., Hao, X. H., Tan, F. F., Pei, X., Shang, L. M., Jiang, X. L., & Yang, F.** The elements of human cyclin D1 promoter and regulation involved. *Clinical epigenetics* (2,2). 2011, S. 63-76.
184. **Schmoll, D et al.** Identification of a cAMP response element within the glucose-6-phosphatase hydrolytic subunit gene promoter which is involved in the

9. Literaturverzeichnis

- transcriptional regulation by cAMP and glucocorticoids in H4IIE hepatoma cells. *The Biochemical journal* (338 (Pt 2)). 1999, S. 457-63.
185. **Kaufhold, S., & Bonavida, B.** Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* (33,1). 2014.
186. **Choi, J, Park, SY, and Joo, CK.** Transforming growth factor-beta1 represses E-cadherin production via slug expression in lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (48,6). 2007, S. 2708-18.
187. **Yang, H., Wang, L., Zhao, J., Chen, Y., Lei, Z., Liu, X., Xia, W., Guo, L., & Zhang, H. T.** TGF- β -activated SMAD3/4 complex transcriptionally upregulates N-cadherin expression in non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* (87,3). 2015, S. 249-57.
188. **Miraglia, L. J., King, F. J., & Damoiseaux, R.** Seeing the light: luminescent reporter gene assays. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* (14,8). 2011, S. 648-57.
189. **Kau, T. R., Way, J. C., & Silver, P. A.** Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention. *Nature reviews.* (4,2). 2004, S. 106-17.
190. **Delaneau, O., Zazhytska, M., Borel, C., Giannuzzi, G., Rey, G., Howald, C., Kumar, S., Ongen, H., Popadin, K., Marbach, D., Ambrosini, G., Bielser, D., Hacker, D., Romano, L., Ribaux, P., Wiederkehr, M., Falconnet, E., Bucher, P. & Bergmann, S.** Chromatin three-dimensional interactions mediate genetic effects on gene expression. *Science (New York, N.Y.)* (364,6439). 2019, S. eaat8266.
191. **Mimitou, E. P., Lareau, C. A., Chen, K. Y., Zorzetto-Fernandes, A. L., Hao, Y., Takeshima, Y., Luo, W., Huang, T. S., Yeung, B. Z., Papalexi, E., Thakore, P. I., Kibayashi, T., Wing, J. B., Hata, M., Satija, R., Nazor, K. L., & Sakaguchi, S.** Scalable, multimodal profiling of chromatin accessibility, gene expression and protein levels in single cells. *Nature biotechnology* (39,10). 2021, S. 1246-58.
192. **Derynck, Rik, and Ying E Zhang.** Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* (425,6958). 2003, S. 577-84.
193. **Ahearn, I. M., Haigis, K., Bar-Sagi, D., & Philips, M. R.** Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nature reviews. Molecular cell biology* (13,1). 2011, S. 39-51.
194. **Behre, G., Smith, L. T., & Tenen, D. G.** Use of a promoterless Renilla luciferase vector as an internal control plasmid for transient co-transfection assays of Ras-mediated transcription activation. *BioTechniques*, 26(1). 1999.
195. **Jolma, A., Yan, J., Whittington, T., Toivonen, J., Nitta, K. R., Rastas, P., Morgunova, E., Enge, M., Taipale, M., Wei, G., Palin, K., Vaquerizas, J. M.,**

9. Literaturverzeichnis

- Vincentelli, R., Luscombe, N. M., Hughes, T. R., Lemaire, P., Ukkonen, E., Kivioja, T., & Taipale, J.** DNA-binding specificities of human transcription factors. *Cell* (152,1-2). 2013, S. 327-39.
196. **Manavella, P. A., Roqueiro, G., Darling, D. S., & Cabanillas, A. M.** The ZFH1A gene is differentially autoregulated by its isoforms. *Biochemical and biophysical research communications* (360,3). 2007, S. 621-6.
197. **Wang, X. Y., Zhang, J. H., Zhang, X., Sun, Q. L., Zhao, C. P., & Wang, T. Y.** Impact of Different Promoters on Episomal Vectors Harboring Characteristic Motifs of Matrix Attachment Regions. *Scientific reports* (6). 2016, S. 26446.
198. **Hughes, P., Marshall, D., Reid, Y., Parkes, H., & Gelber, C.** The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *BioTechniques* (43,5). 2007, S. 575, 577-8, 581-2.
199. **Prasad, C. P., Tripathi, S. C., Kumar, M., & Mohapatra, P.** Passage number of cancer cell lines: Importance, intricacies, and way-forward. *Biotechnology and bioengineering* (120,8). 2023, S. 2049-2055.
200. **Thuault, S., Valcourt, U., Petersen, M., Manfioletti, G., Heldin, C. H., & Moustakas, A.** Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of cell biology* (174,2). 2006, S. 175-83.
201. **Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M. J., & Ten Dijke, P.** Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *European journal of biochemistry* (267,24). 2000, S. 6954-67.
202. **Wong, C., Rougier-Chapman, E. M., Frederick, J. P., Datto, M. B., Liberati, N. T., Li, J. M., & Wang, X. F.** Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta. *Molecular and cellular biology* (19,3). 1999, S. 1821-30.
203. **Chang, H., Liu, Y., Xue, M., Liu, H., Du, S., Zhang, L., & Wang, P.** Synergistic action of master transcription factors controls epithelial-to-mesenchymal transition. *Nucleic acids research* (44,6). 2016, S. 2514-27.
204. **Nagarajan, P., Chin, S. S., Wang, D., Liu, S., Sinha, S., & Garrett-Sinha, L. A.** Ets1 blocks terminal differentiation of keratinocytes and induces expression of matrix metalloproteases and innate immune mediators. *Journal of cell science* (123,20). 2010, S. 3566-75.
205. **Postigo, A. A.** Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. *The EMBO journal* (22,10). 2003, S. 2443-52.
206. **Feldker, N., Ferrazzi, F., Schuhwerk, H., Widholz, S. A., Guenther, K., Frisch, I., Jakob, K., Kleemann, J., Riegel, D., Bönisch, U., Lukassen, S., Eccles, R. L., Schmidl, C., Stemmler, M. P., Brabletz, T., & Brabletz, S.** Genome-wide

9. Literaturverzeichnis

- cooperation of EMT transcription factor ZEB1 with YAP and AP-1 in breast cancer. *The EMBO journal* (39,17). 2020, S. e103209.
207. **Pires, B. R., Mencialha, A. L., Ferreira, G. M., de Souza, W. F., Morgado-Díaz, J. A., Maia, A. M., Corrêa, S., & Abdelhay, E. S.** NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells. *PLoS one* (12,1). 2017, S. e0169622.
208. **Chua, H. L., Bhat-Nakshatri, P., Clare, S. E., Morimiya, A., Badve, S., & Nakshatri, H.** NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* (26,5). 2007, S. 711-24.
209. **Gheldof, A., Hulpiau, P., van Roy, F., De Craene, B., & Berx, G.** Evolutionary functional analysis and molecular regulation of the ZEB transcription factors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* (69,15). 2012, S. 2527-41.
210. **Bolós, V., Peinado, H., Pérez-Moreno, M. A., Fraga, M. F., Esteller, M., & Cano, A.** The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *Journal of cell science* (116,3). 2003, S. 499-511.
211. **Sakai, D., Suzuki, T., Osumi, N., & Wakamatsu, Y.** Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development. *Development (Cambridge, England)* (133,7). 2006, S. 1323-33.
212. **Wang, J., Wang, Y., Sun, D., Ren, F., Pang, S., & Xu, S.** CUTL1 induces epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Oncology reports* (37,5). 2017, S. 3068-74.
213. **Maily, F., Bérubé, G., Harada, R., Mao, P. L., Phillips, S., & Nepveu, A.** The human cut homeodomain protein can repress gene expression by two distinct mechanisms: active repression and competition for binding site occupancy. *Molecular and cellular biology* (16,10). 1996, S. 5346-57.
214. **Coqueret, O., Bérubé, G., & Nepveu, A.** The mammalian Cut homeodomain protein functions as a cell-cycle-dependent transcriptional repressor which downmodulates p21WAF1/CIP1/SDI1 in S phase. *The EMBO journal* (17,16). 1998, S. 4680-94.
215. **Bottazzi, M. E., Zhu, X., Böhmer, R. M., & Assoian, R. K.** Regulation of p21(cip1) expression by growth factors and the extracellular matrix reveals a role for transient ERK activity in G1 phase. *The Journal of cell biology* (146,6). 1999, S. 1255-62.
216. **Vasjari, L., Bresan, S., Biskup, C., Pai, G., & Rubio, I.** Ras signals principally via Erk in G1 but cooperates with PI3K/Akt for Cyclin D induction and S-phase entry. *Cell cycle* (18,2). 2019, S. 204-25.

9. Literaturverzeichnis

217. **Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y., & Wang, X. F.** Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (92,12). 1995, S. 5545-9.
218. **Pardali, K., Kurisaki, A., Morén, A., ten Dijke, P., Kardassis, D., & Moustakas, A.** Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *The Journal of biological chemistry* (275,38). 2000, S. 29244-56.
219. **Kivinen, L. & Laiho, M.** Ras- and mitogen-activated protein kinase kinase-dependent and -independent pathways in p21Cip1/Waf1 induction by fibroblast growth factor-2, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor-beta1. *Cell growth & differentiation* (10,9). 1999, S. 621-8.
220. **Calabrese, Edward J, and Linda A Baldwin.** Hormesis: the dose-response revolution. *Annual review of pharmacology and toxicology* (43). 2003, S. 175-97.
221. **Calabrese, Edward J.** Cancer biology and hormesis: human tumor cell lines commonly display hormetic (biphasic) dose responses. *Critical reviews in toxicology* (35,6). 2005, S. 463-582.
222. **Kim, R. K., Kim, M. J., Seong, K. M., Kaushik, N., Suh, Y., Yoo, K. C., Cui, Y. H., Jin, Y. W., Nam, S. Y., & Lee, S. J.** Beneficial effects of low dose radiation in response to the oncogenic KRAS induced cellular transformation. *Scientific reports* (5). 2015, S. 15809?
223. **Hallin, J., Engstrom, L. D., Hargis, L., Calinisan, A., Aranda, R., Briere, D. M., Sudhakar, N., Bowcut, V., Baer, B. R., Ballard, J. A., Burkard, M. R., Fell, J. B., Fischer, J. P., Vigers, G. P., Xue, Y., Gatto, S., Fernandez-Banet, J. & Pavlicek, A.** The KRASG12C Inhibitor MRTX849 Provides Insight toward Therapeutic Susceptibility of KRAS-Mutant Cancers in Mouse Models and Patients. *Cancer discovery* (10,1). 2020, S. 54-71.
224. **Issahaku, A. R., Salifu, E. Y., & Soliman, M. E. S.** Inside the cracked kernel: establishing the molecular basis of AMG510 and MRTX849 in destabilising KRASG12C mutant switch I and II in cancer treatment. *Journal of biomolecular structure & dynamics* (41,11). 2023, S. 4890-4902.
225. **Hill, C S et al.** Serum-regulated transcription by serum response factor (SRF): a novel role for the DNA binding domain. *The EMBO journal* (13,22). 1994, S. 5421-32.
226. **Olson, E. N. & Nordheim, A.** Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nature reviews. Molecular cell biology* (11,5). 2010, S. 353-65.

10. Erklärung zur Dissertation

„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.“

Willich, 05.12.24

Lea Sophie Henrich