Analyse der Bedeutung von onkogenem K-Ras^{G12C} und TGF-β1 in der epithelialen-mesenchymalen Transition nicht-kleinzelliger Lungenkarzinomzellen

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

vorgelegt von Liz Victoria Nagel
aus Filderstadt

Gießen, 2026

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. rer. nat. Andre Menke
2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Steffen Wagner

Tag der Disputation: 09.09.2026

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1

1.1 Das Lungenkarzinom ... 1

1.2 Kristen Rat Sarcoma Virus (K-Ras) ... 1

1.2.1 Ras Proteine ... 1

1.2.2 Ras Signalwege ... 2

1.2.3 *KRAS* Mutationen ... 3

1.2.4 K-Ras Inhibitoren ... 4

1.3 Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und Metastasierung ... 5

1.4 Transforming Growth Factor-β (TGF-β) ... 8

1.4.1 TGF-β ... 8

1.4.2 TGF-β1 induzierte Signalwege ... 9

1.4.2.1 SMAD-abhängiger TGF-β1 Signalweg ... 9

1.4.2.2 SMAD unabhängige TGF-β1 Signalwege ... 10

1.5 Bisheriger Kenntnisstand der Interaktionen zwischen dem TGF-β1 und Ras Signalweg ... 11

1.6 Zielsetzung der Arbeit ... 13

2 Material ... 14

2.1 Chemikalien ... 14

2.2 Verbrauchsmaterialien ... 15

2.3 Inhibitoren, Stimulatoren und Lösungsmittel ... 16

2.4 Primäre Antikörper ... 16

2.5 Sekundäre Antikörper ... 18

2.6 Fluoreszenzmarkierte Sonden und fluoreszierende Farbstoffe ... 19

2.7 Marker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ... 19

2.8 Eukaryotische Zelllinien ... 19

2.9 Geräte ... 20

2.10 Software ... 21

3 Methoden ... 22

3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen ... 22

3.2 Passagieren von Zellen ... *22*

3.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer ... *23*

3.4 Inhibition / Stimulation der Zellen ... *24*

3.5 Herstellung von Zelllysaten ... *24*

3.5.1 Kern-Zytosolpräparation, modifiziert nach Andrews und Faller (1991) ... 24

3.5.2 Herstellung von RIPA-/NOP-Gesamtlysaten ... 26

3.6 Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay ... *26*

3.7 SDS Page (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ... *27*

3.8 Immunoblotting ... *29*

3.9 Blot- und Gelfärbungen ... *31*

3.9.1 Coomassie Färbung ... 31

3.9.2 Ponceau-S-Färbung ... 31

3.10 Immundetektion durch spezifische Antikörper ... *32*

3.10.1 Immundetektion mittels Nah-Infrarot-Lumineszenz ... 32

3.10.2 Immundetektion mittels Chemilumineszenz ... 33

3.11 Immunzytochemie ... *33*

3.12 Statistik ... *35*

4 Ergebnisse ... 37

4.1 Analyse der Proteinmenge von Transkriptionsfaktoren, ESRPs, SMAD Proteinen und Cateninen in NSCLC Zelllinien ... *37*

4.2 Inhibition von K-Ras^{G12C} durch 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 ... *41*

4.3 Zeitabhängige Veränderungen der Proteinkonzentration von Slug und E-Cadherin nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 ... *42*

4.4 Morphologische Veränderungen der NSCLC-Zellen im Phasenkontrast nach Inhibition der onkogenen K-Ras^{G12C} Proteine und / oder Stimulation mit TGF-β1 ... *43*

4.5 Proteinexpressions- und Lokalisationsanalyse von EMT- Transkriptionsfaktoren und Markerproteinen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 ... *46*

4.5.1 Analyse der Veränderungen der Slug Proteinmenge und -lokalisation nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 ... 46

4.5.2 Analyse der Veränderungen der Snail Proteinmenge und -lokalisation nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 ... 51

4.5.3 Analyse der Veränderungen der ZEB 1 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 ... 55

4.5.4 Analyse der Veränderungen der E-Cadherin Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 57
4.5.5 Analyse der Veränderungen der Vimentin Proteinmenge und -lokalisation nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 58
4.6 Analyse der Veränderungen der ESRP 1 & 2 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 61
4.7 Analyse der Veränderungen der ATF 2 und STAT 3 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 62
4.8 Analyse der Veränderungen der SMAD 2 / 3 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 64
4.9 Lokalisationsanalyse von filamentösem Aktin (F-Aktin) und Vinculin nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 65
4.10 Analyse der Veränderungen der β- und ɣ-Catenin Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 67
5 Diskussion 71
5.1 Veränderungen der EMT-Transkriptionsfaktoren nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 71
5.1.1 Slug 72
5.1.2 Snail 73
5.1.3 ZEB 1 75
5.1.3.1 Detektion multipler ZEB 1 Signale im Western Blot: Isoformen und posttranslationale Modifikationen 75
5.1.3.2 Veränderungen der ZEB 1 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 77
5.2 Veränderungen der ESRP 1 & 2 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 79
5.3 Morphologische Veränderungen von NSCLC Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 80
5.4 Veränderungen des Aktin Zytoskeletts sowie des Vinculin Proteins in NSCLC Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 81
5.5 Methodendiskussion 83
6 Zusammenfassung 85
7 Summary 86

8 Literaturverzeichnis 87

9 Anhang 102

10 Erklärung zur Dissertation 108

11 Danksagung 109

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ras-Raf-Mek-Erk Signalwegs.....3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der GTP Hydrolyse von K-Ras Wildtyp, K-Ras^{G12C} und K-Ras^{G12C} mit spezifischem Inhibitor.....5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Metastasierung.....7
Abbildung 4: Schematische Darstellung des SMAD abhängigen TGF-β1 Signalwegs.9
Abbildung 5: Schematische Darstellung der SMAD unabhängigen TGF-β1 Signalwege und ihrer Interaktionen.....11
Abbildung 6: Analyse der Proteinmenge von Transkriptionsfaktoren, ESRPs, SMAD Proteinen, Cateninen, E-Cadherin und Vimentin in NSCLC Zelllinien.....38
Abbildung 7: Analyse der ZEB 1 Proteinmenge nach Transfektion von siZEB 1 in H358 und H1299 Zellen.....39
Abbildung 8: Inhibition von K-Ras^{G12C} durch 10 nM AMG 510 oder MRTX 849.....41
Abbildung 9: Zeitabhängige Veränderungen der Proteinmenge von Slug und E-Cadherin nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1.....43
Abbildung 10: Morphologische Veränderungen der NSCLC-Zellen im Phasenkontrast nach Inhibition der K-Ras^{G12C} Proteine und / oder Stimulation mit TGF-β1.....45
Abbildung 11: Veränderungen der Slug Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1.....47
Abbildung 12: Immunzytochemische Analyse von Slug und Erk in H358 Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1.....49
Abbildung 13: Immunzytochemische Analyse von Slug und Erk in HCC44 Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1.....50
Abbildung 14: Veränderungen der Snail Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1.....51
Abbildung 15: Immunzytochemische Analyse von Snail in H358 Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1.....53
Abbildung 16: Immunzytochemische Analyse von Snail in HCC44 Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1.....54
Abbildung 17: Veränderungen der ZEB 1 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation von TGF-β1.....56
Abbildung 18: Veränderungen der E-Cadherin Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1.....57
Abbildung 19: Veränderungen der Vimentin Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1.....58

Abbildung 20: Immunzytochemische Analyse von Vimentin in HCC44 Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 60
Abbildung 21: Veränderungen der ESRP 1 und 2 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 in H358 Zellen 62
Abbildung 22: Veränderungen der Proteinmenge von ATF 2 und STAT 3 nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 64
Abbildung 23: Immunzytochemische Analyse von F-Aktin und Vinculin in HCC44 Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 66
Abbildung 24: Veränderungen der β- und ɣ-Catenin Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 70
Abbildung 25: Immunzytochemische Analyse von Vimentin in H358 Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 102
Abbildung 26: Veränderungen der SMAD 2 / 3 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 103
Abbildung 27: Immunzytochemische Analyse von F-Aktin in H358 Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 105
Abbildung 28: Immunzytochemische Analyse von β-Catenin in HCC44 Zellen nach Inhibition mit K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 106

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primäre Antikörper für Western Blot und Immunzytochemie 16
Tabelle 2: Sekundäre Antikörper für den Western Blot.....18
Tabelle 3: Sekundäre Antikörper für die Immunzytochemie 19
Tabelle 4: Sonden und Farbstoffe für die Immunzytochemie 19
Tabelle 5: Verwendete eukaryotische Zelllinien.....19
Tabelle 6: Volumenmenge und Wachstumsfläche pro Schale / Well / Flasche.....23
Tabelle 7: Zellzahl pro Schale.....24
Tabelle 8: Verwendete Konzentration von Inhibitoren und Stimulanzien.....24
Tabelle 9: Konzentrationsreihe für die Eichgerade des BCA-*Assays*.....27
Tabelle 10: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen in verschiedenen Konzentrationen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....28
Tabelle 11: Dauer des Blottingvorgangs und Stärke der angelegten Spannung in Abhängigkeit des verwendeten Gels.....30
Tabelle 12: Durchschnittliche Anzahl der fokalen Kontakte pro Zelle.....104
Tabelle 13: (Mögliche) Isoformen von ZEB 1 aus der Proteindatenbank *UniProt* 107

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
Akt	Synonym: Proteinkinase B
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
AMH	Anti-Müller-Hormon
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATF 2	Aktivierender Transkriptionsfaktor 2
BCA	Bicinchoninsäure
BMP	*Bone morphogenetic protein* Knochenmorphogenetischen Proteine
BSA	Bovines Serumalbumin
CDH 1	Cadherin-1, E-Cadherin
CMF-PBS	*calcium and magnesium free phosphate buffered isotonic saline*
Co-SMAD	*Common mediator SMAD*
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dd H_2O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin
EDTA	*ethylendiaminetetraacetic acid* Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	*Epidermal Growth Factor* Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFP	*Enhanced Green Fluorescent Protein* Verbessertes grün fluoreszierendes Protein
EGFR	*Epidermal Growth Factor Receptor* Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EGTA	*ethylene glycol- bis(β-aminoethylether)-N,N,N´,N´-tetraacetic acid*

	Ethylenglycol-bis(aminoethyleter)-N,N,N´,N´-tetraessigsäure
ELK 1	*ETS-Like-1-Protein*
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
Erk	*Extracellular-signal-regulated kinase*
ESRP 1	*Epithelial splicing regulatory protein 1 / 2*
ESRP 2	
ETS 1 / 2	*E26 transformation-specific transcription factors 1 and 2*
EZM	Extrazelluläre Matrix
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FCS	Fetales Kälberserum
FE-Marker	*Page Ruler Prestained Protein Ladder*
FGFR	*Fibroblast Growth Factor Receptor*
	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
G	Gauge
GAP	GTPase aktivierende Proteine
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	*Guanine-nucleotide exchange factor*
	Guanosin-Nukleotid Austauschfaktor
GF	*Growth Factor*
	Wachstumsfaktor
Grb 2	*Growth factor receptor-bound protein 2*
	Wachstumsfaktor gebundenes Protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	GTP-hydrolysierendes Protein
HaCaT	*Human adult kreatinocytes*
HGF	*Hepatocyte Growth Factor*
	Hepatozyten Wachstumsfaktor
H-Ras	*Harvey Rat Sarcoma Virus*
HRP	*Horseradish peroxidase*
I-SMAD	*Inhibitor SMAD*
IF	Immunfloureszenz / Immunzytochemie
IgG	Immunglobulin G
JNK	c-Jun-N-terminalen Kinasen
kDA	Kilodalton

KEAP 1	*Kelch-like ECH-associated protein 1*
K-Ras	*Kristen Rat Sarcoma Virus*
K-Ras^{G12C}	K-Ras mit einer Punktmutation an Position 12, bei der die Aminosäure Glycin gegen Cystein ausgetauscht wurde
M/V	Masse-Volumen-Prozent
mAb	*Monoclonal Antibody* Monoklonaler Antikörper
MAPK	*Mitogen activated protein kinase*
Mek	*Mitogen-activated protein kinase kinase*
MEKK1	*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1* Synonym: MAP3K1
MET	Mesenchymale-epitheliale Transition
min.	mindestens
miR-200	mikroRNA 200
mRNA	*Messenger ribonucleic acid*
MS	Maus
mTOR	*Mammalian Target of Rapamycin*
n	Stichprobenumfang
N-Cadherin	Neuronales Cadherin
Na-DOC	*Deoxycholic acid sodium salt* Natriumdeoxycholate
NF-κB	*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*
NMuMG	*Murine Mammary Gland-Cells*
NOP	*N*-Octyl-2-pyrolidone
NP40	Nonidet P-40
N-Ras	*Neuroblastoma Rat Sarcoma Virus*
NSCLC	*Non-small cell lung cancer* Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
NuRD Komplex	*Nucleosome Remodeling and Deacetylase Complex*
pAb	*Polyclonal Antibody* Polyklonaler Antikörper
PD-L1	*Programmed Death-Ligand 1*
pErk	*Phosphorylated extracellular-signal regulated kinase*
pH	*Pontentia hydrogenii*

	Potential des Wasserstoffs
PI-Mix	Protease-Inhibitor-Mix
PI3K	*Phosphoinositide 3-kinase*
PTM	Posttranslationale Modifikationen
R-SMAD	*Receptor SMAD*
Raf	*Rapidly growing fibrosarcoma*
Ras	*Rat Sarcoma Virus*
RB	*Rabbit*
	Kaninchen
rcf	*Relative centrifugal force*
RIPA	*Radioimmunoprecipitation assay buffer*
ROCK	*Rho-associated coiled-coil containing protein kinase*
ROS	Proto-Onkogen-Tyrosin-Proteinkinase
rpm	*Rounds per minute*
RREB 1	*Ras-responsive element binding protein 1*
RTK	*Receptor tyrosine kinase*
	Rezeptor Tyrosin Kinase
SCLC	*Small cell lung cancer*
	Kleinzelliges Lungenkarzinom
SD	*Standard devitation*
	Standardabweichung
SDS	*Sodium dodecylsulfate*
	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	*Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEMA3F	Semaphorin 3F
shRNA	*Short hairpin ribonucleic acid*
S-IIP	*Switch II Pocket*
siRNA	*Small interfering ribonucleic acid*
SOS	*Son of Sevenless*
STAT 3	Signalüberträger und Aktivator der Transkription 3
STI	*Soybean trypsin inhibitor*
STK 11	*Serin/Threonin-Kinase 11*
TAK	*Transforming growth factor-β-activated kinase*
TBS	*Tris-buffered saline*

TBS/T	*Tris-buffered saline with Tween 20*
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N´,N´- Tetramethylethylendiamin
TGF-β1	*Transforming Growth Factor β1*
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierte Faktoren
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid
TβR	*Transforming Growth Factor β Receptor*
V/V	Volumenprozent
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
ZEB	*Zinc Finger E-box-binding Homeobox*
Zitrat	Zitronensäure-Monohydrat
ZO-1	*Zonula occludens-1*

1 Einleitung

1.1 Das Lungenkarzinom

Das Lungenkarzinom ist die weltweit am häufigsten vorkommende und tödlich endende Krebserkrankung für beide Geschlechter. Das Lungenkarzinom verursachte im Jahr 2022 weltweit fast 1,8 Millionen Todesfälle (International Agency for Research on Cancer (IARC), 2024). Das 5-Jahres-Überleben lag im Jahr 2020 für alle Subtypen und Stadien des Lungenkarzinoms in Deutschland bei rund 25 % bei Frauen und bei 19 % bei Männern (Robert Koch-Institut, 2023). Ein Grund für dieses niedrige Gesamtüberleben ist, dass 57 % der Lungenkarzinome erst im metastasierten Stadium diagnostiziert werden (Dela Cruz *et al.*, 2020).

Das Lungenkarzinom kann in das kleinzellige (SCLC = *Small Cell Lung Cancer*) und das nicht-kleinzellige (NSCLC = *Non Small Cell Lung Cancer*) Lungenkarzinom unterteilt werden (Barta *et al.*, 2019). Von allen diagnostizierten Lungenkarzinomen macht das NSCLC 85 % aus (Thai *et al.*, 2021). Das NSCLC kann in die histologischen Subtypen des Adeno-, Plattenepithel- und großzelligen Karzinoms unterteilt werden (Barta *et al.*, 2019). Hierbei stellt das Adenokarzinom den häufigsten histologischen Subtyp dar (Thai *et al.*, 2021a). Nikotinkonsum ist einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung des Lungenkarzinoms. Bei Nichtrauchern wird angenommen, dass eine genetische Prädisposition, Umweltnoxen und berufliche Schadstoffexpositionen zum Lungenkarzinomrisiko beitragen (Barta *et al.*, 2019; Dela Cruz *et al.*, 2020). Lungenadenokarzinome weisen in ca. 60% der Fälle Treibermutationen auf, wie beispielsweise Mutationen im epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) oder *KRAS* Gen oder Translokationen im *ALK* oder *ROS* Gen (Friedlaender *et al.*, 2024).

1.2 *Kristen Rat Sarcoma Virus* (K-Ras)

1.2.1 Ras Proteine

Im menschlichen Genom gibt es drei *Rat Sarcoma Virus* (*RAS*) Gene (Cascetta *et al.*, 2022): *NRAS* (*Neuroblastoma Ras*) (Hall *et al.*, 1983; K Shimizu *et al.*, 1983), *HRAS* (*Harvey Ras*) (Harvey, 1964) und *KRAS* (*Kristen Ras*) (Kirsten and Mayer, 1967). Die Ras Proteine sind an der Kontrolle der Zellproliferation, des Zellüberlebens und der Zelldifferenzierung, sowie der Apoptose und Zellmotilität beteiligt (Giehl, 2005).

Aus dem *KRAS* Gen entstehen durch alternatives Spleißen zwei Proteine: K-Ras4A und K-Ras4B (Kenji Shimizu *et al.*, 1983; McGrath *et al.*, 1983). Während K-Ras4B ubiquitär exprimiert wird, ist die K-Ras4A Expression gewebespezifisch (Wang *et al.*, 2001) und für die Embryonalentwicklung nicht wesentlich (Plowman *et al.*, 2003). K-Ras4A spielt möglicherweise eine Rolle bei der Tumorinitiierung, jedoch nicht bei der Aufrechterhaltung (To *et al.*, 2008). Über den Einfluss der Spleißvarianten auf die

Entstehung des NSCLC ist jedoch wenig bekannt (Cascetta *et al.*, 2022). Im Folgenden wird der in der Literatur gebräuchliche Begriff K-Ras verwendet, der in der Regel K-Ras4B bezeichnet.

1.2.2 Ras Signalwege

Ras Proteine haben eine Schlüsselrolle bei der Weiterleitung von Signalen extrazellulär aktivierter Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu intrazellulären Signalkaskaden. Ras interagiert mit einer Vielzahl unterschiedlicher Effektorproteine (Giehl, 2005). Die Hauptsignalkaskaden sind der Ras-Raf-Mek-Erk-Signalweg (s. Abb. 1) und Ras-PI3K-Akt-mTor Signalweg (Cascetta *et al.*, 2022).
Die Ras Proteine sind über einen Farnesylrest mit der Plasmamembran assoziiert und agieren als GTPasen (GTP-hydrolysierende Proteine) in der Signaltransduktion (Ceddia *et al.*, 2022). Ras ist in der GTP gebundenen Form aktiv und weist aufgrund einer aus der Aktivierung resultierenden Konformationsänderung zwei Bindungsstellen auf, die *Switch* I und II genannt werden (Campbell *et al.*, 1998). Diese bilden eine Interaktionsfläche, die vom ɣ-Phosphat des GTPs stabilisiert wird und über die nachgeschaltete Effektorproteine aktiviert werden. Durch die intrinsische GTPase-Funktion, welche von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) unterstützt wird, hydrolysieren die Ras Proteine GTP zu GDP. In ihrer GDP-gebundenen Form sind die Ras Proteine inaktiv und können nachgeschaltete Effektorproteine nicht aktivieren. Ras Proteine können mithilfe der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF), die den Austausch von GDP gegen GTP katalysieren, wieder aktiviert werden (Ceddia *et al.*, 2022).
Die Bindung von Liganden an Rezeptoren führt zur Rekrutierung von Adaptorproteinen, wie dem *Growth Factor Receptor Binding Protein 2* (Grb 2), wie in Abbildung 1 dargestellt. Diese rekrutieren wiederum GEFs, wie *Son of Sevenless* (SOS) an die Zellmembran und formen gemeinsam einen Komplex, der Ras durch den Austausch von GDP gegen GTP aktiviert (Downward, 2003). Das Protein liegt nun in seiner GTP-gebundenen Form vor und aktiviert einen der *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) Signalwege, den Ras-Raf-Mek-Erk Signalweg (s. Abb. 1). Das aktivierte Ras Protein rekrutiert die *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase* (MAPKKK) Raf an die Zellmembran und aktiviert diese. Diese wiederum aktiviert die *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase* (MAPKK) Mek 1 / 2, welche die *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) *Extracellular Signal-Regulated Kinase* 1 / 2 (Erk 1 / 2) aktiviert. Alle Bestandteile dieser Signalkaskade sind Serin-Threonin-Kinasen, die sich gegenseitig durch Phosphorylierung aktivieren (Guo *et al.*, 2020). Das phosphorylierte Erk (pErk) aktiviert zytosolische Proteine und transloziert in den Zellkern und bindet an unterschiedliche

Transkriptionsfaktoren. Zu diesen gehören beispielsweise Fos, c-Jun und Elk-1 (Downward, 2003). Das zytoplasmatische Erk reguliert über einen negativen *Feedback*-Mechanismus den Signalweg (Guo *et al.*, 2020).

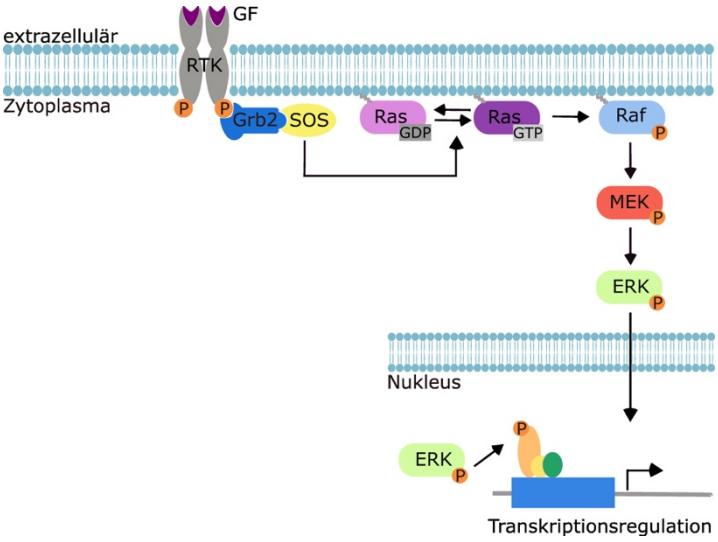


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ras-Raf-Mek-Erk Signalwegs

Die Aktivierung erfolgt hier beispielhaft über eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) durch die Bindung eines Wachstumsfaktors (GF). Die Aktivierung mittels Phosphorylierung führt zur Rekrutierung von Adapterproteinen wie Grb 2 und Nukleotidaustauschfaktoren (GEF) wie SOS. SOS überführt Ras in seine aktive Form durch den Austausch von GDP gegen GTP. Aktives Ras aktiviert Raf, welches mittels Phosphorylierung Mek und anschließend Erk aktiviert. Erk translozíert in den Nukleus und übt unter anderem regulative Funktionen auf die Transkription aus (verändert nach Frémin & Meloche, 2010. © BioMed Central Ltd.. Lizenziert unter CC BY 2.0).

1.2.3 *KRAS* Mutationen

Mutationen im *RAS* Protoonkogen sind die häufigsten aktivierenden Mutationen in humanen Krebszellen (Lanman *et al.*, 2020). Die *KRAS* Mutationen gehören zu den häufigsten Mutationen bei Bauchspeicheldrüsen- (80 %), Kolorektal- (40 %) und Lungenadenokarzinomen (30 %) (Christensen *et al.*, 2020; Ceddia, Landi and Cappuzzo, 2022). Im Lungenadenokarzinom ist die häufigste *KRAS* Mutation die G12C Mutation. Diese macht 12 % aller onkogenen Mutationen im NSCLC aus (Thai *et al.*, 2021). Die G12C Mutation ist eine Punktmutation, die zum Austausch der Aminosäure Glycin durch Cystein an der Position 12 im K-Ras Protein führt (Cascetta *et al.*, 2022). Die Punktmutation verursacht eine sterische Behinderung der Bindung von GAP-Proteinen an K-Ras, wodurch die GTP-Hydrolyse nicht stattfinden kann und mehr K-Ras in seiner GTP-gebundenen aktiven Form vorliegt (Scheffzek *et al.*, 1997). Das K-Ras^{G12C} Protein ist somit dauerhaft aktiv und führt zur Hyperaktivierung des Ras-Raf-Mek-Erk Signalwegs, wie in Abbildung 2 zu sehen ist (Christensen *et al.*, 2020)

und damit zum unkontrollierten Zellwachstum und abnormalem Zellüberleben (Cekani *et al.*, 2022).

K-Ras^{G12C} Mutationen treten häufiger in kaukasischen als in asiatischen oder afrikanischen ethnischen Gruppen auf (Dearden *et al.*, 2013; Adib *et al.*, 2022). Zudem sind *KRAS* mutierte Adenokarzinome häufig mit einem früheren oder aktuellen Nikotinkonsum assoziiert. NSCLC Tumore von Rauchern weisen eine signifikant erhöhte Mutationsrate auf (Govindan *et al.*, 2012). Des Weiteren sind auch jüngere, nicht rauchende Frauen gehäuft von *KRAS^{G12C}* mutierten NSCLC Tumoren betroffen. In dieser Gruppe sind jedoch Mutationen im *EGFR* Gen häufiger als im *KRAS* Gen (Dogan *et al.*, 2012; Govindan *et al.*, 2012). *KRAS* Mutationen sind mit einer schlechten Prognose assoziiert (Barta *et al.*, 2019), vor allem wenn Komutationen von *STK11*, *KEAP1* oder *PD-L1* sowie weitere *KRAS* Mutationen vorliegen (Cekani *et al.*, 2022).

1.2.4 K-Ras Inhibitoren

Über Jahrzehnte galten *KRAS* mutierte Karzinome als nicht ursächlich therapierbar. Viele Studien zur Identifizierung und Entwicklung direkter oder indirekter Ras Inhibitoren scheiterten aufgrund fehlender klinischer Wirksamkeit (Stalnecker and Der, 2020), Nebenwirkungen, der Aktivierung von Resistenzmechanismen (Christensen *et al.*, 2020) oder mangelnder Selektivität der entwickelten Medikamente (Parums, 2022). Die direkte Inhibierung von K-Ras^{G12C} scheiterte vor allem aufgrund der flachen Oberfläche des Proteins, dem Mangel an aktiven Bindungsstellen und der hohen Affinität von Ras zu GTP (Ceddia *et al.*, 2022). Im Jahr 2013 entwickelte Shokat und seine Arbeitsgruppe einen direkten, irreversiblen, kovalenten Inhibitor. Dieser bindet kovalent an das Cystein 12 der GDP-gebundenen Form des K-Ras^{G12C} Proteins. Diese Bindung führt zur Öffnung einer bisher unbekannten allosterischen Bindungsstelle, der sogenannten *Switch-II-Pocket* (S-IIP), welche der K-Ras^{G12C} Inhibitor blockiert. Durch die Blockade dieser Bindungsstellen kann Raf nicht mehr binden und aktiviert werden. Zudem führt die Bindung des Inhibitors zur Verschiebung der relativen Nukleotidaffinität des mutierten K-Ras Proteins von GTP zu GDP, wodurch die K-Ras^{G12C} Proteine in den inaktiven Zustand übergehen (s. Abb. 2). Da die K-Ras^{G12C} Inhibitoren an das mutierte Cystein binden, werden Wildtyp K-Ras Proteine nicht beeinträchtigt (Lanman *et al.*, 2020). In den nachfolgenden Jahren wurden verschiedene weitere K-Ras^{G12C} Inhibitoren entwickelt. In dieser Arbeit wurden die Inhibitoren AMG 510 des Unternehmens Amgen Inc. (Lanman *et al.*, 2020) und MRTX 849 des Unternehmens Array Biopharma (Christensen *et al.*, 2020) verwendet. Beide Inhibitoren erhielten im Jahr 2022 (AMG 510) und 2024 (MRTX 849) die Zulassung zur Behandlung des K-Ras^{G12C} mutierten, vorbehandelten NSCLCs in Europa. AMG 510 ist als Wirkstoff Sotorarsib mit dem Handelsnamen

Lumykras® verfügbar und MRTX 849 als Wirkstoff Adagrasib mit dem Handelsnamen Krazati® (European Medicines Agency, 2022, 2024).

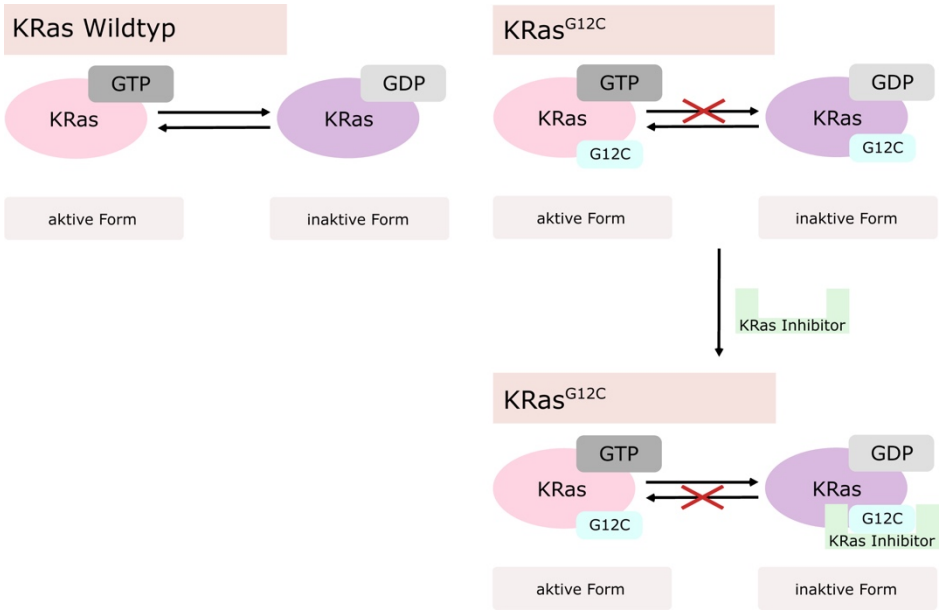


Abbildung 2: Schematische Darstellung der GTP Hydrolyse von K-Ras Wildtyp, K-Ras^{G12C} und K-Ras^{G12C} mit spezifischem Inhibitor

Das Wildtyp K-Ras Protein wechselt aufgrund der GTP Hydrolyse zwischen der aktiven und inaktiven Form. Das mutierte K-Ras^{G12C} ist aufgrund der sterischen Behinderung der GAP Bindung dauerhaft aktiv und kann nicht in den inaktiven Zustand übergehen. Bindet jedoch der spezifische Inhibitor an K-Ras^{G12C} wird es in der inaktiven Form blockiert, kann keine Effektorproteine aktivieren und nicht mehr in den aktiven Zustand überführt werden (entnommen von und verändert nach Ceddia, Landi and Cappuzzo., 2022. © Ceddia, Landi and Cappuzzo 2022. Lizenziert unter CC BY 4.0.).

1.3 Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und Metastasierung

Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) beschreibt den Prozess der Umwandlung von Zellen mit epithelialen zu Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften (Hay, 1995). Während die epitheliale Zellmorphologie durch enge Zell-Zell-Kontakte und eine kopfsteinpflasterartige Zellform gekennzeichnet ist (Bae *et al.*, 2013), ist der mesenchymale Phänotyp durch eine spindelförmigen Morphologie und eine verstärkte Zellmotilität definiert (Voulgari and Pintzas, 2009). Die verstärkte Beweglichkeit der Zellen resultiert unter anderem aus dem Abbau der Zell-Zell-Kontakte sowie der extrazellulären Matrix (EZM) und aus Veränderungen des Zytoskeletts (Lamouille *et al.*, 2014).

Die phänotypischen Veränderungen basieren auf Veränderungen der Proteinausstattung. Der sogenannte „*Cadherin-Switch*“ beschreibt die verminderte Expression von E-Cadherin und die vermehrte Expression von N-Cadherin (Voulgari and Pintzas, 2009). E-Cadherin (Takeichi, 1977) ist ein Mitglied der Cadherin-Superfamilie

und an der Organisation des Epithels sowie der Aufrechterhaltung der Zellpolarität durch seine Funktion als Adhäsionskontakt beteiligt. E-Cadherin bindet mit seiner zytoplasmatischen Domäne an β- oder ɣ-Catenin, welches wiederum an α-Catenin bindet. So verknüpft α-Catenin die Adhärenskontakte mit dem Zytoskelett der Zelle (Tian *et al.*, 2011). E-Cadherin wird vom *CDH 1* Gen kodiert, dessen Promotor Bindungsstellen für zahlreiche EMT-typische Transkriptionsfaktoren aufweist (Peinado *et al.*, 2007). Der Verlust von E-Cadherin ist ein Charakteristikum der EMT (Thiery, 2002) und in vielen schlecht differenzierten NSCLC Tumoren zu finden (Grigora *et al.*, 2017). Die Expression von E-Cadherin verhindert die Tumorzellinvasion nicht allein durch die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte (Kalluri and Weinberg, 2009), sondern auch durch die Modulation intrazellulärer Signalkaskaden (Onder *et al.*, 2008). In A549 Lungenadenokarzinomzellen führt der alleinige *Knockdown* von E-Cadherin zur Annahme eines mesenchymalen Phänotyps (Bae *et al.*, 2013).

Des Weiteren werden mesenchymale Proteine wie Vimentin und Fibronektin, sowie Matrixmetalloproteinasen und Integrine während der EMT vermehrt exprimiert. Epitheliale Proteine wie ZO-1 und Zytokeratin werden dagegen weniger synthetisiert (Lamouille *et al.*, 2014). Darüber hinaus ist die EMT mit Stammzelleigenschaften, Therapieresistenz (Peindl *et al.*, 2022), Apoptoseresistenz (Sánchez-Tilló *et al.*, 2012), Immunsuppression (Miyazono, 2009) sowie gesteigerter Zellmigration und -invasion (Gemmill *et al.*, 2011) assoziiert.

Die EMT kann den Metastasierungsprozess, welcher in Abbildung 3 dargestellt ist, unterstützen, indem sie Tumorzellen ermöglicht die Basalmembran zu überwinden und in das Gefäßsystem (Intravasation) einzutreten. Im nächsten Schritt verlassen die Tumorzellen das Gefäßsystem und dringen in ein sekundäres Parenchym ein (Extravasation). Dort bilden sich Mikrometastasen, die kolonisieren können und makroskopisch sichtbare Metastasen ausbilden können. Die Bildung von Metastasen kann an einem sekundären Ort über die mesenchymale-epitheliale Transition (MET) erfolgen, was die Konversion vom mesenchymalen zu epithelialen Phänotyp beschreibt und dazu führt, dass die Metastase histopathologisch ihrem epithelialen Primärtumor ähnelt (Kalluri and Weinberg, 2009).

EMT kann auch vorübergehend und reversibel sein. Sie stellt einen kontinuierlichen Fluss zwischen der epithelialen und mesenchymalen Zustandsform einer Zelle dar und kann nur partiell erfolgen (partielle, inkomplette, hybride EMT). Die partielle EMT stellt möglicherweise die relevanteste Form der EMT für Krebszellen dar, da sie den Zellen die Plastizität für den Metastasierungsprozess verleiht (Nieto *et al.*, 2016; Pastushenko and Blanpain, 2019; Stemmler *et al.*, 2019).

EMT tritt in Zellen auf, die zuvor genetische Mutationen oder epigenetische Modifikationen erfahren haben, die die Tumorbildung begünstigen (Voulgari and Pintzas, 2009). Ausgelöst wird EMT durch Signale aus dem tumorassoziierten Bindegewebe, wie beispielsweise durch Wachstumsfaktoren wie *Transforming Growth Factor β* (TGF-β) oder *Epithelial Growth Factor* (EGF) oder durch Hypoxie (Peinado *et al.*, 2007; Kalluri and Weinberg, 2009). Epitheliale Karzinomzellen, die den Prozess der EMT durchlaufen, befinden sich vor allem an der invasiven Front eines Tumors (Nieto *et al.*, 2016).
EMT kann in drei unterschiedliche Typen eingeteilt werden, denn sie spielt neben der Tumorgenese und Metastasierung (Typ 3), auch eine wichtige Rolle in der Embryogenese und Gastrulation (Typ 1), sowie der Fibrosierung und Wundheilung (Typ 2) (Kalluri and Weinberg, 2009).

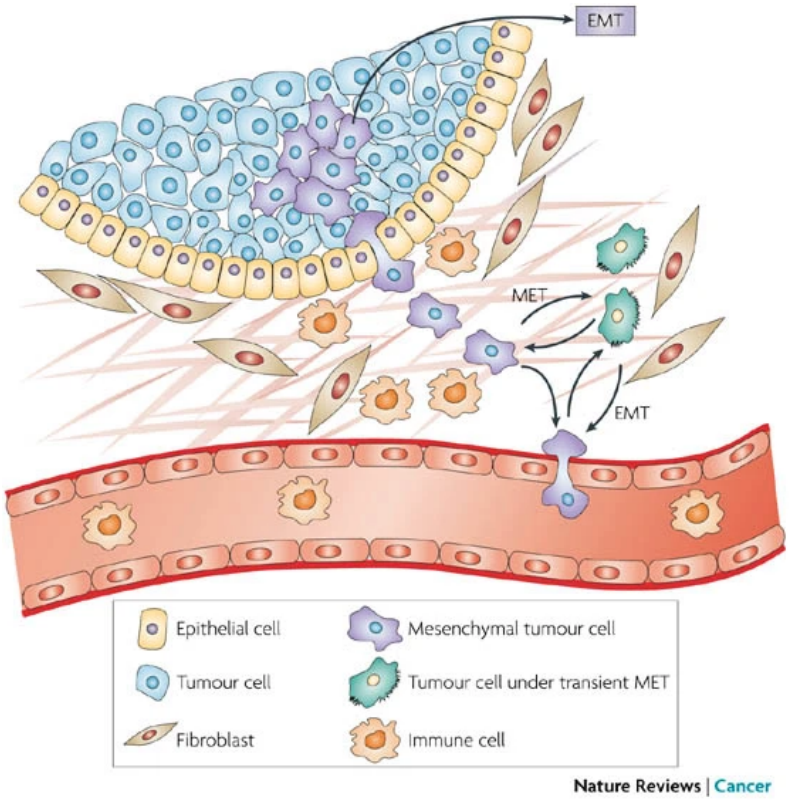


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Metastasierung
Im Rahmen der EMT wandeln Tumorzellen ihren epithelialen Phänotyp in einen mesenchymalen um und nehmen eine mesenchymale Proteinausstattung an. Dies ermöglicht eine verstärkte Zellmigration und Invasivität. Dadurch können sich Tumorzellen in die unmittelbare Tumorumgebung oder mittels Intra- und Extravasation an einen entfernteren Ort absiedeln. Mittels MET können Tumorzellen am Sekundärort Metastasen bilden, die dem Primarius ähnelt (entnommen aus Peinado *et al.*, 2007, mit Genehmigung von Springer Nature, © Springer Nature 2007).

1.4 *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β)

1.4.1 TGF-β

TGF-β 1 - 3 gehören zu einer Familie von Wachstumsfaktoren, die mehr als 40 Proteine umfasst (Bierie and Moses, 2006). Zu dieser gehören beispielsweise *Bone-Morphogenetic Proteins* (BMPs), Anti-Müller-Hormon (AMH), Aktivine und Inhibine sowie eine Vielzahl weiterer Proteine (Massagué, 1998).

In humanen Zellen gibt es drei unterschiedliche TGF-β Liganden: TGF-β1 (Derynck *et al.*, 1985), TGF-β2 (De Martin *et al.*, 1987) und TGF-β3 (Ten Dijke *et al.*, 1988). Je nach Tumorentität können die TGF-β Liganden hochreguliert sein (Kubiczkova *et al.*, 2012). Am häufigsten ist TGF-β1 in humanen Krebszelllinien heraufreguliert (Martin *et al.*, 2020). Während der malignen Transformation von Brustkrebszellen konnte gezeigt werden, dass TGF-β1 heraufreguliert wird während reziprok TGF-β3 herabreguliert wird (Flanders *et al.*, 2016). In der folgenden experimentellen Arbeit wurde ausschließlich mit TGF-β1 gearbeitet.

TGF-β hat eine duale Funktion: Einerseits hat TGF-β eine tumorsuppressive und antiproliferative Funktion. Andererseits fördert TGF-β in späteren Stadien der Karzinomentwicklung die Metastasierung und Invasivität (Roberts and Wakefield, 2003). Es wird angenommen, dass die Mikroumgebung des Tumors, sowie unterschiedliche molekulare Profile und die umgebenden Fibroblasten Einfluss darauf nehmen, welchen Effekt TGF-β auf die epitheliale Zelle hat. Wie genau TGF-β seine Funktion ändert, ist unklar (Bierie and Moses, 2006).

Die Synthese von TGF-β erfolgt in Fibroblasten und Epithelzellen des Stromas, sowie in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Derynck *et al.*, 2001). In fortgeschrittenen Tumorstadien können Tumorzellen selbst TGF-β synthetisieren, welches autokrin auf die Zelle wirkt (Lehmann *et al.*, 2000). Die TGF-β Proteine werden als Vorstufen synthetisiert und durch proteolytische Spaltung, Matrixmetalloproteinasen oder strukturelle Modifikation in der EZM oder an der Zellmembran aktiviert (Derynck *et al.*, 2001).

Ebenso wie es drei unterschiedliche TGF-β Liganden gibt, gibt es auch drei unterschiedliche TGF-β Rezeptoren (TβR). Für den TGF-β1 Signalweg sind vor allem die Subtypen TβRI und TβRII relevant, die als Homodimere in der Zellmembran vorliegen (Bierie and Moses, 2006). Ein TGF-β1 Dimer bindet mit hoher Affinität an zwei TβRII Moleküle, welche wiederum an zwei TβRI Moleküle binden. Durch Phosphorylierung an einer glycin- und serinreichen Stelle werden diese aktiviert (s. Abb. 4). Das aktivierte Heterotetramer induziert daraufhin die weitere Signalkaskade (Massagué, 1998).

Neben dem TGF-β1 Signalweg tragen weitere Signalwege zur Induktion der EMT bei: Beispielsweise der Wnt / β-Catenin, NOTCH, Hedgehog, Ras-Raf-Mek-Erk oder NFκB Signalweg (Voulgari and Pintzas, 2009).

1.4.2 TGF-β1 induzierte Signalwege

1.4.2.1 SMAD-abhängiger TGF-β1 Signalweg

Der phosphorylierte TβRI aktiviert die sogenannten Rezeptor-SMAD-Proteine (R-SMAD), SMAD 2 und 3, durch Phosphorylierung. Diese bilden Heterotrimere mit dem *common mediator* SMAD-Protein (Co-SMAD), SMAD 4 (s. Abb. 4) (Massagué, 1998; Jayaraman and Massagué, 2000). Der Komplex transloziert in den Nukleus und bindet mithilfe von Koaktivatoren oder -repressoren an die entsprechenden Zielgene (Derynck *et al.*, 2001). Neben den beiden genannten SMAD-Gruppen, gibt es auch inhibitorisch wirksame SMAD-Proteine (I-SMAD) wie beispielsweise SMAD 7. Dessen mRNA Expression wird durch TGF-β1 gesteigert, sodass ein negatives *Feedback* entsteht (Nakao *et al.*, 1997).

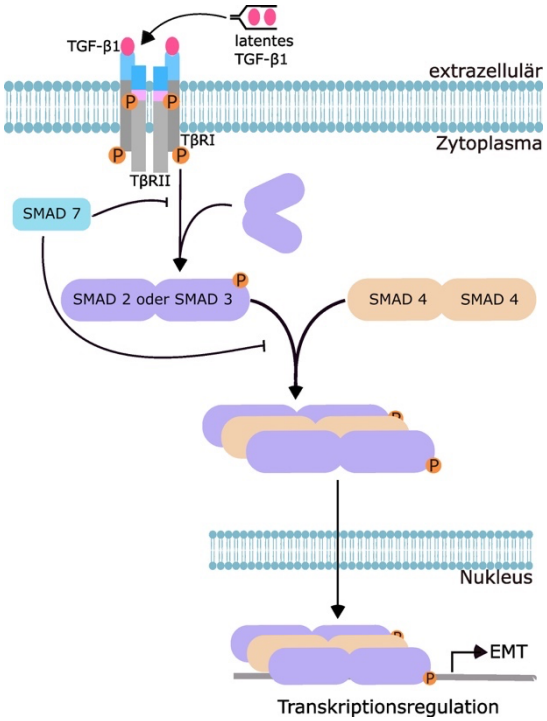


Abbildung 4: Schematische Darstellung des SMAD abhängigen TGF-β1 Signalwegs

TGF-β1 bindet an das Homodimer des TβRII, welches das Homodimer des TβRI bindet und es mittels Phosphorylierung aktiviert. Das aktivierte Heterotetramer aktiviert SMAD 2 oder 3, welche einen Komplex mit SMAD 4 bildet. Dieser Komplex transloziert in den Nukleus, wo er unter anderem die Expression der EMT-Transkriptionsfaktoren moduliert. SMAD 7 kann den beschriebenen Signalweg inhibieren (verändert nach Akhurst & Hata, 2012, mit Genehmigung von Springer Nature, © Springer Nature 2012).

SMAD Proteine können nicht nur von TGF-β1 aktiviert werden, sondern auch in geringerem Ausmaß von anderen Wachstumsfaktoren wie EGF oder *hepatocyte growth factor (HGF)* (De Caestecker *et al.*, 1998) oder Kinasen wie beispielsweise Erk (Kretzschmar *et al.*, 1999), JNK (Engel *et al.*, 1999) und MEKK 1 (Brown *et al.*, 1999). Die mögliche Interaktion von SMAD und Erk ist allerdings sehr umstritten (vgl. Kapitel 1.5). Die SMAD abhängige TGF-β1 Signalkaskade induziert die Expression einiger Transkriptionsfaktoren, die den EMT-Prozess steuern. Zu den klassischen EMT-Transkriptionsfaktoren gehören unter anderem Snail (Grau *et al.*, 1984; Nüsslein-Volhard *et al.*, 1984), Slug (Nieto *et al.*, 1994), Twist (Thisse *et al.*, 1987), ZEB 1 (Funahashi *et al.*, 1993) und ZEB 2 (Verschueren *et al.*, 1999). Ihre Expression und Funktion unterscheiden sich je nach Gewebe, Zeitpunkt (Stemmler *et al.*, 2019) und Lokalisation der Zellen im Tumor (Voulgari and Pintzas, 2009). Den zuvor genannten Transkriptionsfaktoren ist gemein, dass sie als direkter Repressor am E-Cadherin Promotor wirken können (Peinado *et al.*, 2007). Neben gemeinsamen Zielgenen steuern sie auch spezifische Zielgene und können sich untereinander regulieren (Stemmler *et al.*, 2019).

1.4.2.2 SMAD unabhängige TGF-β1 Signalwege

Neben der SMAD vermittelten Signalkaskade können TGF-β1 und seine Rezeptoren auch weitere Signalwege aktivieren. Dazu gehören beispielsweise der Ras-Raf-Mek-Erk Signalweg (s. Kapitel 1.5), der JNK / p 38 MAPK Signalweg, die Rho GTPasen sowie der PI3K / Akt Signalweg (Derynck and Zhang, 2003; Giehl *et al.*, 2007). Diese üben Funktionen in der Apoptose (JNK / p 38 MAPK Signalweg) (Zhang, 2009), in der Formation von Stressfasern, in der EMT Einleitung (Rho GTPasen) (Bhowmick *et al.*, 2001) oder in den Translationsprozessen (PI3K-Akt Signalweg) (Lamouille and Derynck, 2007) aus (s. Abb. 5).

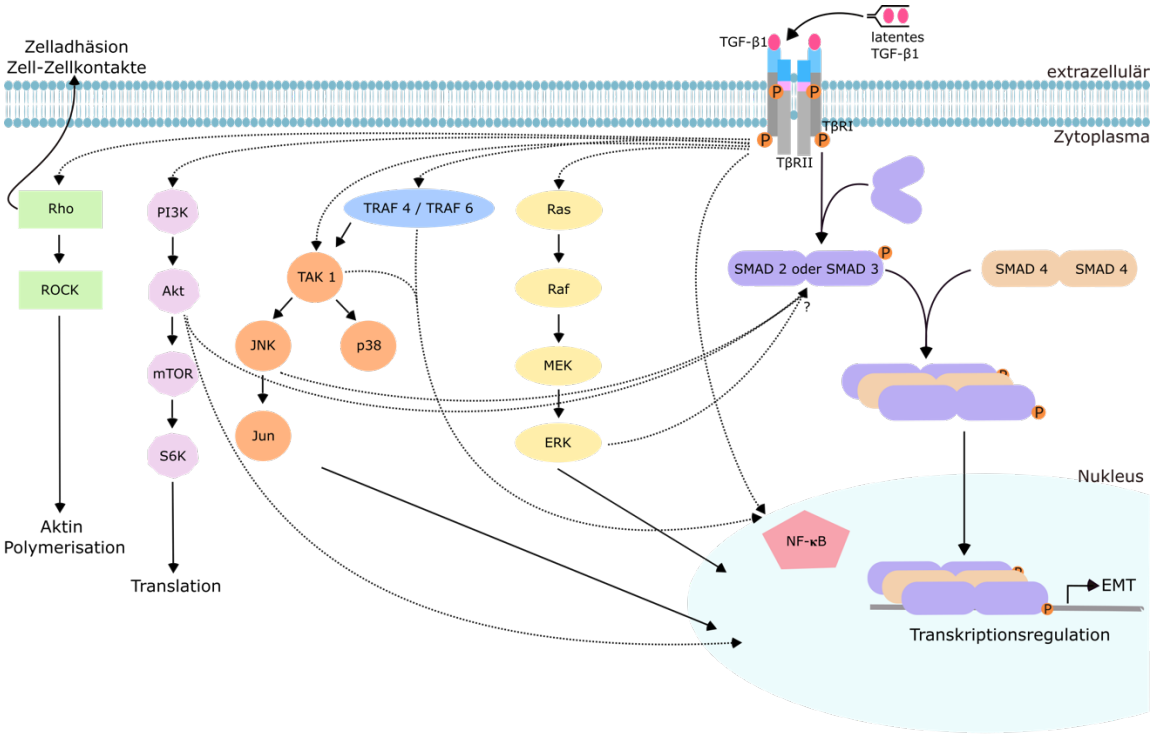


Abbildung 5: Schematische Darstellung der SMAD unabhängigen TGF-β1 Signalwege und ihrer Interaktionen

TGF-β1 und seine Rezeptoren können unabhängig von den SMAD Proteinen eine Reihe von Signalwegen aktivieren und mit diesen interagieren. Hierunter auch der Ras-Raf-Mek-Erk, PI3K-Akt, JNK/p38 MAPK und TNF Signalweg sowie die Rho GTPasen. Weitere Crosstalks mit dem Hedgehog, Notch, WNT und IFN Signalweg sind beschrieben. Erk, JNK und Akt können zudem mit den R-SMAD Proteinen interagieren. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch unbekannt und in dieser Abbildung vereinfacht dargestellt. (Zusammengesetzt und verändert nach Akhurst and Hata, 2012, (mit Genehmigung von Springer Nature, © Springer Nature 2012) und Zhang, 2017 (mit Genehmigung von © Cold Spring Harbor Laboratory 2017. Lizenziert unter CC BY 2.0)).

1.5 Bisheriger Kenntnisstand der Interaktionen zwischen dem TGF-β1 und Ras Signalweg

Die genauen Mechanismen der Synergie zwischen den Ras und TGF-β1 Signalwegen sind nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedene Studien heben eine besondere Rolle von onkogenem Ras in der Tumorgenese und Metastasierung hervor (bspw. (Johnson *et al.*, 2001)). Dabei wird dem Ras-Raf-Mek-Erk Signalweg eine größere Bedeutung als dem PI3K / Akt Signalweg zugeordnet (Lehmann *et al.*, 2000; Janda *et al.*, 2002). Onkogenes Ras kann in vielen Zelltypen selbst keine EMT induzieren, sondern benötigt die gleichzeitige Stimulation mit beispielsweise TGF-β1. Dabei durchlaufen Krebszellen mit aktivem Ras-Signalweg und TGF-β1 Stimulation einen umfassenderen EMT Prozess als nach alleiniger TGF-β1 Stimulation und zeigen einen invasiveren Phänotyp sowie eine ausgeprägtere Metastasierung (Oft *et al.*, 1996;

Lehmann *et al.*, 2000; Ellenrieder *et al.*, 2001; Gotzmann *et al.*, 2002; Janda *et al.*, 2002; Peinado *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2010). Die Synergie beider Signalwege führt nach erfolgter EMT zur autokrinen Sekretion von TGF-β1 und somit zur Aufrechterhaltung der EMT (Lehmann *et al.*, 2000; Gotzmann *et al.*, 2002; Janda *et al.*, 2002).

Der Rezeptor TβRI kann ShcA phosphorylieren. ShcA bildet einen Komplex mit SOS und Grb 2 und verübt so den Austausch von GDP zu GTP im Ras Protein, wodurch der nachfolgende Signalweg aktiviert wird (Lee *et al.*, 2007). Verschiedenen Studien konnten zeigen, dass eine TGF-β Stimulation zu einer gesteigerten Erk Aktivität führt (Ellenrieder *et al.*, 2001; Peinado *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2004; Adachi *et al.*, 2020). Eine anschließende Mek Inhibition hemmt die EMT, sodass geschlussfolgert werden könnte, dass die TGF-β vermittelte Aktivierung des MAPK Signalwegs notwendig für die EMT sei (Ellenrieder *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2004).

Andererseits konnte gezeigt werden, dass ein konstitutiv aktiver Ras Signalweg oder die Stimulation des EGFR zu einer Aktivierung von Erk führt. Aktiviertes Erk kann SMAD 2 und 3 an serinreichen Stellen phosphorylieren. Somit wird die nukleäre Anhäufung der R-SMADs vermindert, was wiederum zur verminderter transkriptionellen Aktivität führt. Diese Beobachtung wurde als möglicher Mechanismus diskutiert, warum Zellen mit onkogenem Ras nicht mehr auf die antiproliferativen Eigenschaften von TGF-β1 ansprechen (Kretzschmar *et al.*, 1999). Auch Oft *et al.* (1998) stellten fest, dass Tumorzellen resistent gegenüber den antiproliferativen Eigenschaften von TGF-β1 werden. Sie zeigten allerdings auf, dass ein ungehinderter Ablauf des TGF-β Signalwegs für die Induktion und die Aufrechterhaltung der Invasivität und Metastasierung notwendig ist (Oft *et al.*, 1998). Hierzu gibt es jedoch eine Reihe widersprüchlicher Ergebnisse und die Mechanismen, wie TGF-β1 seine Funktion von antiproliferativ zu karzinomfördernd verändert, sind nach wie vor unbekannt. Lehmann *et al*. (2000) und Gotzmann *et al.* (2002) konnten keinen Einfluss von Erk auf SMAD Proteine nachweisen. In einer Studie von Oft *et al.* (2002) kam es dagegen durch das Zusammenspiel von Ras und TGF-β1 Signalweg zur verstärkten nukleären Anreicherung von R-SMAD Proteinen, was als Mechanismus zur Induktion und Aufrechterhaltung der EMT diskutiert wurde.

Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass der Ras und der TGF- β1 Signalweg in der Transkription verschiedener Gene synergieren: Beispielsweise konnte in triple negativen Brustkrebszellen gezeigt werden, dass pErk 2 Slug phosphoryliert, welches zur gesteigerten Vimentin Expression führt (Virtakoivu *et al.*, 2015). In verschiedenen Zelltypen, darunter auch Panc-1 und A549 Zellen, konnte nachgewiesen werden, dass Snail nur bei gleichzeitig aktivem TGF-β1 und Ras Signalweg überexprimiert ist (Peinado *et al.*, 2003; Barberà *et al.*, 2004; Horiguchi *et al.*, 2009). Saitho *et al.* (2016) konnten in Panc-1 und HeLa Zellen zeigen, dass die Synergie beider Signalwege auch über die

Aktivierung von STAT 3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 3*) zur verstärkten Snail Expression führen kann. Diese Hinweise waren unter anderem Anstoß für die Durchführung dieser experimentellen Arbeit.
Darüber hinaus übt das Zusammenspiel von TGF-β1 und Ras Signalwegen wichtige Funktionen in der Zellmotilität aus (Bakin *et al.*, 2002, 2004; Safina *et al.*, 2009).
Ein weiterer Ansatz zum Verständnis des Zusammenspiels der beiden Signalwege ist, dass eine TGF-β1 Stimulation zu einer verstärkten Akkumulation von H-Ras und K-Ras an der Plasmamembran führt (Damalas *et al.*, 2022).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Sowohl der konstitutiv aktive Ras Signalweg als auch der TGF-β1 Signalweg sind für die Tumorgenese und Metastasierung des NSCLCs von zentraler Bedeutung und stellen mögliche Angriffspunkte für zielgerichtete Krebstherapien dar. Die genauen Mechanismen ihres Zusammenspiels sind nach wie vor nicht geklärt.
Ziel dieser Arbeit ist es, die Interaktion zwischen dem Ras und TGF-β1 Signalweg in K-Ras^{G12C} mutierten NSCLC Zellen genauer zu untersuchen. Dies erfolgt anhand der Analyse des Einflusses der K-Ras^{G12C} Inhibitoren, AMG 510 oder MRTX 849 sowie TGF-β1 auf EMT Markerproteine, Transkriptionsfaktoren sowie Proteine der Zelladhäsion und -motilität. Mittels quantitativer Bestimmung dieser Proteine sollen Rückschlüsse auf mögliche Interaktionen zwischen dem Ras und TGF-β Signalweg gezogen werden. Hierfür wird die Proteinmenge in Gesamtlysaten sowie in kern- (unlöslichen) und zytosolhaltigen Zellfraktionen mittels Western Blot Analysen untersucht. Zudem wird die Lokalisation der zu analysierenden Proteine in der Zelle mittels Immunzytochemie analysiert.

2 Material

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien, welche nicht in der folgenden Liste aufgezählt werden, wurden in der höchsten erhältlichen Qualität von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Biozym (Hessisch-Oldendorf), Capricorn Scientific (Ebsdorfergrund), Merck Milipore (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva Electrophoresis (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Thermo Fisher Scientific (Dreieich) und VWR (Darmstadt) bezogen.

Acrylamid 30% (Rotiphorese® Gel A)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat 10% (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Aprotinin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Bisacrylamid 2% (Rotiophorese® Gel B)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Briliant Blue R	Merck Milipore, Darmstadt
Deoxycholic acid sodium salt (Na-DOC)	Merck Milipore, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2PO_4)	Merck Milipore, Darmstadt
Dithriothreitol (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO-Invitrogen, Freiburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethylenglycol-bis(aminoethyleter)-N,N,N´,N´-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund Bestellnummer: FBS-16A Lotnummer: V21-4377
GlutaMAX^{TM} Supplement	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck Milipore, Darmstadt
Kupfer-(II)-sulfatlösung 4% ($CuSO_4$)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Leupeptin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
N,N,N´,N´- Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	GIBCO-Invitrogen, Freiburg
Nonidet P-40 (NP40)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

PefaBloc® SD	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
PhosSTOP™	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pierce BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Ponceau-S	AppliChem GmbH, Darmstadt
Sodium dodecylsulfate (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Soybean trypsin inhibitor (STI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SuperSignal® West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
SuperSignal® West Pico PLUS Luminal/Enhancer Solution	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA 0,05%	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.2 Verbrauchsmaterialien

12-Well Platte, Standardqualität	BD Biosciences, Heidelberg
96-Well Mikroplatte, Standardqualität	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Filterspitzen 20 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen 26 G (0,45 x 16 mm)	BD Bioscience, Heidelberg
Objektträger	Brand, Wertheim
Pasteurpipetten	LLG Labware, Meckenheim
Pipettenspitzen 20 µl und 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 1000 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nitrocellulosemembran Protran 0,45 µm	GE Healthcare, Freiburg
Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Steritop Filter Zellkultur	Merck Milipore, Darmstadt
Tuberkulinspritzen 1 ml	BD Bioscience, Heidelberg
Whatman Chromatographie Papier	GE Healthcare, Freiburg
Zellkulturflaschen T-75, Standardqualität	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte 6-Well, Standardqualität	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen 6 cm und 10 cm, Standardqualität	Sarstedt, Nümbrecht

Zellschaber 2,5 cm und 1,35 cm	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Inhibitoren, Stimulatoren und Lösungsmittel

AMG 510 *Stammlösung 10 mM in DMSO*	MedChemExpress; Monmouth Junction, NJ, USA
Zitronensäure-Monohydrat (Zitrat) *Stammlösung 10 mM in dd H_2O*	Merck Milipore, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
MRTX 849 *Stammlösung 1 mM in DMSO*	MedCemExpress; Monmouth Junction, NJ, USA
TGF-β1 *Stammlösung 10 mM in Zitrat (10mM)*	PeproTech; Rocky Hill, NJ, USA

2.4 Primäre Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden einzeln oder in Kombination miteinander für den Western Blot in einer Lösung aus 3 % BSA in TBS/T verdünnt.
Für die Immunzytochemie wurden die primären Antikörper in einer Lösung mit 0,2 % BSA in TBS verdünnt.

Tabelle 1: Primäre Antikörper für Western Blot und Immunzytochemie

mAb: monoklonaler Antikörper; pAb: polyklonaler Antikörper

Antigen (Klon)	**Verdünnung WB / IF**	**Spezies, Klonalität**	**Bezugsquelle**	**Bestell-nummer**	**Größe in kDa**
β-Aktin (AC-15)	WB 1: 5.000	Maus, mAb	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	A-5441	42
β-Aktin	WB 1:10.000	Kaninchen, pAb	GeneTex; Biozol, Hamburg	GTX109639	42
ATF 2 (D4L2X)	WB 1:1.000	Kaninchen, mAb	Cell Signaling Technolgy; Leiden, Niederlande	#35031S	70
E-Cadherin	WB 1: 4.000 IF 1:200	Maus	BD Bioscience, Heidelberg	610182	120
E-Cadherin (24E10)	WB 1:7.000	Kaninchen, mAb	Cell Signaling Technolgy; Leiden, Niederlande	#3195S	120

β-Catenin	WB 1:2.000 IF 1:100	Maus, mAb	BD Bioscience, Heidelberg	610154	94
β-Catenin	WB 1:5.000	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	C2206	94
γ-Catenin	WB 1: 4.000	Maus	BD Bioscience, Heidelberg	610253	86
Erk p42/44	WB 1:2.000 IF 1:100	Maus	Cell Signaling Technolgy; Leiden, Niederlande	#4696	Erk 1 44 kDa Erk 2 42 kDa
Phospho Erk p42/44	WB 1:2.000	Kaninchen	New England Biolabs, Frankfurt am Main	#4370	s. oben
ESRP 1	WB 1:1.000	Kaninchen, pAb	Thermo Fisher Scientific, Dreieich	PA5-25833	68
ESRP 2	WB 1:1.000	Kaninchen	Invitrogen; Freiburg	PA5-21110	77
Foxo3a	WB 1:1.000	Kaninchen, mAB	Cell Signaling Technolgy; Leiden, Niederlande	#2497	82-97
Lamin A / C	WB 1:1.000	Kaninchen	Cell Signaling Technolgy; Leiden, Niederlande	#2032	70
Slug (C19G7)	WB 1:1.000 IF 1:200	Kaninchen, mAb	Cell Signaling Technolgy; Leiden, Niederlande	#9585	30
SMAD 2 / 3	WB 1:4.000	Maus	BD Transduction Laboratories; Heidelberg	610842	52/48
SMAD 4 (3E2)	WB 1:1.000	Maus, mAb	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	01404038	60
SMAD 4	WB 1:2.000	Kaninchen	GeneTex; Biozol, Hamburg	GTX112980	60
Snail (C15D3)	WB 1:1.000 IF 1:100	Kaninchen, mAb	Cell Signaling Technolgy; Leiden, Niederlande	3879S	30

STAT 3	WB 1:2.000	Maus	BD Bioscience, Heidelberg	610189	79, 86
STAT 3 (D3Z2G)	WB 1:2.000	Kaninchen, mAb	Cell Signaling Technolgy; Leiden, Niederlande	12640	79, 86
Vimentin	WB 1:1.000 IF 1:100	Maus, mAb	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	V-6630	53-67
Vimentin (D21H3)	WB 1:3000 IF 1:100	Kaninchen, mAB	Cell Signaling Technolgy; Leiden, Niederlande	#5741	57
Vinculin	IF 1:400	Maus, mAb	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	V-9131	116
ZEB 1	WB 1:1.000	Kaninchen, pAb	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	HPA027524	130

Die Angaben des Molekulargewichts der Antigene sind aus den Datenblättern der jeweiligen Antikörper entnommen und beziehen sich auf das spezifische Gewicht der untersuchten Proteine.

2.5 Sekundäre Antikörper

Für den Western Blot wurden die Antikörper aus Tabelle 2 in einer Lösung aus 3 % BSA in TBS/T verdünnt. Für die Immunzytochemie wurden die Antikörper, Sonden und Farbstoffe in Tabelle 3 und 4 in einer Lösung aus 0,2 % BSA in TBS verdünnt.

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper für den Western Blot

Antikörper	**Wirkprinzip**	**Verdünnung**	**Spezies**	**Bezugsquelle**	**Bestell-nummer**
Anti-Maus IRDye 680LT	Infrarot-Fluoreszenz	1:120.000	Ziege	LI-COR Biosciences, Bad Homburg von der Höhe	92668021
Anti-Kaninchen IRDye 800CW	Infrarot-Fluoreszenz	1:120.000	Ziege	LI-COR Biosciences, Bad Homburg von der Höhe	92632211
anti-Maus IgG	HRP-gekoppelt	1:5.000	Ziege	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	A-4416
anti-Kaninchen IgG	HRP-gekoppelt	1:5.000	Ziege	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	A-6154

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper für die Immunzytochemie

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Bezugsquelle	Bestellnummer
Anti-Maus IgG Cy3	1:1.000	Ziege	Dianova, Hamburg	115-165-003
Anti- Kaninchen Alexa 488	1:1.000	Ziege	Molecular Probes; Eugene, OR, USA	A-11008

2.6 Fluoreszenzmarkierte Sonden und fluoreszierende Farbstoffe

Tabelle 4: Sonden und Farbstoffe für die Immunzytochemie

Sonde / Farbstoff	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestellnummer
Texas Red™ -X Phalloidin	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Dreieich	T7471
Alexa Fluor™ 488 Phalloidin	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Dreieich	A12379
Dapi (4´, 6-Diamindin-2-phenylindol)	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Dreieich	D1306

2.7 Marker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Page Ruler Prestained Protein Ladder — Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Bestellnummer: 26617

Molekulargewicht der Banden in kDa: 180, 130, 96, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 10

2.8 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 5: Verwendete eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Herkunftsgewebe	Anbieter	Bestellnummer
HCC-44	NSCLC, Adenokarzinom	DSMZ	ACC 534
NCI-H23	NSCLC, Adenokarzinom	ATCC	CRL 5800
NCI-H358	NSCLC, Bronchioalveoläres Karzinom	ATCC	CRL 5807
NCI-H1299	NSCLC, großzelliges Karzinom	ATCC	CRL 5803

Die Zelllinien H23 und H358 zeigen eine epitheliale Morphologie und weisen eine heterozygote, aktivierende Punktmutation des *KRAS* Gens im Codon 12 mit einem Austausch der Aminosäuren Glycin gegen Cystein auf (K-Ras^{G12C} Mutation). Die Zelllinie

HCC44 weist dieselbe Punktmutation homozygot auf und hat ebenfalls eine epitheliale Morphologie. Die Karzinomzelllinie H358 exprimiert zudem kein p53. Alle Zelllinien stammen von Gewebeproben aus einem Primärtumor.
Die Zelllinie H1299 hat ebenfalls eine epitheliale Morphologie und wurde aus einer Lymphknotenmetastase eines großzelligen Karzinoms gewonnen. Die H1299 Zellen weisen eine homozygote p53 Deletion auf.
Die Angaben über die Zelltypen sowie über deren genetische Eigenschaften und Herkunft wurde den offiziellen Angaben der ATCC (*American Type Culture Collection* (Manassas, VA USA)) und DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig)) entnommen.

2.9 Geräte

Absaugsystem Fast Biotec Topstream	FastBiotec, Frankfurt
Absorptionsreader ELx800	BioTek, Bad Friedrichshall
Page-Kammer	C.B.S. Scientific Co., CA, USA
Blotkammer	
Agarose Elektrophoresekammer	SERVA Elektrophoresis GmBH, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop IX81	OLYMPUS, Hamburg
Fusion-SL 35000. WL	Vilber Lourmat, Eberhardzell
HERACELL 150i CO_2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Heraeus Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Lichtmikroskop AxioVert 25	Zeiss, Oberkochen
Lichtmikroskop PrimoVert	Zeiss, Oberkochen
LICOR Odyssey Sa + CLX	LI-COR Bioscience, Bad Homburg von der Höhe
Magnetrührer MR Hei-Mix S	Heidolph Instruments, Schwabach
Magnetrüher RCT basic	IKA, Staufen
PAULA cell imager	Leica Microsystems, Wetzlar
Pipetboy IBS acu 2	Integra Biosciences, Biebertal
Pipetten Pipett Man 1000 µl, 200 µl, 20 µl	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipette Transferpette 10 µl	Brand, Wertheim
pH Messgerät (Standard) five easy	Mettler Toledo, Gießen
Sicherheitswerkbank Labgard	ibs technomara, Fernwald
Spannungsgeräte Consort E342/E245/ E424 / E252	Consort, Turnhout, Belgien

Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Wasseraufbereitungssystem Barnstead GenPure	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Waage Sartorius 1264 MP	Sartorius Lab Instruments, Göttingen
Waage (fein) Sartorius A200S	Sartorius Lab Instruments, Göttingen
Vortexer Heidolph REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach

2.10 Software

AnalySIS 3.2	Soft Imaging System, Münster
cellSens Dimension 1.6	OLYMPUS - SIS, Münster
Fusion Molecular Imaging Version	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Gene5 2.00	BioTek, Bad Friedrichshall
GraphPad Prism 9.1.1 für macOS 8.4.3 für Windows	GraphPad Software LLC, San Diego, CA, USA
Image Studio Version 5.2	LICOR, Bad Homburg von der Höhe
Inkscape Version 1.3.2	Inkscape Community, Boston, MA, USA
Microsoft Excel 2019 für macOS 2016 für Windows	Microsoft, Redmond, WA, USA
Microsoft Power Point 2019 für macOS 2016 für Windows	Microsoft, Redmond, WA, USA
Microsoft Word 2019 für macOS 2016 für Windows	Microsoft, Redmond, WA, USA
MP Navigator EX Canon Scan 8800F	Canon Deutschland, Krefeld
PAULA cell imager	Leica Microsystems, Wetzlar
Zotero 7.0.30	Coporation for Digital Scholarship, Vienna, VA ,USA

3 Methoden

Alle verwendeten Methoden wurden nach der Laboranleitung „Grundlegende Methoden der Proteincharakterisierung“ der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Menke durchgeführt. Die dazu benötigten Lösungen und Puffer wurden nach diesem Protokoll in ultrareinem Wasser angesetzt.

3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Um optimale Wachstumsbedingungen herzustellen, wurden die adhärent wachsenden Zellen in CO_2-Inkubatoren bei 37 ºC, 10 % CO_2 und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zudem erfolgte alle zwei bis drei Tage ein Wechsel des Wachstumsmediums. Alternativ wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80 - 100 % auf neue Zellkulturschalen verteilt, wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Die Konfluenz beschreibt den Prozentsatz der von Zellen bedeckten Fläche der Zellkulturschale. Die Arbeiten mit den Zellen wurden zur Gewährleistung der Sterilität in Sicherheitswerkbanken mit laminarer Strömung durchgeführt. Zuvor erfolgte die Desinfektion mit 70-prozentigem Ethanol.

Wachstumsmedium *Dulbecco´s Modified Eagle Medium* (DMEM)
10 % (V/V) Fetales Kälberserum (FCS)
1 % (V/V) L-Glutamin (100x)
1 % (V/V) nicht-essentielle Aminosäuren (100x)

Vor der Verwendung wurde diese Lösung mit dem Steritop Filter (Merck Milipore, Darmstadt) steril filtriert, sowie vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 ºC erwärmt.

3.2 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden in 10 cm Schalen oder T-75 Flaschen herangezogen bis sie konfluent waren. Anschließend wurden sie für die Experimente verwendet oder zum Weiterziehen passagiert. Diese Arbeitsschritte fanden ebenfalls unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Strömung statt.
Bei einer Konfluenz von 80 - 100 % wurden die Zellen von ihrer alten Schale abgelöst und in neue Schalen verteilt. Hierzu wurde zunächst das alte Wachstumsmedium abgesaugt und die verbleibenden Reste des Mediums durch das Waschen mit 10 ml 1x CMF-PBS entfernt.

CMF-PBS (1x) 140 mM NaCl
2,7 mM KCl
8 mM Na_2PO_4

1,5 mM KH_2PO_4
pH 7,4

Anschließend wurde das CMF-PBS abgesaugt und 3 - 5 ml Trypsin-EDTA (0,05 %) auf den Zellrasen gegeben, um die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte zu lösen. Um die Trypsinreaktion zu beschleunigen, wurde die Schale für 5 bis 10 min, je nach Zelllinie und Konfluenz, erneut in den Inkubator gestellt. Die Ablösung wurde durch sanftes Klopfen und Schütteln unterstützt und anschließend unter dem Lichtmikroskop überprüft. Danach wurden 5 ml Wachstumsmedium hinzugegeben, um die enzymatische Trypsinreaktion zu beenden. Das Zellgemisch wurde in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt. Es erfolgte die Zentrifugation bei 1000 rcf (*relative centrifugal force*) für 3 min. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und das verbleibende Sediment in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Nun konnten die Zellen in der gewünschten Menge auf die neuen Schalen verteilt werden, in denen zuvor Wachstumsmedium vorgelegt worden war (s. Tabelle 6 und 7). Durch kreuzförmiges Schwenken der Schale wurden die Zellen auf der gesamten Fläche gleichmäßig verteilt.

Tabelle 6: Volumenmenge und Wachstumsfläche pro Schale / Well / Flasche

	Wachstumsfläche	**Volumenmenge**
6-er Well	9,5 cm^2	2 ml
10 cm Schale	58 cm^2	10 ml
6 cm Schale	21 cm^2	3 ml
T-75 Flasche	75 cm^2	10 ml

3.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl dient dazu, alle Zellkulturschalen mit derselben Zellzahl zu versehen und somit die Vergleichbarkeit der Versuche sicherzustellen. Dazu wurde ein geschliffenes Deckglas auf die leicht angefeuchteten Auflagebalken der Neubauer-Zählkammer (Laboroptik, Lancing, UK) gelegt und 10 µl der frisch resuspendierten Zelllösung zwischen die beiden Glasplatten gegeben. Die Zählkammer ist durch Gitternetzlinien in fünf große Quadrate mit einer Fläche von 1 mm^2 und einem Volumen von 1 mm^3 eingeteilt. Mit Hilfe des Mikroskops wurde die Zellzahl in mindestens drei der fünf großen Quadrate ausgezählt und deren Mittelwert berechnet. Multipliziert man diesen mit 10^4, erhält man die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension.

Tabelle 7: Zellzahl pro Schale

Schale / Well	Zelllinie	Zellzahl
10 cm	H23	3×10^6
	HCC44	$0{,}75 \times 10^6$
	H358	3×10^6
6 cm	HCC44	$0{,}7 \times 10^6$
	H358	$1{,}6 \times 10^6$
6-er Well	HCC44	2×10^4
	H358	3×10^4

3.4 Inhibition / Stimulation der Zellen

Für die 48 h und 72 h Inhibition wurden die Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von 70 % inhibiert. Für die 24 h Inhibition wurde das Erreichen einer Konfluenz von 90 % abgewartet. Für die Immunzytochemie war eine Konfluenz von 20 - 30 % ausreichend. Die Inhibition / Stimulation erfolgte nach einem Wechsel des Wachstumsmediums mit in Tabelle 8 aufgelisteten Konzentrationen. Durch kreuzweise verlaufende Schwenkbewegungen wurde der Inhibitor / Stimulator im Nährmedium der Schale verteilt.

Tabelle 8: Verwendete Konzentration von Inhibitoren und Stimulanzien

Inhibitor/ Stimulator/ Kontrollreagenz	Verwendete Konzentrationen
DMSO in ddH_2O	10 nM
Zitrat in ddH_2O	10 ng/ml
AMG 510 in DMSO	10 nM
MRTX 849 in DMSO	10 nM
TGF-β1 in Zitrat	10 ng/ml

3.5 Herstellung von Zelllysaten

Die Herstellung aller Lysate erfolgte stets auf Eis, um Temperaturen von 4 ºC zu erreichen und so der Degradation der Proteine entgegenzuwirken. Hierzu wurden gekühlte Puffer verwendet und die Reaktionsgefäße vor Verwendung auf Eis gekühlt.

3.5.1 Kern-Zytosolpräparation, modifiziert nach Andrews und Faller (1991)

Zunächst wurden die Zellkulturschalen auf Eis gestellt und das Nährmedium abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend kurz mit 5 ml kaltem 1x CMF-PBS gewaschen. Dann wurden 250 µl Lysispuffer (s. unten) mit Protease-Inhibitor-Mix (PI-Mix) (s. unten) und ggf. auch mit dem Phosphotase-Inhibitor PhosSTOP™ versetzt und pro 10 cm Schale

auf den Zellrasen gegeben. PhosSTOP™ wurde verwendet, wenn Phospho-Erk angefärbt werden sollte, um die in der Zelle vorhandenen Phosphatasen zu inhibieren und eine Dephosphorylierung der Erk Proteine zu vermeiden. Der PI-Mix wurde hinzugegeben, um den Abbau der Proteine durch die zelleigenen Proteasen zu verhindern. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von den Zellkulturschalen gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde für 5 min auf Eis gelagert, dann für 5 sec intensiv geschüttelt und dann erneut für 5 min auf Eis gelagert, um die Zellmembranen aufzubrechen. Anschließend wurde die Zelllösung für 10 sec intensiv geschüttelt und dann für 10 sec bei 13.000 rpm (*rounds per minute*) und 4 ºC zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und als zytosolhaltige Fraktion (im Folgenden kurz Zyotsolfraktion) verwendet. Das verbleibende Zellsediment wurde mit 100 µl Hochsalzpuffer (s. unten) sowie PI-Mix und ggf. auch mit PhosSTOP™ resuspendiert. Zunächst zweimal mit der 200 µl Pipette. Nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis wurde die Zelllösung zehnmal mit der Tuberkulinspritze und einer 26 G Kanüle homogenisiert, um die Kernmembran aufzubrechen. Anschließend wurde die Zelllösung erneut für 7 min auf Eis gelagert und dann für 10 min bei 4 ºC und 13.000 rpm zentrifugiert. Der im Anschluss abgenommene Überstand war die kernhaltige Fraktion (im Folgenden kurz Kernfraktion) (modifiziert nach Andrews and Faller, 1991).
In manchen Lysaten wurde der Hochsalzpuffer durch 1x RIPA Puffer (s. unten) ersetzt, da dieser mehr Detergenzien enthält. Diese führte jedoch zu einer erhöhten Degradation der Proteine der Kernfraktion und wurde daher nicht weitergeführt.
Durch die oben beschriebene Methode kann eine strikte Trennung in eine, wie hier vereinfacht genannt, Zytosol- und Kernfraktion nicht erreicht werden. Vielmehr handelt es sich hierbei um eine lösliche (hier: Zytosol-) und partikuläre (hier: Kern-) Fraktion. Aus diesem Grund können sich Proteine des Zytoplasmas oder der Zellmembran in der sog. Kernfraktion befinden.

Proteaseinhibitor-Mix (PI-Mix) (100x)

100 mM Pefabloc
250 µM STI
100 µM Aprotinin
200 µM Leupeptin
in 10 mM Tris, pH 7,2, Einsatz 1:100

Lysispuffer (1x) 10 mM TrisHCl pH 7,9
1,5 mM $MgCl_2$
10 mM KCl

0,5 mM DTT

Hochsalzpuffer (1x) 20 mM Tris pH 7,5
420 mM NaCl
10 mM KCl
0,2 mM EDTA
0,5 mM DTT

3.5.2 Herstellung von RIPA-/NOP-Gesamtlysaten

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml kaltem 1x CMF-PBS gewaschen. Für die 10 cm Schalen wurden 500 µl 1x RIPA oder 1x NOP Puffer verwendet. Für die 6 cm Schalen je nach Konfluenz 100 - 120 µl. Die Puffer wurden als zweifache Stammlösung angesetzt und wurden zunächst 1:1 mit Milli Q Wasser verdünnt sowie mit PI-Mix und ggf. PhosSTOP™ versetzt. Der Puffer wurde auf die Zellen gegeben und diese mittels eines Zellschabers abgelöst, sowie in ein Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte die zehnmalige Homogenisierung mit der Tuberkulinspritze und der 26 G Kanüle. Anschließend wurde die Lösung 10 min bei 4 ºC und 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand, das Gesamtzelllysat, abgenommen.

RIPA-Puffer (1x) 50 mM Tris-HCl
150 mM NaCl
1 % Triton X-100
0,5 % Na-DOC
0,1 % SDS
pH 7,2

NOP-Puffer (1x) 10 mM Tris-HCl, pH 7,4
150 mM NaCl
1 % NP40
0,5 % Trition-X-100
2 mM EDTA
2 mM EGTA

3.6 Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure-*Assay*

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in der Probe wurde der Bicinchoninsäure-*Assay* genutzt. Dieser basiert auf der Reduktion von zweiwertigen zu einwertigen Kupferionen durch die in Lösung befindlichen Proteine. Die einwertigen Kupferionen

reagieren mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA), was einen Farbumschlag von grün zu verschiedenen Violetttönen bewirkt. Dabei ist die Intensität der Violettfärbung abhängig von der Proteinmenge: Je dunkler der Violettton, desto höher ist die Proteinmenge in der Probe. Aufgrund des nahezu linearen Zusammenhangs zwischen Proteinmenge und Farbintensität kann die Absorption bei 562 nm photometrisch gemessen werden und durch Vergleich mit einer Standardproteinlösung die Proteinmenge bestimmt werden (Smith *et al.*, 1985).

Dazu pipettierte man zunächst die in Tabelle 9 gezeigte Konzentrationsreihe in eine 96-Well-Platte. Für die BSA Lösung wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml in Wasser verwendet. Anschließend wurden 20 µl der zu analysierenden Probe aufgetragen, die zuvor 1:10 in ultrareinem Wasser verdünnt wurde. Proben, bei denen eine geringe Proteinmenge erwartet wurde, wie beispielsweise in den Kernfraktionen, wurde im Verhältnis 1:5 verdünnt, um ein genaueres Ergebnis zu erhalten. Die Proben wurden stets als Doppelbestimmungen aufgetragen.

Zu den 20 µl Proteinlösung kamen pro Well 180 µl Färbelösung hinzu. Diese besteht aus Pierce BCA Protein *Assay* Reagent A und 4-prozentiger Kupfer(II)-Sulfat-Lösung im Verhältnis 50:1. Anschließend erfolgte die Inkubation der Well Platte für 25 - 30 min bei 37 ºC, um den Farbumschlag zu beschleunigen. Die Absorption wurde mit dem Absorptions-Reader ELx800 gemessen.

Tabelle 9: Konzentrationsreihe für die Eichgerade des BCA-*Assays*

	1	2	3	4	5	6	7
A	20 µl H_2O	18 µl H_2O + 2 µl BSA	16 µl H_2O + 4 µl BSA	14 µl H_2O + 6 µl BSA	12 µl H_2O + 8 µl BSA	10 µl H_2O + 10 µl BSA	7,5 µl H_2O + 12,5 µl BSA
B	20 µl H_2O	18 µl H_2O + 2 µl BSA	16 µl H_2O + 4 µl BSA	14 µl H_2O + 6 µl BSA	12 µl H_2O + 8 µl BSA	10 µl H_2O + 10 µl BSA	7,5 µl H_2O + 12,5 µl BSA

3.7 SDS Page (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient dazu, Proteine ungeachtet ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur allein nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen (Laemmli, 1970). SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Tensid, das durch seine Bindung die Eigenladung von Proteinen überdeckt und zu einer negativen Oberflächenladung führt. Die Menge des gebundenen SDS und damit die Ladung des Proteins ist proportional zu dessen Masse (ca. 1,4 g SDS pro 1 g Protein) (Smith, 1994). Für die Gelelektrophorese wurden Trenngele mit unterschiedlichem Acrylamidgehalt

gegossen, die für verschiedene Proteingrößen einen optimalen Trennbereich aufweisen (Shapiro *et al.*, 1967). Acrylamid und Bisacrylamid bilden ein quervernetztes Maschenwerk, durch das die negativ geladenen Proteine entlang des angelegten Spannungsfeldes von der Kathode zur Anode wandern (Smith, 1994). Dabei gilt: Gele mit hohen Acrylamidkonzentrationen haben für kleine Proteine und Gele mit niedrigen Acrylamidkonzentrationen für große Proteine den optimalen Trennbereich (s. Tabelle 10). Allgemein gilt auch: Kleine Proteine wandern im Spannungsfeld schneller als große Proteine (Shapiro *et al.*, 1967). Um die Größe der Proteine zu überprüfen, wird neben den Proben ein Molekulargewichtsgrößenmarker aufgetragen (meist ein FE-Marker, s. Kapitel 2.6).

Tabelle 10: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen in verschiedenen Konzentrationen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

	Trenngel						Sammelgel
	8,5 %		10 %		12,5 %		
	2 Gele	Gelgieß-ständer	2 Gele	Gelgieß-ständer	2 Gele	Gelgieß-ständer	2 Gele
30 % Acrylamid	2,3 ml	11,5 ml	2,6 ml	13 ml	3,25 ml	16,25 ml	0,38 ml
2 % Bisacrylamid	0,9 ml	4,7 ml	1 ml	5 ml	1,2 ml	6 ml	0,15 ml
3 M Tris pH 8,8	1 ml	5 ml	1 ml	5 ml	1 ml	5 ml	
1 M Tris pH 6,8							0,38 ml
10 % SDS	0,08 ml	0,4 ml	0,08 ml	0,4 ml	0,08 ml	0,4 ml	0,03 ml
60 % Saccharose							0,75 ml
dd H_2O	3,6 ml	18,5 ml	3,2 ml	16,5 ml	2,45 ml	12,25 ml	1,3 ml
TEMED	8 µl	40 µl	8 µl	40 µl	8 µl	40 µl	4 µl
10 % APS	50 µl	250 µl	50 µl	250 µl	50 µl	250 µl	40 µl
Trennbereich	150 - 50 kDa		130 - 30 kDa		100 - 10 kDa		

Das Trenngel wurde meist am Vortag zwischen gereinigte Glasplatten gegossen und für 30 min mit 1:5 H_2O gesättigtem Isobutanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu schaffen. Anschließend wurde dies mit voll entsalztem Wasser ausgewaschen und mit Wasser oder SDS-Laufpuffer überschichtet. Anschließend wurde es über Nacht zur vollständigen Polymerisation in den Kühlschrank gelegt. Im Kühlschrank waren die Gele

bis zu vier Tage verwendbar. Wenn das Gel am selben Tag benötigt wurde, konnte die Polymerisation auch für 2 - 3 h bei 37 ºC im Inkubator erfolgen.
Am Tag des Versuchs wurde das Sammelgel gegossen, in welches Kämme mit unterschiedlichen Anzahlen von Taschen (meist 10 - 16) gesteckt wurden. Nach einer Polymerisationsdauer von 20 min konnte der Kamm entfernt und das Gel in die Gelkammer eingespannt werden. Die Kammer wurde mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt. Dabei war darauf zu achten, dass das Gel vollständig mit Laufpuffer bedeckt war, um den Stromfluss zu gewährleisten. Die Taschen des Gels wurden unter Zuhilfenahme einer Spritze und Kanüle von Acrylamidresten sowie Luftblasen befreit.

SDS-Laufpuffer (1x) 50 mM Tris
500 mM Glycin
0,1 % (M/V) SDS

Es wurden 30 - 75 µg der Proteinprobe mit SDS Probenpuffer versehen, um die Probe zu beschweren. Die Menge des SDS-Probenpuffers sollte mindestens ein Viertel der Proteinprobenmenge betragen. Die Probe mit dem SDS Puffer wurde in einem Heizblock mit 95 ºC für 5 min erhitzt, um die Proteine zu denaturieren und diese ungeachtet ihrer Sekundärstruktur allein nach ihrem Molekulargewicht auftrennen zu können. Anschließend wurden die Proben mit einer 50 µl Hamiltonspritze (Hamilton; Bonaduz, Schweiz) in die Taschen des Sammelgels gegeben. Nun wurde das Spannungsfeld angelegt: Zunächst wandern die Proteine vom Sammelgel in das Trenngel bei einer Spannung von 80 V für 15 min. Danach wurden die Proteine ihrer Größe nach bei 110 V aufgetrennt, bis die Lauffront in den Laufpuffer austrat. Dies dauerte je nach Acrylamidgehalt ein bis zwei Stunden.

SDS Probenpuffer (5x) 0,2 M Tris
1 M Saccharose
5 mM EDTA
1 mM DTT
2 % (M/V) SDS
0,1 % (M/V) Bromphenolblau
pH 8,8

3.8 Immunoblotting

Nachdem die Lauffront das Gel verlassen hatte, wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Towbin *et al.*, 1979). Dieses Verfahren wird als

Western Blot bezeichnet (Burnette, 1981). Hierzu wurde das Tank-Blot-Verfahren angewendet. In der Vorbereitung wurden die Schwammtücher sowie das Gel, welches aus den Glasplatten genommen wurde, in Transferpuffer getränkt. Die Nitrocellulosemembran wurde zuvor in ultrareines Wasser gelegt.

Transferpuffer 25 mM Tris
1,5 % (M/V) Glycin
0,1 % (M/V) SDS
20 % (V/V) Methanol
Der Transferpuffer wurde drei- bis fünfmal wiederverwendet.

Der Aufbau des Tankblot erfolgte wie folgt: Die Schwammtücher wurden auf die Kunststoffgitter gelegt, sodass sie den Blot von beiden Seiten umschlossen. Von der Anode zur Kathode erfolgte die Anordnung eines mit Transferpuffer benetzten Whatman Papiers, einer Nitrocellulosemembran, des Gels sowie eines weiteren feuchten Whatman Papiers. Um einen optimalen Transfer zu gewährleisten, war darauf zu achten, dass keine Luftblasen eingeschlossen wurden und die Nitrocellulosemembran stets anodenseitig vor dem Gel lag. Anschließend wurden die Kunststoffgitter aufeinandergepresst und in die Elektrophoresekammer eingehängt. Diese wurde mit Transferpuffer gefüllt. Die Kammer wurde in den Kühlraum mit 4 ºC auf einen Magnetrührer gestellt, sodass unter stetigem Rühren geblottet werden konnte. Die Kühlung verhinderte eine übermäßige Wärmeentstehung durch den Stromfluss, schützte die Proteine so vor der Degradation und verhinderte die übermäßige Verdampfung des Methanols.
Die Blottingdauer richtete sich nach dem Acrylamidgehalt des Gels (s. Tabelle 11).
Durch das angelegte Spannungsfeld wandern die negativ geladenen Proteine vom Gel in Richtung der Anode auf die Nitrocellulosemembran (Towbin *et al.*, 1979).

Tabelle 11: Dauer des Blottingvorgangs und Stärke der angelegten Spannung in Abhängigkeit des verwendeten Gels

Acrylamidgehalt des Gels	**Blottingdauer**	**Angelegte Spannung**
8,5 %	2:37 h	60 V
10 %	3:00 h	60 V
	10:00 h	20 V
12,5 %	11:00 h	20 V

3.9 Blot- und Gelfärbungen

Die Coomassie Färbung dient dazu Proteine in einem Acrylamidgel anzufärben (Meyer and Lamberts, 1965), wohingegen die Ponceau-S-Färbung dazu dient, die Proteine auf der Nitrocellulosemembran darzustellen. Mit beiden Färbungen kann der Erfolg des Transfers überprüft werden. Mit der Ponceau-S-Färbung kann zusätzlich die Effizienz des Blottingsvorgangs kontrolliert werden (Salinovich and Montelaro, 1986).

3.9.1 Coomassie Färbung

Nach dem Transfer wurde die Coomassie Färbung genutzt, um zu überprüfen, ob die Blottingdauer für den Acrylamidgehalt des Gels optimal war und alle Proteine auf die Nitrocellulosemembran transferiert wurden. Coomassie Blau ist ein Farbstoff, der an basische Aminosäuren bindet (Congdon *et al.*, 1993). Hierfür wurde das Gel in die Coomassie-Färbelösung gegeben und bei Raumtemperatur für mindestens sechs Stunden auf dem Wippschüttler inkubiert. Anschließend wurde das Gel in die Coomassie-Entfärbelösung gegeben, bis nur noch die Proteinbanden blau erscheinen. Dieser Prozess kann mehrere Stunden dauern. Bei optimaler Blottingdauer sind keine Banden im Gel mehr zu erkennen.

Coomassie-Färbelösung 0,025 % (M/V) Coomassie Briliant Blue R
10 % (V/V) Essigsäure
25 % (V/V) Isopropanol

Coomassie-Entfärbelösung 10 % (V/V) Essigsäure
12,5 % (V/V) Isopropanol

3.9.2 Ponceau-S-Färbung

Für die Ponceau-S-Färbung wurde die Nitrocellulosemembran zunächst aus dem Tank-Blot genommen und das daran haftende Methanol mit ultrareinem Wasser abgewaschen. Anschließend wurde die Membran für wenige Minuten in die Ponceau-S-Färbung gelegt. Ponceau-S ist ein roter Bisazol- und Säurefarbstoff, der reversibel an positiv geladene Aminogruppen der Proteine bindet und diese so sichtbar macht (Sander *et al.*, 2019). Danach wurde die gefärbte Membran für wenige Minuten in ultrareines Wasser gelegt, um so den Hintergrund zu entfärben (Salinovich and Montelaro, 1986). Nun wurde die Membran gescannt und die Molekulargewichtsstandards mit Bleistift nachgezeichnet. Zur vollständigen Entfärbung wurde die Membran in 1x TBS/T gelegt.

Ponceau-S-Färbung 0,2 % (M/V) Ponceau-S
3 % (M/V) Trichloressigsäure (TCA)

TBS / T (1x) 10 mM Tris
150 mM NaCl
0,1 % (V/V) Tween 20
pH 7,4

3.10 Immundetektion durch spezifische Antikörper

Vor der Immundetektion der Proteine musste die Nitrocellulosemembran zunächst geblockt werden, um unspezifische Adhäsionen zu vermeiden. Dazu wurde eine Lösung mit 5 % Milchpulver (Johnson *et al.*, 1984) in 1x TBS/T angesetzt und diese für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Blot gegeben. Im Anschluss wurde die Milchpulverlösung abgenommen und die Reste mit 1x TBS abgewaschen. Nun wurden die primären Antikörper (s. Tabelle 1) in einer dreiprozentigen BSA-Lösung in 1x TBS/T auf den Blot gegeben. Der Blot mit der Antikörperlösung verblieb über Nacht bei 4 ºC auf dem Wippschüttler. Am nächsten Tag konnte die Antikörperlösung von dem Blot abgenommen werden, der anschließend dreimal für 5 min auf dem Wippschüttler gewaschen wurde. Der erste und zweite Waschschritt wurde mit 1x TBS/T durchgeführt, der dritte mit 1x TBS. Diese Waschschritte dienten dazu nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der Blot für 1 h mit einem sekundären Antikörper (s. Tabelle 2) inkubiert, der ebenfalls in einer dreiprozentigen BSA in 1x TBS/T Lösung gelöst war. Der Zweitantikörper richtet sich gegen den Erstantikörper und ist entweder HRP (*horseradish peroxidase)* - oder fluoreszenzgekoppelt (Towbin *et al.*, 1979). Nach der Stunde Inkubationszeit erfolgten die drei oben genannten Waschschritte. Mithilfe des Zweitantikörpers konnten Proteine sichtbar gemacht werden, indem dessen spezifische Eigenschaften (HRP- oder Fluoreszenzkopplung) genutzt wurden (s. unten).

TBS (1x) 10 mM Tris
150 mM NaCl
pH 7,4

3.10.1 Immundetektion mittels Nah-Infrarot-Lumineszenz

War der Zweitantikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, emittierte der Farbstoff Lichtquanten bei Anregung durch Infrarotlicht aus dem Infrarotscanner LI-COR Odyssey Sa oder CLx. Dieser konnte Proteine durch die Nutzung von zwei verschiedenen Chromophoren, die bei Wellenlängen von 680 nm oder 800 nm angeregt

wurden, gleichzeitig nachweisen, vorausgesetzt der Primärantikörper wurde aus unterschiedlichen Spezies gewonnen.
Die Immundetektion mittels Nah-Infrarot-Lumineszenz war die bevorzugte Detektionsmethode. War hierbei kein oder nur ein schwaches Signal zu verzeichnen, wurde versucht, das Protein mittels Chemilumineszenz zu detektieren.

3.10.2 Immundetektion mittels Chemilumineszenz

Die Chemilumineszenz erfolgte durch einen HRP gekoppelten Zweitantikörper. Die HRP ist eine aus Meerrettich gewonnene Peroxidase. Im Verhältnis 1:1 wurde aus dem *SuperSignal® West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* und dem *SuperSignal® West Pico PLUS Luminal/Enhancer Solution* eine Lösung hergestellt. In diese Lösung wurde der Blot für 3 min gelegt. Dabei findet eine chemische Reaktion statt, bei der Luminol von der HRP oxidiert wird und dabei Licht emittiert (Prichard and Cormier, 1968). Die freiwerdenden Lichtquanten konnten im Fusion SL3500 WL detektiert werden. In Abhängigkeit von der Signalstärke konnte die Belichtungszeit und Sensitivität digital eingestellt werden.

3.11 Immunzytochemie

Die Immunzytochemie wurde durchgeführt, um die Lokalisation der Proteine in der Zelle darzustellen und mit Ergebnissen aus den Western Blots zu vergleichen. Dafür wurden zunächst je drei Deckgläser pro Well in eine 6-Well Platte gelegt und die Zellen darauf ausgesät. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurden diese gemäß den Konzentrationen in Tabelle 8 stimuliert oder inhibiert und für 48 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Anfärbung spezifischer Proteine.
Dafür wurde zunächst das Medium aus den Wells abgesaugt und diese jeweils mit 1 ml 1x TBS gewaschen. Danach wurden die Zellen je nach verwendetem Antikörper fixiert. Für die Anfärbung von Cadherinen und Cateninen wurden die Deckgläser mit -20°C kaltem 1:1 Methanol - Aceton fixiert. Für die Anfärbung durch alle anderen Antikörper wurden die Deckgläser mit Formaldehyd fixiert. Hierzu wurden die Deckgläser mit 2 % Paraformaldehyd in 1x TBS überschichtet und für 15 min bei Raumtemperatur belassen. Danach wurden die Zellen dreimal mit 1x TBS gewaschen. Nun erfolgte die Permeablisierung, die dazu diente, die Zellmembran für Antikörper durchlässig zu machen. Die Permeablisierung wurde nur bei Zellen durchgeführt, die mit Formaldehyd fixiert wurden. Sie erfolgte mit je 1 ml 0,2 % Triton X-100 in 1x TBS für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Deckgläser wieder dreimal mit 1x TBS gewaschen. Danach wurden sie mit einer Lösung aus 3 % BSA in TBS für 1 h auf dem Schüttler bei Raumtemperatur abgesättigt, um unspezifische Adhäsionen zu vermeiden.

Im Anschluss wurden die Deckgläser dreimal mit 1x TBS gewaschen. Nun wurden 50 µl Erstantikörper (s. Tabelle 1) in einer Lösung aus 0,2 % BSA in TBS für 90 min auf die Deckgläser gegeben. Dabei war darauf zu achten die Wells in einer feuchten Box zu lagern, um sie während der Inkubation vor dem Austrocknen zu schützen. Nach der Inkubationszeit wurden die Deckgläser erneut dreimal mit 1x TBS gewaschen und danach mit Zweitantikörpern (s. Tabelle 3) überschichtet. Zu der Zweitantikörper Lösung wurde direkt auch eine 1:1000 verdünnte DAPI-Antikörperlösung hinzugegeben (s. Tabelle 4). Die Zweitantikörper sind entweder an Cy3 oder Alexa 488 gekoppelt. Sie wurden ebenfalls in einer Lösung aus 0,2 % BSA in TBS angesetzt und je 100 µl der Lösung wurde auf ein Deckglas gegeben. Cy3 hat eine Absorptionswellenlänge von 532 nm und Alexa 488 von 488 nm. Zur Darstellung von β-Aktin wurde eine fluoreszenzmarkierte Phalloidin Sonde gegen F-Aktin verwendet (s. Tabelle 4). Phalloidin ist ein Aktin bindendes Toxin, welches aus dem grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) gewonnen wird (Wulf *et al.*, 1979). Die Inkubation erfolgte für 90 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit in einer feuchten Aluminiumbox. Die Dunkelheit vermeidete die vorzeitige Fluoreszenz des sensiblen Zweitantikörpers. Nach dieser Zeit wurden erneut drei Waschschritte durchgeführt. Hierbei erfolgte der erste Waschschritt mit 0,02 % (V/V) Tween 20 in 1x TBS, die anderen beiden mit 1x TBS. Nun konnte die Färbung der in TBS eingelegten Deckgläser zunächst unter dem Fluoreszenzmikroskop IX81 von Olympus kontrolliert werden. Bei erfolgreicher Färbung wurden die Zellen auf Objektträgern fixiert. Dazu wurde auf einen Objektträger jeweils ein Tropfen Evanol gegeben. Die Deckgläser wurden zuerst in ultrareines Wasser getaucht, dann vorsichtig trocken getupft und schlussendlich mit der Zellen besetzten Seite nach unten auf den Objektträger gelegt, sowie vorsichtig angedrückt. Die Aushärtung des Evanols dauerte im Kühlschrank ungefähr einen Tag. Danach hafteten die Deckgläser fest auf dem Objektträger und überschüssiges Evanol konnte mit einem Ethanol getränkten Tuch entfernt werden.

Evanol-Lösung 10 % (M/V) Mowiol 4-88
25 % (V/V) Glycin
50% (V/V) 0,2 M Tris
pH 8,5

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte durch Luft oder Öl mittels 10 - 60 fach vergrößernden Objektiven. Verwendet wurde das inverse Fluoreszenzmikroskop Olympus IX10 von Olympus. Die Bildaufnahmen erfolgten mit der monochromen Kamera XM 10 der Firma Olympus. Die Kamera verfügt über eine maximale

Bildauflösung von 1376 x 1032 Pixel ohne Binning. Die Fluoreszenzsignale wurden in den Beobachtungsmodi DAPI, Cy3 und Alexa Fluor 488 aufgenommen. Die Belichtungszeiten wurden mithilfe der Programmautomatik der Aufnahmesoftware für die jeweilige Aufnahme bestimmt und variiert damit in Abhängigkeit der Aufnahmebedingungen. Für die Aufnahme und Speicherung der Bilder wurde die Software CellSens Dimension 1.6 von Olympus verwendet.
Die Bildbearbeitung erfolgte mit Microsoft Power Point 2019 für macOS. Hierbei wurde die Anpassung von Helligkeit und Kontrast sowie das Zuschneiden der Bildausschnitte vorgenommen. Die Bearbeitung erfolgte für alle Aufnahmen nach einheitlichen Kriterien und das ursprüngliche Bildmaterial wurde dabei inhaltlich nicht verändert.

3.12 Statistik

Alle Versuche wurden, sofern nicht anders angegeben, mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Ausnahmen sind die Versuche aus den Abbildungen 8 (pErk), 9 B (E-Cadherin), 14 B (Snail HCC44), 17 A (ZEB 1 H358), 19 (Vimentin), 26 A (SMAD 2 / 3 HCC44) sowie die Immunzytochemien. Die Vorversuche mit den K-Ras^{G12C} Inhibitoren ohne TGF-β1 wurden zwei- bis dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Alle Immunblots wurden einer quantitativen Auswertung unterzogen. Diese erfolgte mittels Densitometrie mit der Software *Image Studios 5.2*. Die daraus resultierenden Werte wurden zunächst auf die zugehörige DMSO und / oder Zitrat Kontrolle (≙ 1,0) bezogen. Im Anschluss wurden die Werte auf die DMSO ± Zitrat normierten Werte der Beladungskontrolle bezogen (Normalisierung).
Von der Gesamtheit der Stichproben eines Proteins wurden dann die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt (Formeln s. unten). Als Richtwerte für eine Erhöhung beziehungsweise Erniedrigung der relativen mittleren Proteinmenge wurden die Werte $\geqq 1{,}5$ und $\leqq 0{,}5$ verwendet, sofern die Ergebnisse reproduzierbar waren. Für die Transkriptionsfaktoren wurden die Richtwerte $\geq 1{,}25$ und $\leq 0{,}75$ verwendet, da diese Proteine in geringeren Mengen in der Zelle vorkommen. Zusätzlich wurde ein Einstichproben-t-Test sowie ein ungepaarter t-Test mit Hilfe der Software *GraphPad* durchgeführt. Mit dem Einstichproben-t-Test wurden die Unterschiede zwischen den Proben mit den K-Ras^{G12C} Inhibitoren und / oder TGF-β1 gegenüber den Kontrollproben vergleichen. Mittels des ungepaarten t-Tests wurden die Unterschiede zwischen den TGF-β1 stimulierten Proben und den mit TGF-β1 und K-Ras^{G12C} Inhibitor behandelten den Proben untersucht. P-Werte von $\leq 0{,}05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Untersucht wurden $p < 0{,}05$ (*) und $p < 0{,}01$ (**).

Mittelwert $\bar{x}$: (Weiß, 2019):

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

n= Anzahl der Versuche

x_i = Einzelwert

Standardabweichung SD = *standard deviation* (Weiß, 2019)

$$SD = \sqrt{\Sigma \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

4 Ergebnisse

Für die folgenden Experimente wurden die NSCLC-Zelllinien H358, HCC44 und H23 verwendet. H23 und HCC44 Zellen sind aus einem Adenokarzinom gewonnen. H358 Zellen stammen aus einem bronchoalveolären Karzinom. Alle diese Zelllinien weisen eine K-Ras^{G12C} Mutation als Treibermutation auf (vgl. Kapitel 1.2.3). Die Zelllinien H23 und H358 tragen diese Mutation heterozygot, die HCC44 Zellen homozygot (vgl. Kapitel 2.7).

Unter dem Einfluss der spezifischen K-Ras^{G12C} Inhibitoren AMG 510 oder MRTX 849 wurden Veränderungen in der Menge und Lokalisation verschiedener Proteine analysiert (s. unten). Zudem wurden die Auswirkungen einer Stimulation mit dem Wachstumsfaktor TGF-β1 untersucht, sowie die Effekte der Inaktivierung der K-Ras^{G12C} Proteine und ihrer nachfolgenden Signalwege auf mit TGF-β1 stimulierte Zellen. Mithilfe dieses Versuchsdesigns sollten Hinweise auf eine Synergie zwischen dem Ras und TGF-β1 Signalweg in der Regulation verschiedener EMT Markerproteine, wie Vimentin und E-Cadherin, ebenso wie den EMT-Transkriptionsfaktoren Snail, Slug und ZEB 1 untersucht werden. Neben den klassischen EMT-Transkriptionsfaktoren wurden auch die Transkriptionsfaktoren ATF 2 und STAT 3 sowie die Transkriptionsregulatoren SMAD 2 und SMAD 3 und die RNA *Splicing* Proteine ESRP 1 und ESRP 2 analysiert. Darüber hinaus wurden auch die Proteine Vinculin, β- und ɣ-Catenin, die an der Bildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt sind, sowie das Zytoskelett-Protein F-Aktin untersucht. Zur Kontrolle der beobachteten Veränderungen wurden Zellen aller drei Zelllinien mit DMSO und Zitrat versetzt. Die hierbei ermittelten Proteinmengen wurden als Kontrollwert verwendet. Da die beiden verwendeten K-Ras^{G12C} Inhibitoren in DMSO und TGF-β1 in Zitrat gelöst sind, wurden diese Lösungsmittel als Kontrollreagenzien verwendet. Dieser Versuchsaufbau bildet die Grundlage für alle weiteren beschriebenen Ergebnisse.

Für die Versuche wurden 10 nM der K-Ras^{G12C} Inhibitoren und 10 ng/ml TGF-β1 verwendet. Die optimale Konzentration der K-Ras^{G12C} Inhibitoren wurden von Kyra Geißer in der Arbeitsgruppe Giehl ermittelt. Die wirksame Konzentration von TGF-β1 basiert auf vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe sowie verschiedenen Literaturangaben.

4.1 Analyse der Proteinmenge von Transkriptionsfaktoren, ESRPs, SMAD Proteinen und Cateninen in NSCLC Zelllinien

Zunächst erfolgte der Vergleich der Proteinausstattung in unbehandelten Zellen der drei untersuchten Karzinomzelllinien, deren Lysat in einen unlöslichen (kernhaltigen) und zytosolhaltigen Anteil fraktioniert wurden (vgl. Kapitel 3.5.1). Im Folgenden werden diese Fraktionen als Kern- bzw. Zytosolfraktion bezeichnet. In Abbildung 6 sind die

untersuchten Proteine der drei verwendeten Zelllinien mittels Immunoblot dargestellt. Im Folgenden werden sie zwischen den verwendeten NSCLC Zelllinien und den Kern- bzw. Zytosolfraktionen verglichen. Dabei ist zu beachten, dass eine strikte Trennung der Zellbestandteile durch diese Methode nicht gewährleistet werden kann (vgl. Kapitel 5.5).

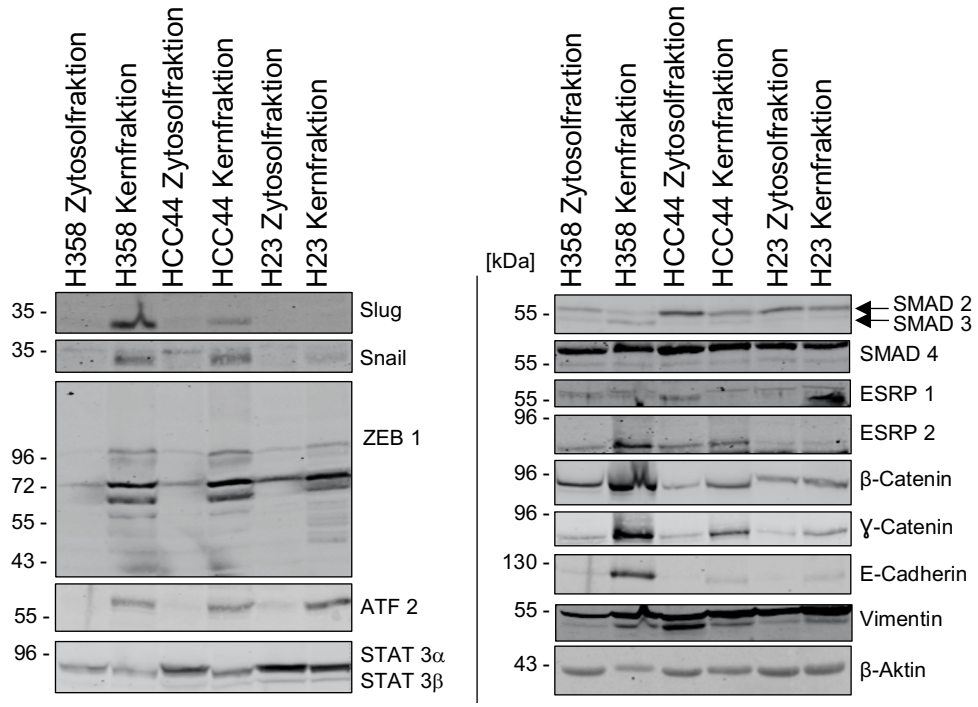


Abbildung 6: Analyse der Proteinmenge von Transkriptionsfaktoren, ESRPs, SMAD Proteinen, Cateninen, E-Cadherin und Vimentin in NSCLC Zelllinien

Von H23, HCC44 und H358 Zellen wurden Kern-Zytosolpräparationen angefertigt und je 30 µg Protein auf Acrylamidgele aufgetragen. Die o.g. Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Der Versuch wurde einmal exemplarisch durchgeführt. Die β-Aktin Färbung diente als Beladungskontrolle.

Snail und Slug gehören zu den EMT-Transkriptionsfaktoren. Beide haben ein Molekulargewicht von 30 kDa (The UniProt Consortium, 2024a, 2024b) und wurden hauptsächlich in den Kernfraktionen nachgewiesen. Sowohl Snail als auch Slug waren in großen Mengen in der Adenokarzinomzelllinie H358 vorhanden und in sehr geringen Mengen in der Zelllinie H23. Ebenfalls zu den EMT Transkriptionsfaktoren gehört ZEB 1 (*Zinc finger E-box-binding homeobox*). Wie in Abbildung 6 erkennbar ist, zeigten sich im Immunoblot eine Vielzahl unterschiedlich schwerer Banden mit einem spezifischen Gewicht von ca. 40 bis 200 kDa, welche sich hauptsächlich in den Kernfraktionen befinden. Die kanonische Isoform hat ein Molekulargewicht von 124,07 kDa (The UniProt Consortium, 2024c). Diese ist in den abgebildeten Western Blots in Abbildung 6 und 17 allerdings nicht zu sehen. Im Folgenden liegt der Fokus auf der zwischen 180 und 200 kDa schweren Isoform, da in Versuchen von Dirk Lohfink in der Arbeitsgruppe

Menke diese Bande mittels siRNA dem Transkriptionsfaktor ZEB 1 zugeordnet werden konnte. Die siZEB 1 RNA konnte die ZEB 1 Proteine in der 180 kDa schweren Bande (s. Pfeile Abb. 7) sowohl in den unbehandelten als auch TGF-β1 stimulierten H358 und den H1299 Zellen reprimieren (s. Abb. 7). Währenddessen waren alle weiteren im Immunoblot sichtbaren ZEB 1 Banden mit einem Molekulargewicht zwischen 25 und 80 kDa weiterhin detektierbar.

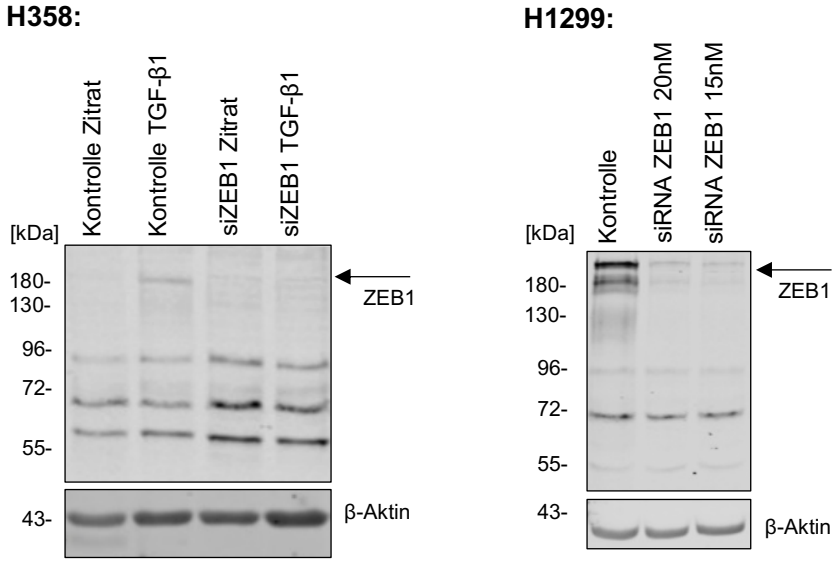


Abbildung 7: Analyse der ZEB 1 Proteinmenge nach Transfektion von siZEB 1 in H358 und H1299 Zellen

H358 und H1299 Zellen wurden mit siZEB 1 transfiziert. Die H358 Zellen wurden nach der Transfektion für 72 h inkubiert oder für 72 h mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Die H1299 Zellen wurden nach der Transfektion für 48 h inkubiert. Von den transfizierten Zellen wurden RIPA-Gesamtlysate angefertigt und je 50 µg Protein auf ein 8,5 %iges Acrylamidgel aufgetragen. Der Immunoblot wurde mittels eines spezifischen ZEB 1 Antikörpers angefärbt. Die β-Aktin Färbung diente als Beladungskontrolle. Die Versuche wurden in der Arbeitsgruppe Menke von Dirk Lohfink für jede Zelllinie einmal durchgeführt.

ATF 2 (*Activating Transcription Factor 2*) war in den Kernfraktionen aller drei Adenokarzinomzelllinien angefärbt. Die kanonische Isoform hat ein berechnetes Molekulargewicht von 54 kDa (The UniProt Consortium, 2024d). Durch den hier verwendeten Antikörper wird eine Isoform mit einem Molekulargewicht von 60 - 70 kDa angefärbt.

Der Transkriptionsfaktor STAT 3 war sowohl in den Kern- als auch in den Zytosolfraktionen zu finden. Am stärksten war das Protein in der NSCLC-Zelllinie H23 detektierbar. Die geringste STAT-3 Proteinmenge zeigte die Adenokarzinomzelllinie H358. Das Protein hat drei verschiedene Isoformen (The UniProt Consortium, 2024e). Der hier verwendete Antikörper färbt zwei dieser Isoformen an. Die α-Isoform mit einem Molekulargewicht von 86 kDa und die β-Isoform mit einem Molekulargewicht von 79 kDa. Während STAT 3β im Immunoblot aller verwendeten Zelllinien nur blass

angefärbt ist, ist STAT 3α in größeren Mengen in allen drei Zelllinien zu finden (s. Abb. 6).

SMAD Proteine haben transkriptionsregulierende Eigenschaften und sind Bestandteil des TGF-β Signalwegs (vgl. Kapitel 1.4.2). Das SMAD 2 Protein hat ein Molekulargewicht von 52 kDa, das SMAD 3 Protein von 48 kDa (The UniProt Consortium, 2024f, 2024g). SMAD 2 war im Immunoblot in den zytosolischen Fraktionen der drei verwendeten Zelllinien stärker angefärbt als in den entsprechenden Kernfraktionen. Das SMAD 3 Protein war in größeren Mengen in den Kern- im Gegensatz zu den Zytosolfraktionen vorhanden. In der Zelllinie H358 waren SMAD 2 und SMAD 3 in kleineren Mengen nachweisbar als in den H23 und HCC44 Zellen.

SMAD 4 ist ein Protein mit einem spezifischen Gewicht von 60 kDa (The UniProt Consortium, 2024h). Dieses Protein war sowohl in den Zytosol- als auch in den Kernfraktionen aller drei Zelllinien gleich stark angefärbt (s. Abb. 6).

Die kanonischen Isoformen der RNA-Splicefaktoren ESRP 1 (*Epithelial Splicing Regulatory Protein 1*) und ESRP 2 (*Epithelial Splicing Regulatory Protein 2*) haben ein spezifisches Gewicht von 76 bzw. 78 kDa (The UniProt Consortium, 2024i, 2024j). Die ESRP 1 Proteine waren nur in schwachen Banden detektierbar und unterschieden sich sowohl zwischen den verschiedenen NSCLC-Zelllinien als auch zwischen den Kern- und Zytosolfraktionen kaum. Die ESRP 2 Proteinmenge war in den Kernfraktionen höher als in den Zyotsolfraktionen. Im Western Blot konnte das Protein am stärksten in den H358 Zellen detektiert werden.

Im Immunoblot zeigte sich β-Catenin als eine Bande mit einem spezifischen Gewicht von 92 kDa und ɣ-Catenin mit 86 kDa. Das berechnete Molekulargewicht beträgt 85,5 (β-Catenin) und 81,8 kDa (ɣ-Catenin) (The UniProt Consortium, 2024k, 2024l). Beide Proteine waren in allen Zelllinien sowohl in der Zytosol- als auch in der Kernfraktion detektierbar, wobei eine größere Proteinmenge in den Kernfraktionen zu finden war (Abb. 6).

E-Cadherin hat ein Molekulargewicht von ca. 120 kDa (berechnetes Molekulargewicht 97 kDa (The UniProt Consortium, 2024m)) und befand sich hauptsächlich in der Zelllinie H358. Im Gegensatz dazu enthielten die H23 und HCC44 Zellen kaum E-Cadherin (s. Abb. 6). Das EMT-Markerprotein E-Cadherin ist ein membranäres Protein. Aufgrund der verwendeten Methode war dieses jedoch nicht in der sogenannten Zytosolfraktion (löslichen Fraktion) zu finden, sondern in der sogenannten Kernfraktion, auch unlösliche oder partikuläre Fraktion genannt. Dies gilt für alle Proteine der Zellmembran.

Das Protein Vimentin ist zwischen 53 - 67 kDa (The UniProt Consortium, 2024n) schwer und zeigte keine Unterschiede in der Proteinmenge zwischen Zytosol- und Kernfraktionen oder den untersuchten Zelllinien (s. Abb. 6).

4.2 Inhibition von K-Ras^{G12C} durch 10 nM AMG 510 oder MRTX 849

Um nachzuweisen, dass die verwendete Konzentration von 10 nM der spezifischen K-Ras^{G12C} Inhibitoren AMG 510 oder MRTX 849 zu einer Inhibition der onkogenen K-Ras^{G12C} Proteine führt, wurde die Menge der phosphorylierten Erk Proteine 1 und 2 (pErk) untersucht.

Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, führte die Inhibition der K-Ras^{G12C} Proteine mit AMG 510 oder MRTX 849 zu einer Abnahme der Menge von pErk 1 / 2 in den HCC44 und H358 Zellen. Die Inhibition von K-Ras^{G12C} führte auch unter gleichzeitiger Stimulation mit dem Wachstumsfaktor TGF-β1 in den H358 und HCC44 Zellen zur Abnahme der pErk 1 / 2 Menge. Die alleinige Stimulation der Zellen mit TGF-β1 führte in den H358 Zellen zu einem Anstieg der pErk 1 / 2 Menge (s. Abb. 8 A). In der Zelllinie HCC44 konnte keine Veränderung der Proteinmenge von pErk 1 / 2 nach TGF-β1 Stimulation detektiert werden (s. Abb. 8 B). Die Gesamtmenge des Erk 1 / 2 Proteins veränderte sich in beiden Zelllinien durch die K-Ras^{G12C} Inhibition und / oder TGF-β1 Stimulation nicht und wurde zur Normalisierung der pErk 1 / 2 Menge verwendet.

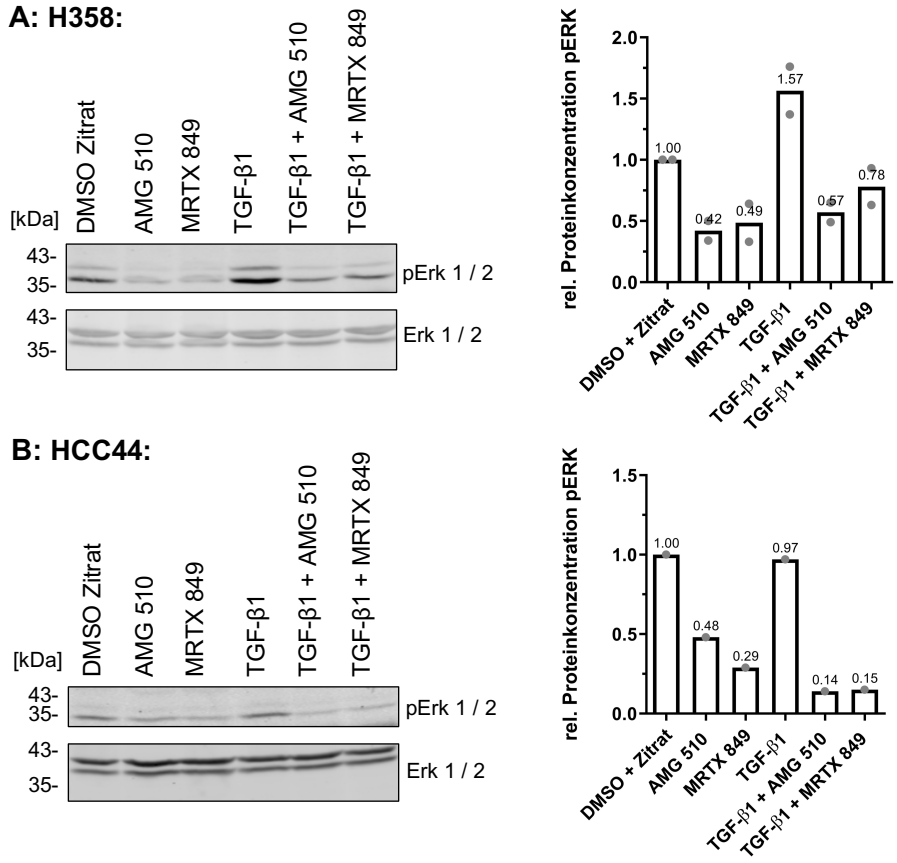


Abbildung 8: Inhibition von K-Ras^{G12C} durch 10 nM AMG 510 oder MRTX 849

H358 und HCC44 Zellen wurden für 24 h mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Je 75 µg Protein des RIPA-Gesamtlysats wurden auf einem 10 %igen Acrylamidgel

aufgetragen. Phosphoryliertes Erk 1 und 2 (kurz: pErk 1 / 2) und Erk 1 und 2 wurden mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Der Versuch wurde einmal (HCC44) bzw. zweimal (H358) durchgeführt. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Blot mit Mittelwerten und Einzelwerten (•). Die densitometrische Auswertung erfolgt normiert auf Erk 1 / 2 und wird in Relation zur DMSO-Zitrat Kontrollfraktion (≙ 1,0) angegeben.

4.3 Zeitabhängige Veränderungen der Proteinkonzentration von Slug und E-Cadherin nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Inkubationszeiten der NSCLC Zellen nach Behandlung mit den K-Ras^{G12C} Inhibitoren und / oder TGF-β1 zu untersuchen, wurden die Proteine Slug und E-Cadherin in der unlöslichen Zellfraktion nach 12, 24 und 48 h in H358 Zellen analysiert. Ziel dieses Experiments war es die optimale Behandlungszeit der Zellen mit den K-Ras^{G12C} Inhibitoren und / oder TGF-β1 zu ermitteln und diese auf das weitere Versuchsdesign zu übertragen.

In den H358 Zellen bewirkte die Inhibition mit AMG 510 sowohl nach 12, 24 und 48 h eine Erniedrigung der Slug Proteinmenge gegenüber dem jeweiligen zeitspezifischen DMSO-Zitrat Kontrollwert (12 h: 0,55 ± 0,11; 24 h: 0,6 ± 0,16; 48 h: 0,8 ± 0,32) (s. Abb. 9 A). Die Stimulation mit TGF-β1 führte sowohl nach 12, 24 als auch 48 h zu einer Erhöhung der Proteinmenge im Vergleich zur der jeweiligen DMSO-Zitrat Kontrolle (12 h: 2,59 ± 1,0; 24 h: 2,83 ± 1,96; 48 h 4,06 ± 1,08). Ebenso erhöhte sich die Slug Proteinmenge nach 12, 24 und 48-stündiger AMG 510 und TGF-β1 Behandlung (12 h: 2,06 ± 0,91; 24 h: 2,14 ± 1,88; 48 h 2,92 ± 0,47). Nach 48 h führt die Behandlung mit TGF-β1 sowie AMG 510 und TGF-β1 zu einer signifikanten Erhöhung der Slug Proteinmenge. Somit veränderte sich die Proteinmenge des Slug Proteins unter Einfluss der K-Ras^{G12C} Inhibitoren und / oder der TGF-β1 Stimulation nach 12, 24 und 48 h gleichsinnig.

12 und 24 h nach Inhibition mit AMG 510 zeigte das E-Cadherin Protein in den untersuchten H358 Zellen keine Veränderungen der Proteinmenge gegenüber dem der jeweiligen DMSO-Zitrat Kontrolle (s. Abb. 9 B). Nach 48 h kam es zu einem Abfall der E-Cadherin Proteinmenge auf das 0,39 fache des 48 h-Kontrollwerts. Die Stimulation mit TGF-β1 verursachte, wie in Abbildung 8 dargestellt, sowohl nach 12, 24 als auch nach 48 h keine Erniedrigung der E-Cadherin Proteinmenge. Wie in Abbildung 18 jedoch dargestellt, kam es nach 48-stündiger Behandlung mit TGF-β1 zum Absinken der E-Cadherin Proteinmenge gegenüber dem Kontrollwert.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die nachfolgenden Experimente mit einer Inkubationsdauer von 48 h durchgeführt.

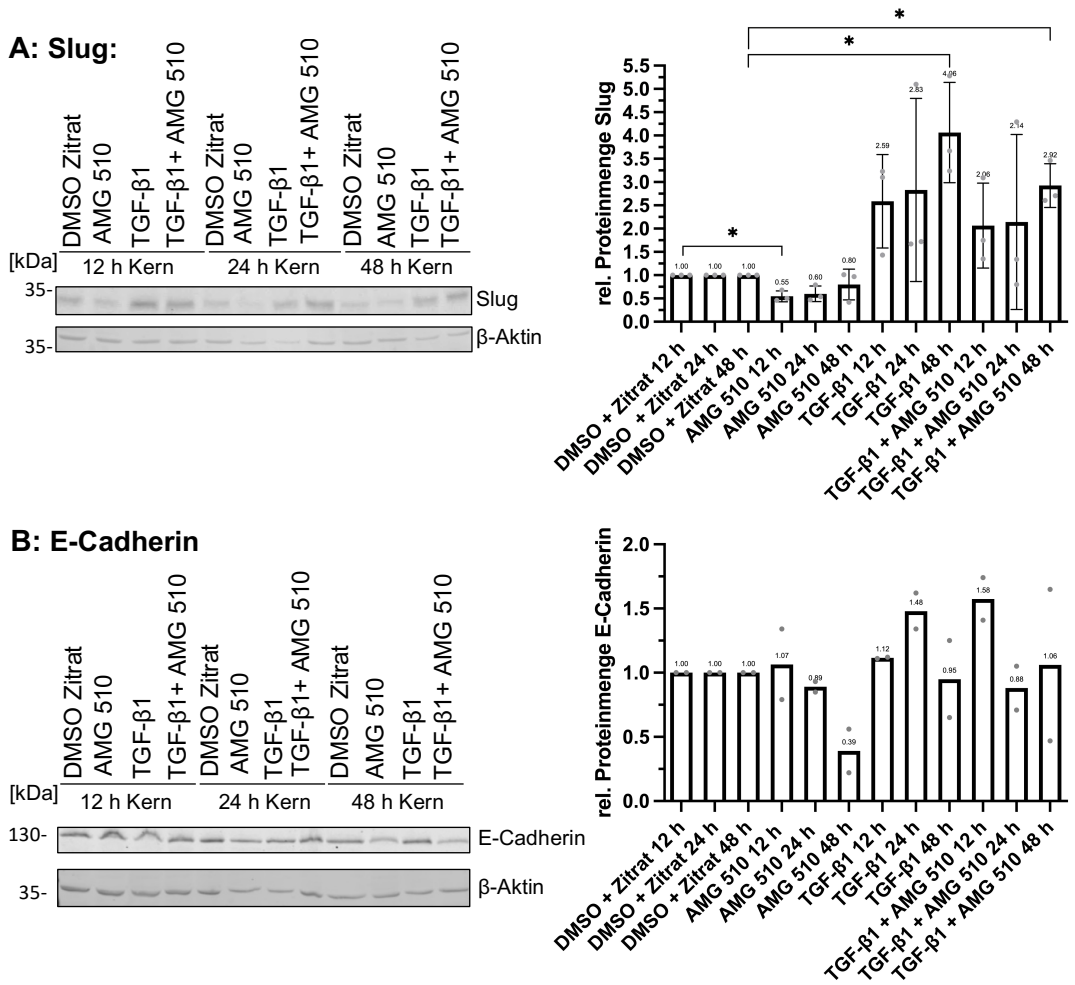


Abbildung 9: Zeitabhängige Veränderungen der Proteinmenge von Slug und E-Cadherin nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

H358 Zellen wurden für 12, 24 und 48 h mit 10 nM AMG 510 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Je 30 µg Protein der Kernfraktionen wurden in einem 8,5 %igen (E-Cadherin) bzw. 12,5 %igen (Slug) Acrylamidgel aufgetrennt. Das Slug und E-Cadherin Protein wurden jeweils mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Blot aus zwei (E-Cadherin) bzw. drei (Slug) unabhängigen Versuchen. Die densitometrische Auswertung erfolgte normiert auf die Beladungskontrolle β-Aktin und ist in Relation zur Menge der jeweiligen Kontroll-Kernfraktion (DMSO + Zitrat) (≙ 1,0) angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen sowie die Einzelwerte (•). Die statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte in Bezug auf die DMSO-Zitrat Kontrolle bzw. die TGF-β1 stimulierte Fraktion wurde mittels eines Einstichproben sowie ungepaarten t-Tests analysiert ($p < 0,05$ = *).

4.4 Morphologische Veränderungen der NSCLC-Zellen im Phasenkontrast nach Inhibition der onkogenen K-Ras^{G12C} Proteine und / oder Stimulation mit TGF-β1

Die morphologischen Veränderungen der Lungenkarzinomzelllinien wurden nach 48-stündiger Inhibition der onkogenen K-Ras^{G12C} Proteine und / oder der Stimulation mit TGF-β1 analysiert. Hierfür wurden die verwendeten NSCLC Zellen mit einem 20 - fachen Objektiv im Phasenkontrast fotografiert und in Abbildung 10 dargestellt. Ziel war es

mögliche phänotypische Veränderungen zu analysieren, die auf einen stattfindenden EMT Prozess hindeuten. Es ist allerdings zu beachten, dass manche morphologischen Veränderungen der Zellen bei einer hohen Konfluenz des Zellrasens, nicht mehr beobachtet werden konnten, wie beispielsweise bei den HCC44 Zellen.

Die Zellen der epithelialen NSCLC-Zelllinie H358 wuchsen bevorzugt in kohäsiven Gruppen, was insbesondere bei niedrigerer Konfluenz zu beobachten war (s. Abb. 10 A). Die einzelne Zelle hatte eine polygonale Form mit zentral gelegenem Zellkern (s. Abb. 10 A). Die Karzinomzelllinie HCC44 zeichnete sich durch einzelständige große Zellen mit polygonalen Zellkörpern und großen ovalen Zellkernen aus (s. Abb. 10 G). H23 Zellen waren in unbehandeltem Zustand klein und die Zellkörper heterogen geformt mit dezentral gelegenen Zellkernen (s. Abb. 10 M). Die Form der Zellkörper war oval bis polygonal. Die Zellen bildeten in der Regel keine konfluente Zellschicht.

Nach subjektiver Einschätzung lässt sich festhalten, dass die einzelnen Zellen aller verwendeten Zelllinien, die mit AMG 510 oder MRTX 849 behandelt wurden, größer gegenüber den unbehandelten Zellen der jeweiligen Zelllinien waren. Die Größenzunahme war gut bei den H23 Zellen zu beobachten (s. Abb. 10 N & O). Dieser Effekt ist in den HCC44 Zellen aufgrund der hohen Konfluenz leider nicht zu erkennen (s. Abb. 10 H & I). Während die K-Ras^{G12C} inhibierten H358 Zellen länglicher erschienen (s. Abb. 10 B & C), als die mit DMSO und Zitrat behandelten Zellen, waren sowohl die HCC44 (s. Abb. 10 H & I) als auch die H23 Zellen (s. Abb. 10 N & O) polygonal oder rundlich geformt. Unter der TGF-β1 Stimulation wurden die H358, HCC44 und H23 Zellen spindelförmiger gegenüber den Kontrollzellen (s. Abb. 10 D, J & P) und hatten lange Zellfortsätze (s. blaue Pfeilspitze Abb. 10 D & P). Bei den H358 Zellen konnte man zusätzlich beobachten, dass die Zellen verstreut auf der Platte angeordnet waren und nicht kohäsiv wuchsen wie die unbehandelten Zellen. Behandelte man die Zellen aller verwendeten Zelllinien mit TGF-β1 und den K-Ras^{G12C} Inhibitoren zusammen, so konnte man eher polygonale Zellen erkennen (s. Abb. 10 E & F; K & L; Q & R). Vereinzelt fanden sich auch spindelförmige Zellen. Es überwogen jedoch die polygonal geformten Zellkörper.

Somit wiesen sowohl die unbehandelten als auch die K-Ras^{G12C} inhibierte NSCLC Zellen eine epitheliale Morphologie auf. Diese fand sich auch unter gleichzeitiger TGF-β1 und K-Ras^{G12C} Inhibitor Behandlung. Die alleinige TGF-β1 Stimulation bewirkte eine Transition zu einem mesenchymalen Phänotyp.

In allen abgebildeten Zellbildern (Abb. 10 A - R) kann man weiße runde Zellen erkennen. Dies waren Zellen, die nicht beziehungsweise nicht mehr an der Zellkulturschale hafteten, da sie beispielsweise in Apoptose gegangen waren oder schon beim Aussähen nicht an den Zellkulturschalen haften konnten.

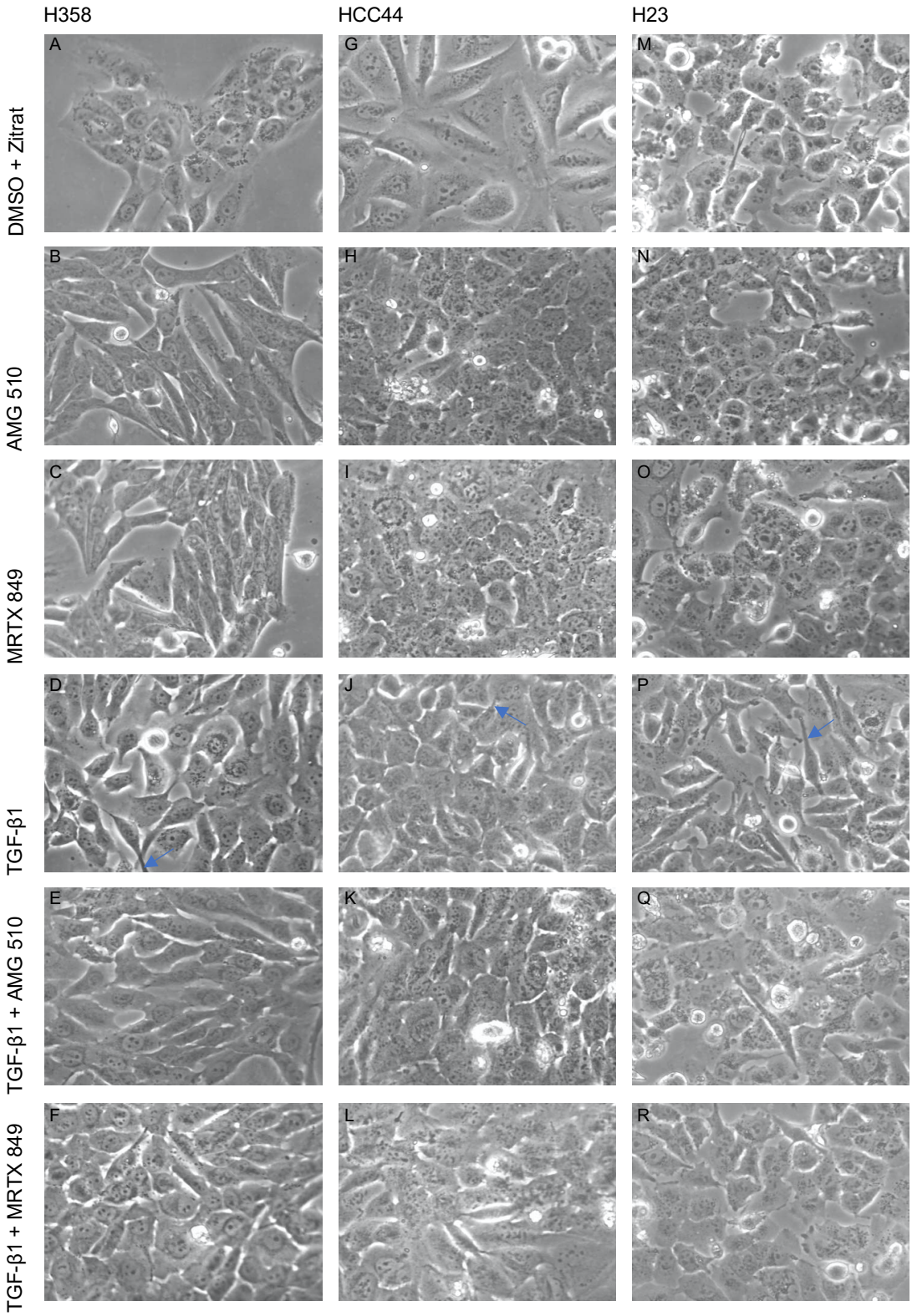


Abbildung 10: Morphologische Veränderungen der NSCLC-Zellen im Phasenkontrast nach Inhibition der K-Ras^{G12C} Proteine und / oder Stimulation mit TGF-β1

Die H23, HCC44 und H358 Zellen wurden für 48 h mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert und mit einem 20 x Objektiv im Phasenkontrast mithilfe der Software analySIS 3.2 fotografiert.

Blaue Pfeile: Zellfortsätze der spindelförmigen Zellen (exemplarisch)

4.5 Proteinexpressions- und Lokalisationsanalyse von EMT-Transkriptionsfaktoren und Markerproteinen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

Für die nachfolgenden Versuche wurden von den inhibierten oder stimulierten Zellen nach 48 h Kern-Zytosol-Präparationen angefertigt, um die Veränderungen der Proteinmengen mittels Western Blot zu analysieren. Anhand der immunzytochemischen Färbungen wurde die Lokalisation der Proteine in der Zelle untersucht und analysiert, wie sich diese durch Inhibition oder Stimulation veränderte. Insbesondere wurde auf eine mögliche Veränderung der detektierbaren Proteinmenge sowie auf Veränderungen zwischen Zytoplasma und Zellkern geachtet.

Untersucht wurden dabei die klassischen EMT-Transkriptionsfaktoren Slug, Snail und ZEB 1, sowie die EMT-Markerproteine E-Cadherin und Vimentin.

In den Zytosolfraktionen veränderte sich die Proteinmenge von Snail, Slug und ZEB 1 weder durch die Inhibition von K-Ras^{G12C} noch die Stimulation mit TGF-β1 oder die Kombination beider. Zudem waren diese Proteine, wie bereits in Abbildung 6 gezeigt, in den Zytosolfraktionen kaum vorhanden, sodass in den folgenden Kapiteln 4.5.1 - 4.5.3 nur die Veränderungen der Proteinmengen in den Kernfraktionen beschrieben werden und diese densitometrisch quantifiziert wurden.

4.5.1 Analyse der Veränderungen der Slug Proteinmenge und -lokalisation nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

Durch Behandlung der H358 Zellen mit dem K-Ras^{G12C} Inhibitor AMG 510 für 48 h kam es in drei unabhängigen Versuchen zu keiner eindeutigen Veränderung der Slug Proteinmenge gegenüber der Kontrollfraktion. Durch den K-Ras^{G12C} Inhibitor MRTX 849 kam es zu einem signifikanten Abfall der Slug Proteinmenge in der Kernfraktion auf das 0,65 fache (SD ± 0,46) (s. Abb. 11 A). Die Stimulation mit TGF-β1 führte zu einem signifikanten Anstieg der Proteinmenge auf das 2,48 fache (SD ± 0,54) der DMSO-Zitrat Kontrolle. Die Proben der H358 Zellen, die mit TGF-β1 und einem der K-Ras^{G12C} Inhibitoren behandelt wurden, zeigten ebenfalls signifikant erhöhte Slug Mengen. Die Behandlung mit TGF-β1 und AMG 510 führte zu einer 2,35 fachen Erhöhung der Proteinmenge gegenüber dem DMSO-Zitrat Kontrollwert (SD ± 0,25), die TGF-β1 und MRTX 849 Behandlung zu einer im Mittel 1,80 fach erhöhten Slug Menge (SD ± 0,33).

In den HCC44 Zellen verursachte die K-Ras^{G12C} Inhibition keine Verringerung der Slug Proteinmenge gegenüber dem Kontrollwert (s. Abb. 11 B). Die Stimulation mit TGF-β1 führte zu einem Anstieg der Slug Proteinmenge gegenüber dem Kontrollwert auf das 1,57 fache (SD ± 0,46). Die mit AMG 510 und TGF-β1 behandelten Zellen wiesen eine 1,76 fach erhöhte Proteinmenge gegenüber dem Kontrollwert auf (SD ± 0,59). Die

Zellen, die mit TGF-β1 und MRTX 849 behandelt wurden, zeigten eine 2,03 fach erhöhte Slug Menge (SD ± 0,99). TGF-β1 bewirkte somit einen Anstieg der Slug Proteinmenge, auch während gleichzeitiger Behandlung mit AMG 510 oder MRTX 849.

Wie bereits Abbildung 6 zeigte, enthielt die NSCLC-Zelllinie H23 nur sehr geringe Mengen endogenes Slug, weshalb die inhibitions- und stimulationsbedingten Veränderungen der Slug Proteinmenge dieser Zelllinie nicht erkennbar waren.

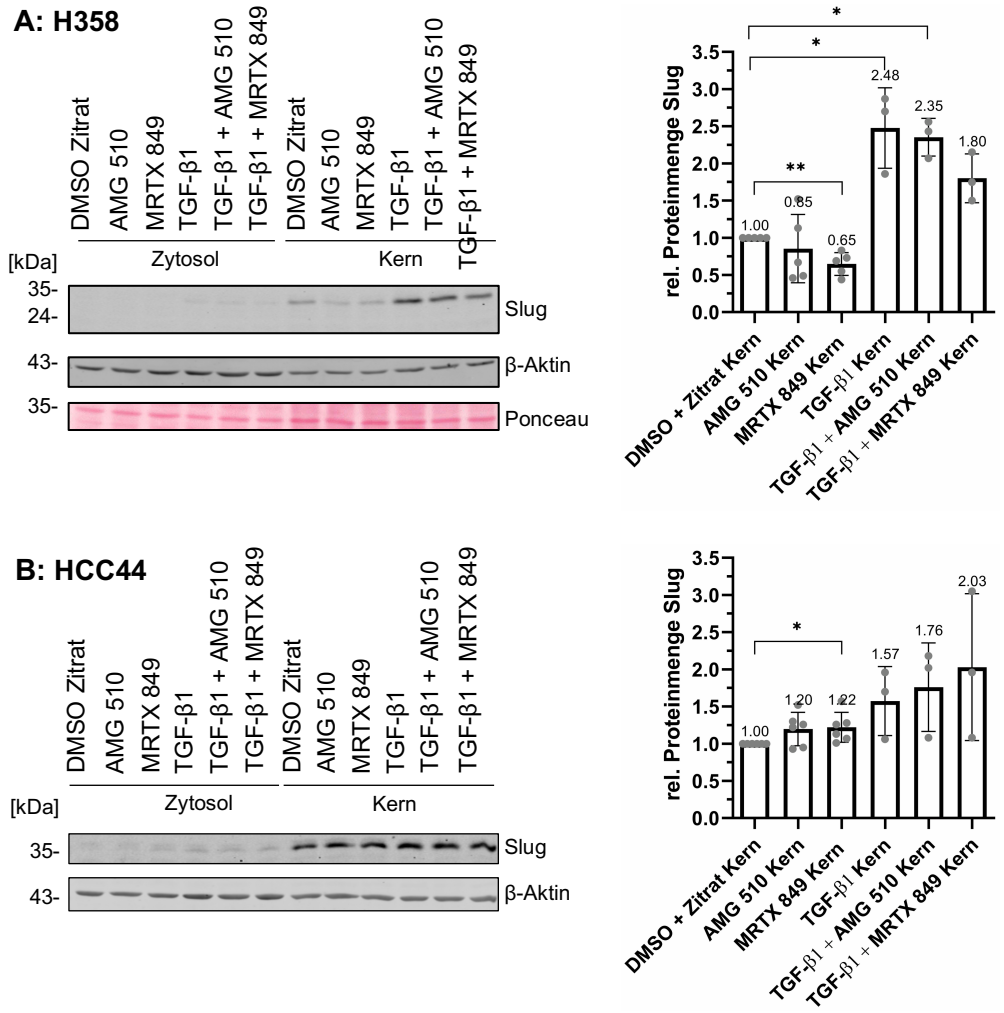


Abbildung 11: Veränderungen der Slug Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

H358 und HCC44 Zellen wurden für 48 h mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Je 30 µg Protein pro Kern- und Zytosolfraktion wurden auf einem 12,5 %igen Acrylamidgel aufgetragen. Das Slugprotein wurde mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Blot aus min. drei unabhängigen Versuchen. Die densitometrische Auswertung erfolgte normiert auf die Beladungskontrolle β-Aktin und ist in Relation zur Menge der DMSO-Zitrat Kernfraktion (Kontrollfraktion) (≙ 1,0) angegeben. Exemplarisch wurde ebenfalls eine Gesamtproteinfärbung (Ponceau Rot) zur Überprüfung der Beladungskontrolle abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen sowie die Einzelwerte (•). Die statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte in Bezug auf die DMSO-Zitrat Kontrolle bzw. die TGF-β1 stimulierte Fraktion

(Signifikanzniveau $p < 0,05$ = *, $p < 0,01$ = **) wurde mittels eines Einstichproben sowie ungepaarten t-Tests analysiert.

In der immunzytochemischen Anfärbung der Adenokarzinomzellen H358 (s. Abb. 12) und HCC44 (s. Abb. 13) war der Transkriptionsfaktor Slug grün (A - F), die Kinase Erk rot (A´ - F´) und die Zellkerne mittels DAPI blau (A´´ - F´´) angefärbt. In der DMSO-Zitrat Kontrolle war Slug hauptsächlich in den Zellkernen angefärbt (s. Abb. 12 A), wohingegen nach Behandlung mit AMG 510 oder MRTX 849 Slug verstärkt im perinukleären Zytoplasma angefärbt war (s. Abb. 12 B & C). Als perinukleäres Zytoplasma beschreibt man das Zytoplasma, welches den Zellkern unmittelbar umgibt. Die alleinige TGF-β1 Stimulation bewirkte eine Zunahme der Slug Signalintensität im Zellkern gegenüber den K-Ras^{G12C} inhibierten Zellen (s. Abb. 12 D). Die H358 Zellen, die mit TGF-β1 und einem der K-Ras^{G12C} Inhibitoren behandelt wurden, zeigten ein heterogenes Signal: In Abbildung 12 E sind Zellen zu sehen, die mit TGF-β1 und AMG 510 behandelt wurden und in denen das Slug Protein hauptsächlich im Zellkern detektierbar war. In Abbildung 12 F sind hingegen H358 Zellen nach Behandlung mit TGF-β1 und MRTX 849 abgebildet, in denen Slug hauptsächlich im perinukleären Zytoplasma vorkam. Die in Rot sichtbare Kinase Erk befand sich in den H358 Zellen sowohl im Nukleus als auch im perinukleären Zytoplasma (s. Abb. 12 A´ - E´). Die Anfärbung des Proteins im Zellkern war vor allem in der DMSO-Zitrat Kontrolle zu beobachten (s. Abb. 12 A). Erk befand sich nach der Behandlung mit den K-Ras^{G12C} Inhibitoren und / oder TGF-β1 vor allem im perinukleären Zytoplasma (s. grauer Pfeil Abb. 12 B´ - F´). Nach der AMG 510 oder MRTX 849 Behandlung allein, aber auch zusammen mit TGF-β1 war weniger Erk Protein im Zellkern detektierbar (s. Abb. 12 B´& C´; E´ & F´), was für eine erfolgreiche Inhibition des Ras Signalwegs spricht (vgl. Kapitel 4.3).

In den Zellen der NSCLC-Zelllinie HCC44 ließ sich der EMT-Transkriptionsfaktor Slug hauptsächlich im Zellkern nachweisen (s. Abb. 13 A - F). Die Kinase Erk befand sich in allen dargestellten HCC44 Zellen sowohl im Zellkern als auch im perinukleären Zytoplasma (s. Abb. 13 A´ - F´). Die Signalintensität der Kinase verminderte sich durch Inhibition des onkogenen K-Ras^{G12C} (s. Abb. 13 B´& C´ / E´& F´). Die Lokalisation des Proteins Erk konnte nach der TGF-β1 Stimulation aufgrund der mangelnden Qualität der Färbung nicht beurteilt werden (s. Abb. 13 D´).

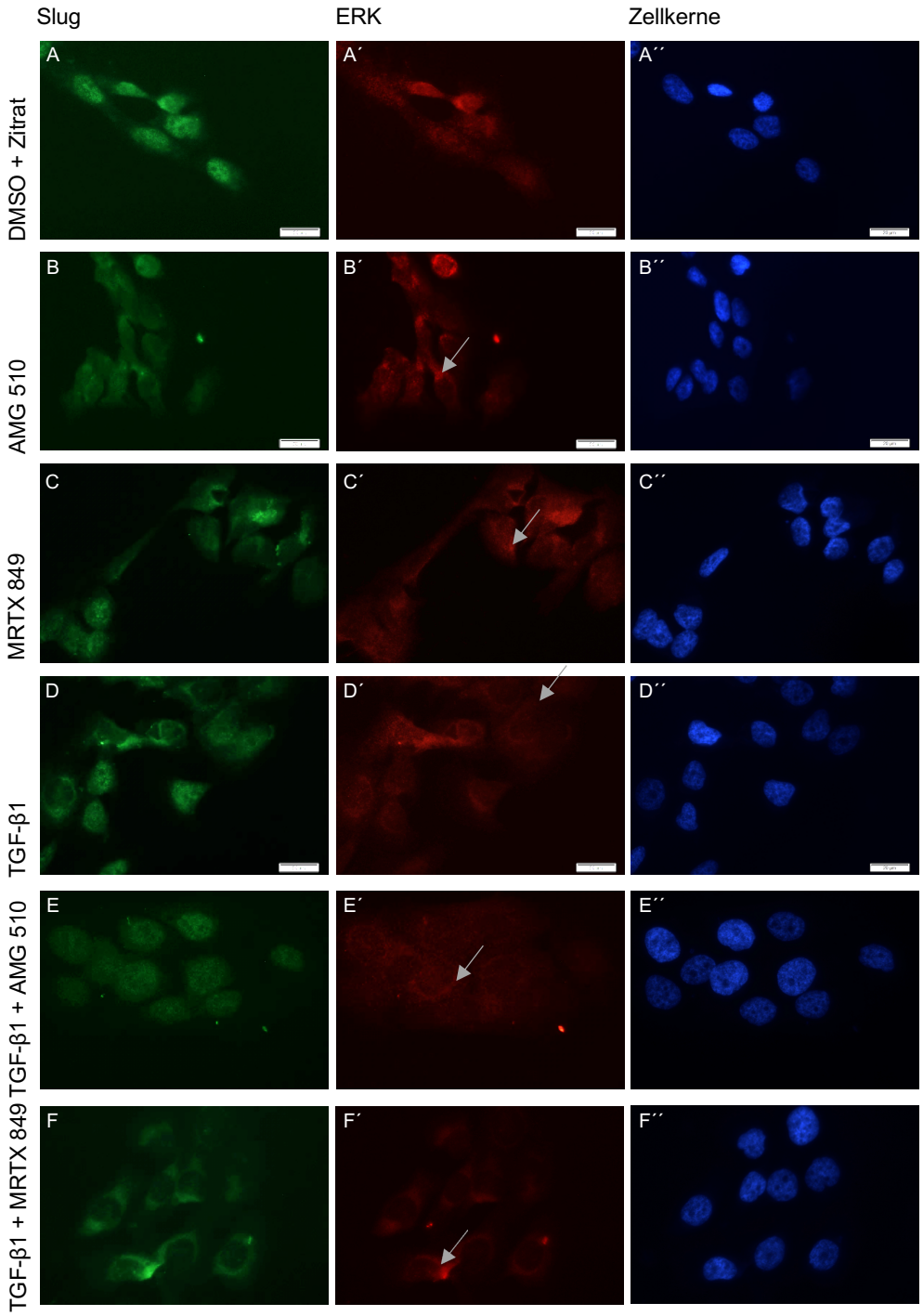


Abbildung 12: Immunzytochemische Analyse von Slug und Erk in H358 Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

H358 Zellen wurden mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Nach 48 h Inkubationszeit erfolgte die Fixierung mit 2 % Formaldehyd und die Anfärbung der Proteine mit spezifischen Antikörpern und fluoreszierenden Zweitantikörpern (Slug – Alexa 488 - grün und Erk – Cy3 - rot). Die Darstellung der Zellkerne erfolgte in Blau mittels DAPI. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einem 60 x Objektiv. Der Versuch wurde einmal exemplarisch durchgeführt.

Grauer Pfeil: Protein im perinukleären Zytoplasma; Maßstab : 20 µm

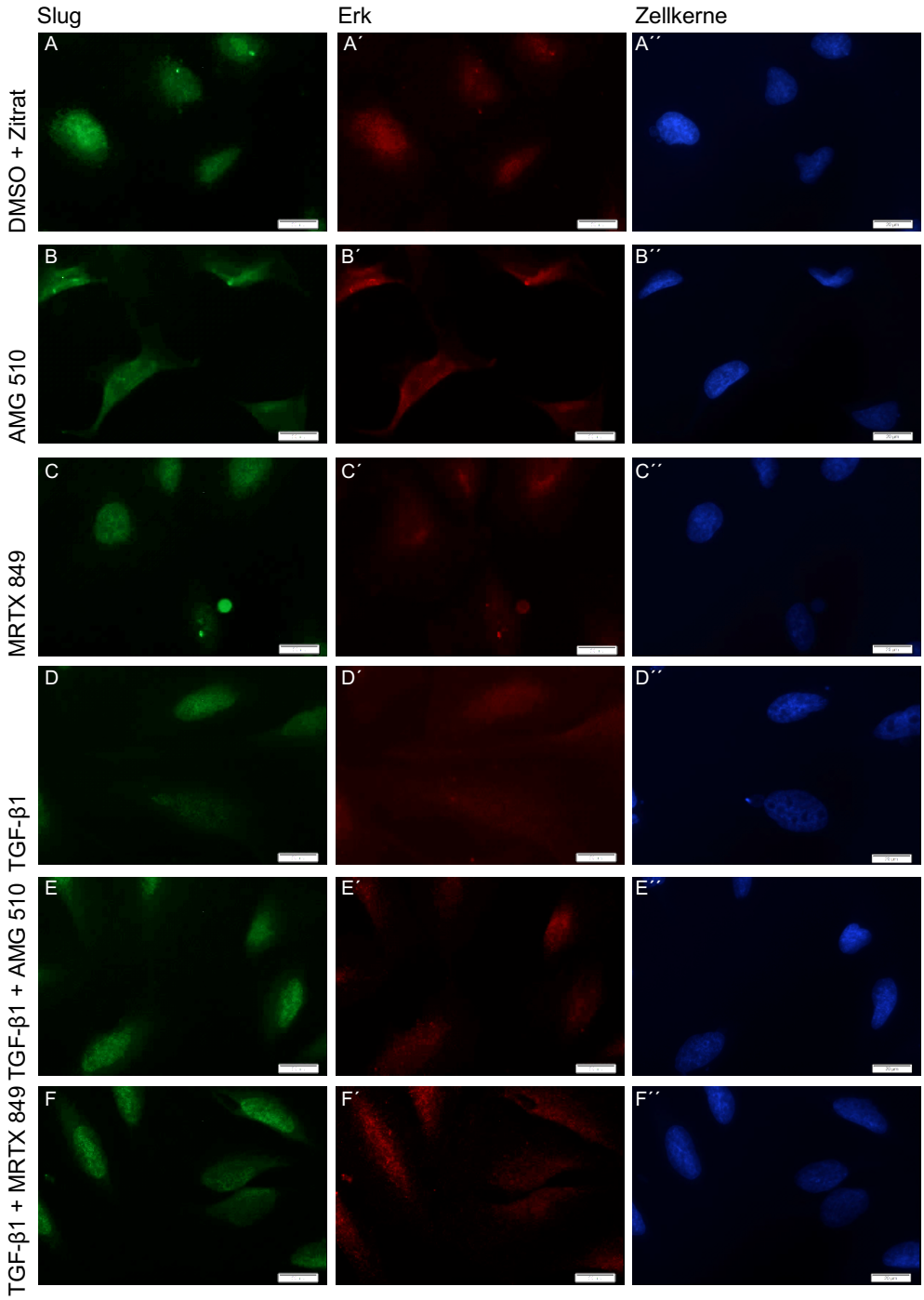


Abbildung 13: Immunzytochemische Analyse von Slug und Erk in HCC44 Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

HCC44 Zellen wurden mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Nach 48 h Inkubationsdauer erfolgte die Fixierung mit 2 % Formaldehyd und die Anfärbung mit spezifischen Antikörpern und fluoreszierenden Zweitantikörpern (Slug – Alexa 488 - grün und Erk – Cy3 – rot). Die Darstellung der Zellkerne erfolgte in Blau mittels DAPI. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einem 60 x Objektiv. Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Maßstab ▭: 20 µm

4.5.2 Analyse der Veränderungen der Snail Proteinmenge und -lokalisation nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

In den Lungenkarzinomzellen der Zelllinie H358 war nach 48-stündiger Inhibition der mutierten K-Ras^{G12C} Proteine keine Veränderung der Snail Proteinmenge gegenüber der DMSO-Zitrat Kontrolle zu erkennen (s. Abb. 14 A). Die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor TGF-β1 führte zu einem signifikanten Anstieg der Proteinmenge auf das 1,8 fache des Kontrollwerts (SD ± 0,25). Auch unter der K-Ras^{G12C} Inhibition mit AMG 510 oder MRTX 849 zusätzlich zu der TGF-β1 Stimulation war die Proteinmenge gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Werte betrugen das 2,6 fache (AMG 510 + TGF-β1; SD ± 1,12) und 2,25 fache (MRTX 849 + TGF-β1; SD ± 0,72) des DMSO-Zitrat Kontrollwerts. Zwischen den mit TGF-β1 und KRas^{G12C} Inhibitor behandelten Fraktionen und der allein mit TGF-β1 stimulierten Fraktion gibt es keinen signifikanten Unterschied.

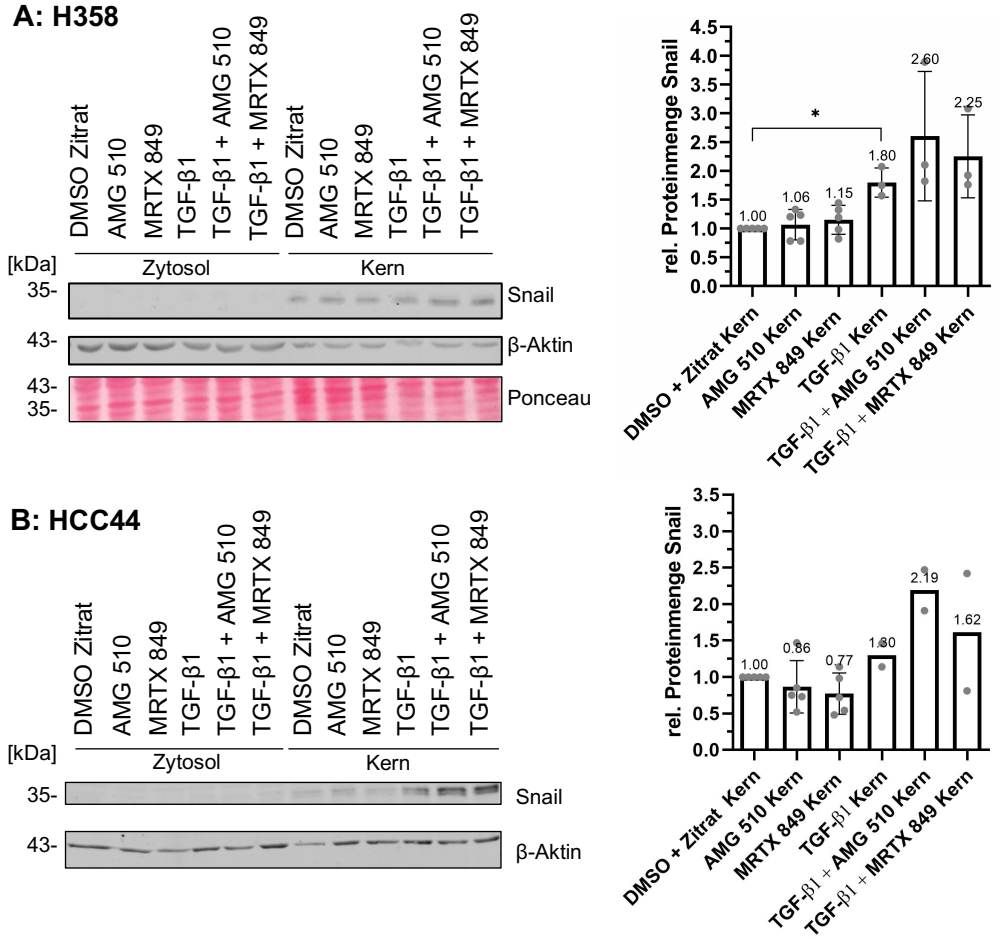


Abbildung 14: Veränderungen der Snail Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

H358 und HCC44 Zellen wurden für 48 h mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Je 30 µg Protein der Kern- und Zytosolfraktion wurden in einem 12,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt. Das Snail Protein wurde mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Blot aus min. zwei (HCC44) bzw. drei (H358) unabhängigen Versuchen. Die

densitometrische Auswertung erfolgte normiert auf die Beladungskontrolle β-Aktin und ist in Relation zur Menge der DMSO-Zitrat Kernfraktion (Kontrollfraktion) (≙ 1,0) angegeben. Exemplarisch wurde ebenfalls eine Gesamtproteinfärbung (Ponceau Rot) zur Überprüfung der Beladungskontrolle abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen sowie die Einzelwerte (•). Die statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte in Bezug auf die DMSO-Zitrat Kontrolle bzw. die TGF-β1 stimulierte Fraktion (Signifikanzniveau $p < 0,05$ = *) wurde mittels eines Einstichproben bzw. ungepaarten t-Tests analysiert.

Ebenso wie die H358 Zellen zeigten auch die HCC44 Zellen keine Änderung der Snail-Menge nach AMG 510 oder MRTX 849 Behandlung im Vergleich zur DMSO-Zitrat Kontrolle (s. Abb. 14 B). Sowohl HCC44 Zellen, die mit TGF-β1 stimuliert wurden als auch HCC44 Zellen, die mit TGF-β1 und einem der beiden K-Ras^{G12C} Inhibitoren behandelt wurden, zeigten tendenziell einen Anstieg der Snail Menge gegenüber dem Kontrollwert. Aufgrund der begrenzten Stichprobenanzahl ist keine eindeutige Aussage möglich.

Die Adenokarzinomzelllinie H23 enthielt sehr wenig endogenes Snail, wie bereits in Abbildung 6 gezeigt, weshalb im Folgenden diese Zelllinie nicht weiter beschrieben wird.

In der immunzytochemischen Analyse der NSCLC-Zelllinien H358 (s. Abb. 15) und HCC44 (s. Abb. 16) ist der EMT-Transkriptionsfaktor Snail grün (s. Abb. 15 & 16 A - F) und die Zellkerne mittels DAPI blau angefärbt (s. Abb. 15 & 16 A´ - F´). Somit kann die Lokalisation der Zellkerne mit der Lokalisation des Snail Proteins verglichen werden. In den beiden Abbildung ist zu sehen, dass der Transkriptionsfaktor Snail in den Zellen der H358 und HCC44 Zelllinie hauptsächlich im Zellkern vorkam (s. Abb. 15 & 16). Eine eindeutige Veränderung der Signalintensität oder ein Shift zwischen Kern und Zytosol konnte nicht beobachtet werden.

Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass die K-Ras^{G12C} Inhibitoren keinen Effekt auf die Snail Proteinmenge haben. TGF-β1 verursachte allein und in kombinierter Behandlung mit AMG 510 oder MRTX 849 eine Zunahme der Snail Proteinmenge.

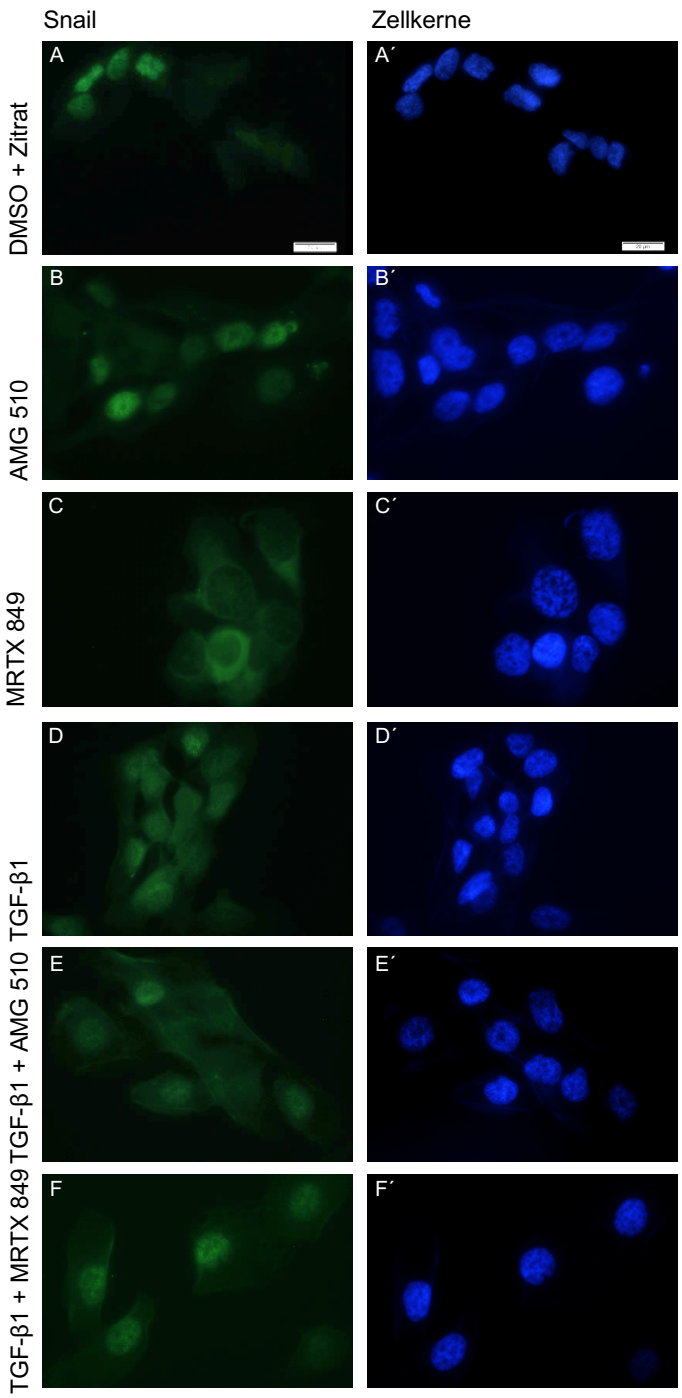


Abbildung 15: Immunzytochemische Analyse von Snail in H358 Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

H358 Zellen wurden für 48 h mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 2 % Formaldehyd und die Anfärbung der Proteine mit spezifischen Antikörpern sowie fluoreszierenden Zweitantikörpern (Snail – Alexa 488 - grün). Die Darstellung der Zellkerne erfolgte in Blau mittels DAPI. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einem 60 x Objektiv. Der Versuch wurde einmal exemplarisch durchgeführt.

Der Maßstab ▭ 20 µm in A / A´ gilt exemplarisch für alle anderen Abbildungen.

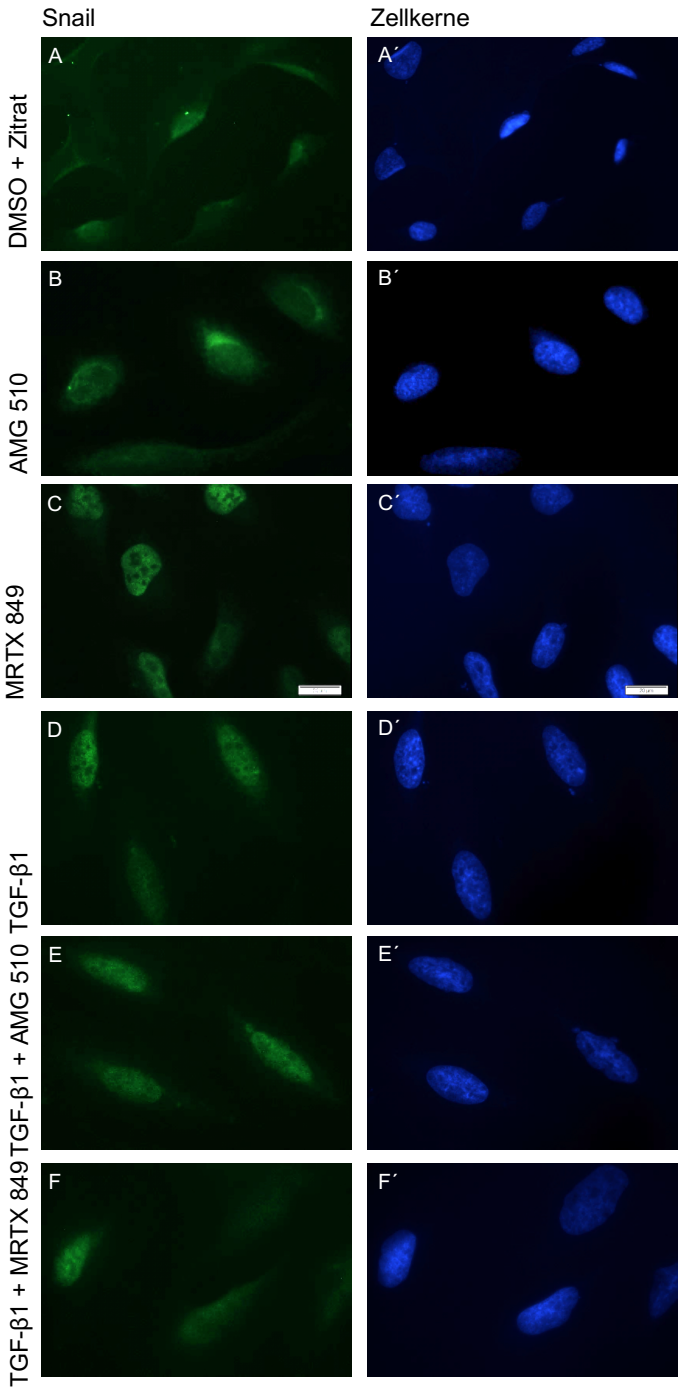


Abbildung 16: Immunzytochemische Analyse von Snail in HCC44 Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

HCC44 Zellen wurden für 48 h mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 2 % Formaldehyd und die Färbung der Proteine mit spezifischen Antikörpern sowie fluoreszierenden Zweitantikörpern (Snail – Alexa 488 - grün). Die Darstellung der Zellkerne erfolgte in Blau mittels DAPI. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einem 60 x Objektiv. Der Versuch wurde einmal exemplarisch durchgeführt.

Der Maßstab ▭ 20 µm in C / C´ gilt exemplarisch für alle anderen Abbildungen.

4.5.3 Analyse der Veränderungen der ZEB 1 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

Wie in Kapitel 4.1 bereits festgehalten, wurde aufgrund der Zuordnung des ZEB 1 Proteins zur 180 - 200 kDa schweren Bande im Immunoblot (s. Abb. 7), im Folgenden die inhibitions- und stimulationsbedingten Mengenveränderungen dieser ZEB 1 Isoform analysiert.

In der NSCLC-Zelllinie H358 kam es durch die Inhibition der onkogenen K-Ras^{G12C} Proteine für 48 h zu einem Abfall der ZEB 1 Proteinmenge, wie in Abbildung 17 A erkennbar (AMG 510: 0,76 fach; MRTX 849: 0,7 fach). Durch die TGF-β1 Stimulation kam es zu einem Anstieg der ZEB 1 Proteinmenge auf das 2,39 fache des Kontrollwerts. Nach Behandlung der H358 Zellen mit TGF-β1 und den K-Ras^{G12C} Inhibitoren war die ZEB 1 Proteinmenge ebenfalls erhöht. Sie betrug im Mittel das 1,78 fache (TGF-β1 + AMG 510) und 2,06 fache (TGF-β1 + MRTX 849) des Kontrollwerts.

In der Adenokarzinomzelllinie HCC44 kam es nach der Inkubation der Zellen mit den K-Ras^{G12C} Inhibitoren AMG 510 oder MRTX 849 und / oder TGF-β1 für 48 h zu keiner Veränderung der ZEB 1 Proteinmenge gegenüber dem DMSO-Zitrat Kontrollwert (s. Abb. 17 B).

Die K-Ras^{G12C} Inhibitoren zeigten in den H23 Zellen weder Effekte auf die ZEB 1 Proteinmenge unter Kontrollbedingungen noch auf die TGF-β1 stimulierte ZEB 1 Proteinmenge. TGF-β1 allein führte nach 48 h zu einem leichten Anstieg der ZEB 1 Proteinmenge auf das 1,26 fache (SD ± 0,08) des Kontrollwerts (s. Abb. 17 C).

Die K-Ras^{G12C} Inhibitoren beeinflussten die ZEB 1 Proteinmenge nur in den H358 Zellen. In den anderen beiden Zelllinien hatten die Inhibitoren keinen Einfluss auf die ZEB 1 Proteinmenge. TGF-β1 führte in den H358 und H23 Zellen zu einer Erhöhung der ZEB 1 Proteinmenge.

Als Beladungskontrolle wurde Lamin A / C verwendet, ein Kernprotein.

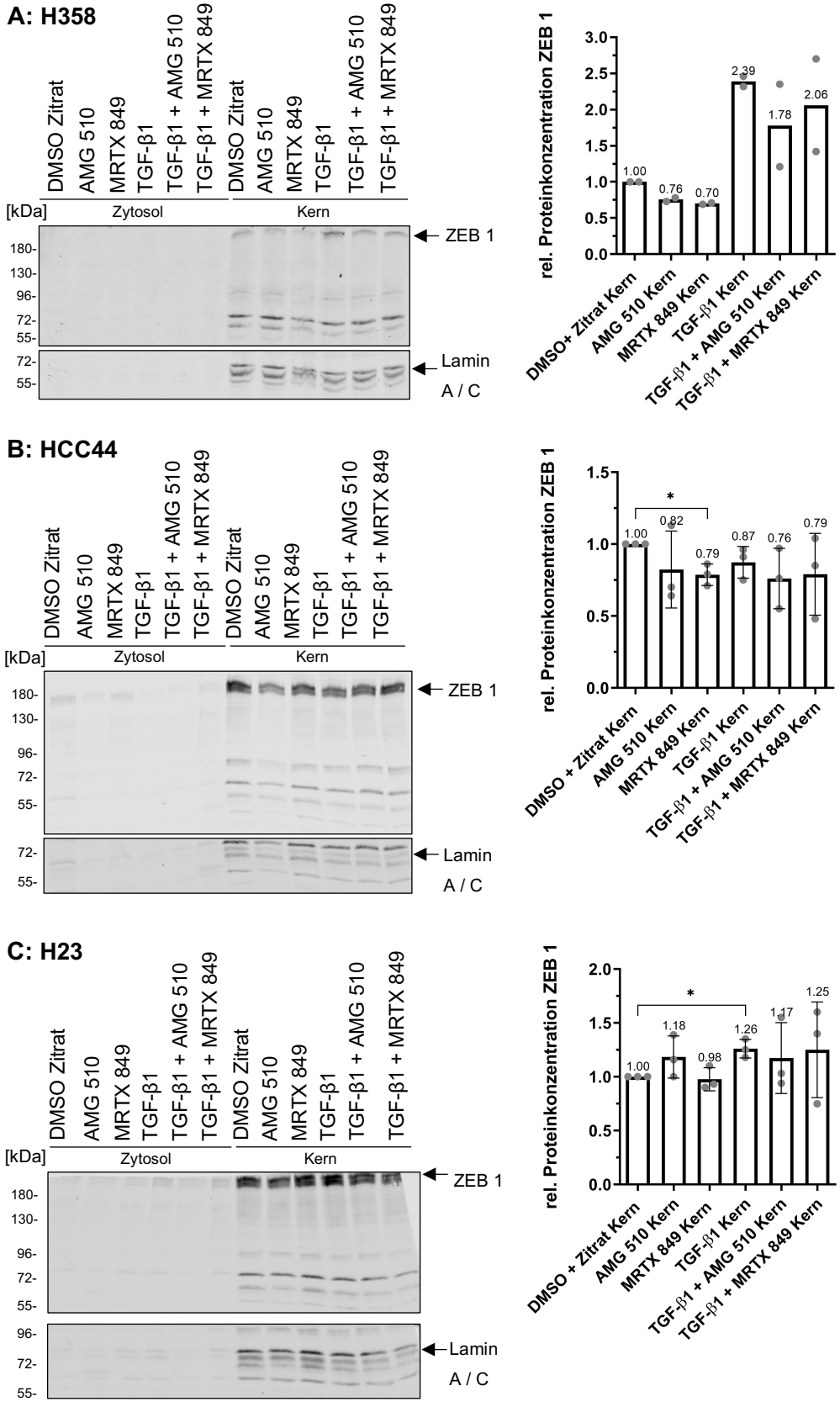


Abbildung 17: Veränderungen der ZEB 1 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation von TGF-β1

H358, HCC44 und H23 Zellen wurden für 48 h mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Je 30 µg Protein der Kern- bzw. Zytosolfraktion wurden in einem 8,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt. Das ZEB 1 Protein wurde mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus zwei (H358) bzw. drei (H23, HCC44) unabhängigen Versuchen. Die densitometrische Auswertung erfolgte normiert auf die Beladungskontrolle Lamin A / C und ist in Relation zur Menge der Kontroll-Kernfraktion (DMSO + Zitrat) (≙ 1,0) angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen sowie die Einzelwerte (•). Die statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte in Bezug auf die DMSO-Zitrat Kontrolle bzw. die TGF-β1 stimulierte Fraktion (Signifikanzniveau $p < 0,05$ = *) wurde mittels eines Einstichproben sowie ungepaarten t-Tests analysiert.

4.5.4 Analyse der Veränderungen der E-Cadherin Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

Abbildung 18 zeigt ausschließlich die unlösliche Fraktion der H358 Zellen, da sich E-Cadherin, wie bereits in Abbildung 6 gezeigt, hauptsächlich in diesen Fraktionen befand. Nach 48-stündiger Stimulation mit TGF-β1 konnte in der unlöslichen Fraktion der H358 Zellen ein Abfall der E-Cadherin Menge auf das 0,6 fache (SD ± 0,28) des Kontrollwerts ermittelt werden. Dieser Abfall erwies sich als nicht signifikant.

Die Proteinmenge veränderte sich gegenüber dem Kontrollwert durch die Inhibition der onkogenen K-Ras^{G12C} Proteine sowie der K-Ras^{G12C} Inhibition zusammen mit der TGF-β1 Stimulation in den unlöslichen Fraktionen nicht (s. Abb. 18).

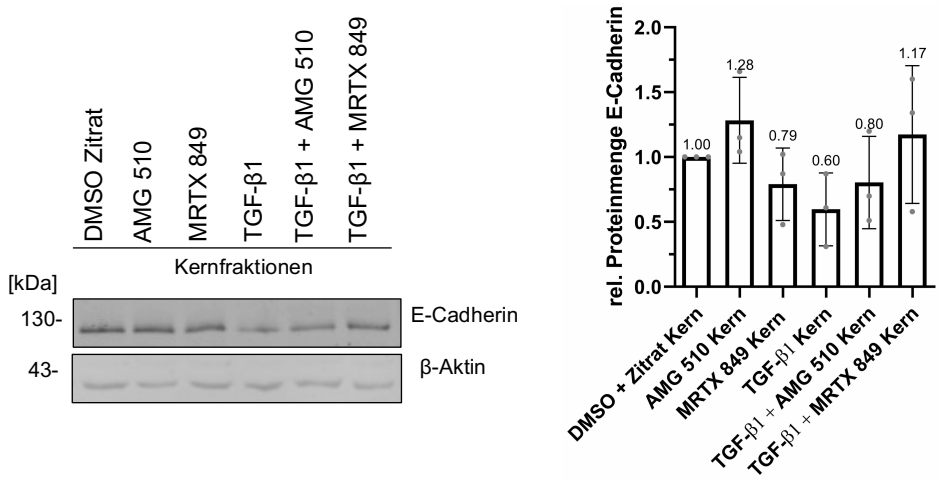


Abbildung 18: Veränderungen der E-Cadherin Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

H358 Zellen wurden für 48 h mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Je 30 µg Protein der Kern- und Zytosolfraktion wurden in einem 10 %igen Acrylamidgel aufgetrennt. Das E-Cadherin Protein wurde mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen. Die densitometrische Auswertung erfolgte normiert auf die Beladungskontrolle β-Aktin und ist in Relation zur Menge der Kontroll-Kernfraktion (DMSO + Zitrat) (≙ 1,0) angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen sowie die Einzelwerte (•). Die statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte in Bezug auf die DMSO-Zitrat Kontrolle bzw.

die TGF-β1 stimulierte Fraktion wurde mittels eines Einstichproben bzw. ungepaarten t-Tests analysiert. Hierbei kam es zu keinem signifikanten Ergebnis.

4.5.5 Analyse der Veränderungen der Vimentin Proteinmenge und -lokalisation nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

Die Veränderungen der Proteinmenge von Vimentin wurden anhand von Gesamtlysaten nach 24 h Inkubationszeit mittels Immunoblot analysiert. In den H358 Zellen veränderte sich die Vimentin Proteinmenge nicht durch Inhibition der onkogenen K-Ras^{G12C} Proteine und / oder die Stimulation mit TGF-β1 (s. Abb. 19 A). Bei der zusätzlichen dritten Bande in der TGF-β1 Spur der H358 Zellen handelt es sich vermutlich um ein Artefakt aus einer vorherigen Färbung.

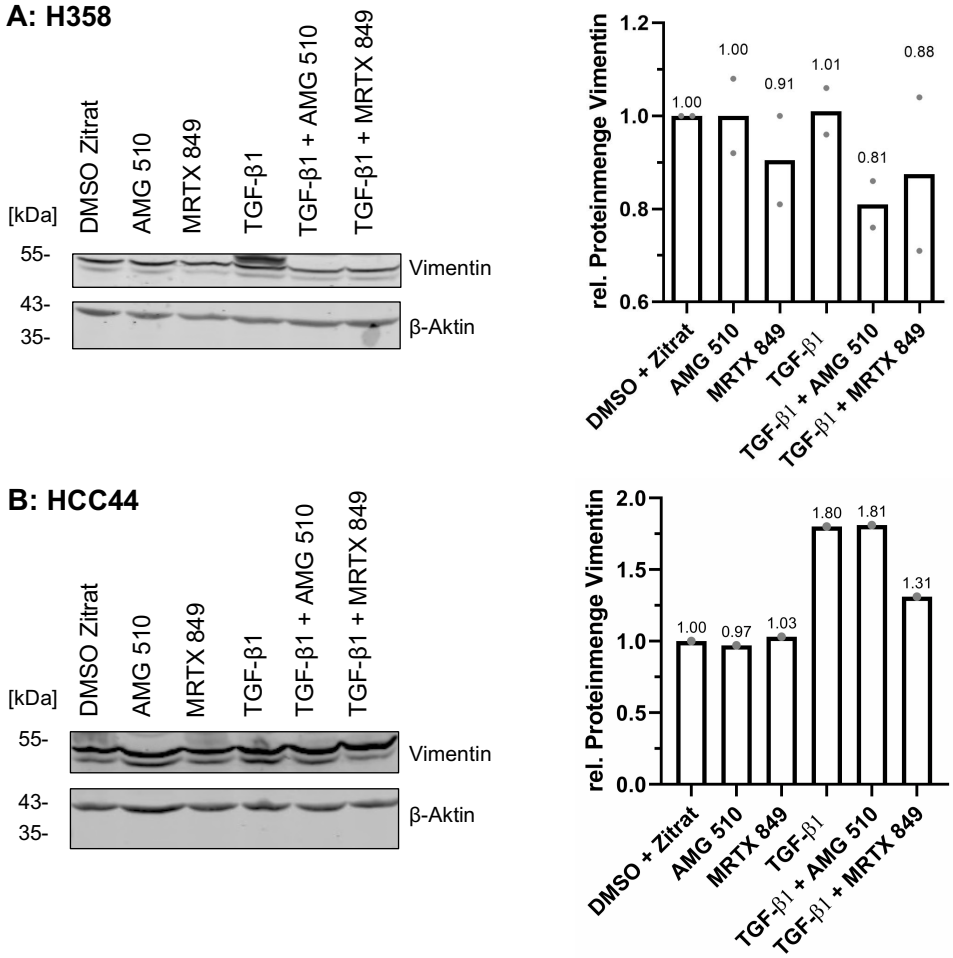


Abbildung 19: Veränderungen der Vimentin Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

H358 und HCC44 Zellen wurden für 24 h mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Je 75 µg Protein des RIPA-Gesamtlysats wurden in einem 12,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt. Das Vimentin Protein wurde mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Abgebildet wurde jeweils ein repräsentativer Blot aus einem (HCC44) bzw. zwei (H358) unabhängigen Versuchen. Die densitometrische Auswertung erfolgte normiert auf die Beladungskontrolle β-Aktin und ist in

Relation zur Menge der Kontroll-Kernfraktion (DMSO + Zitrat) (≙ 1,0) angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Einzelwerte (•).

In den HCC44 Zellen erhöhte sich die Vimentin Proteinmenge tendenziell durch die TGF-β1 Behandlung, sowie nach Behandlung der Zellen mit TGF-β1 und AMG 510 jeweils gegenüber dem Kontrollwert (s. Abb. 19 B). Aufgrund der kleinen Stichprobenanzahl lässt sich jedoch keine verlässliche Aussage machen.

Neben der Analyse mittels Western Blot wurde Vimentin auch in der immunzytochemischen Analyse nach der Behandlung mit K-Ras^{G12C} Inhibitoren und / oder TGF-β1 untersucht. Die Inkubationszeit betrug 48 h. Das Vimentin Protein, welches sich in feinen Filamenten durch die gesamte Zelle erstreckte, wurde mit einem spezifischen Antikörper in den HCC44 Zellen rot (s. Abb. 20) und in den H358 Zellen grün (s. Abb. 25 Anhang) angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt. Vimentin kam in den HCC44 und H358 Zellen am meisten im perinukleären Zytoplasma vor und die Proteinmenge nahm zur Peripherie der einzelnen Zelle hin ab. Die Zellkerne enthielten kein Vimentin und wurden von den Filamenten ausgespart (s. Abb. 20 A - F & 25 Anhang A - F). Die Filamente waren radial nach außen orientiert und bildeten ein feines Maschenwerk oder lagen parallel nebeneinander und erstreckten sich in Längsrichtung durch die gesamte Zelle. Durch den Einfluss der K-Ras^{G12C} Inhibitoren wurden die HCC44 Zellen länglicher und größer (s. Abb. 20 B & C). Auch die Vimentin Filamente waren vermehrt parallel zur Längsachse der Zellen orientiert. Die feinen und gerade verlaufenden Filamente erschienen dicker. In HCC44 Zellen, die sowohl mit einem der K-Ras^{G12C} Inhibitoren als auch TGF-β1 behandelt wurden, bildeten die Vimentin Filamente ein feines Maschenwerk (s. Abb. 20 E & F).

Auch in den H358 Zellen konnte in polygonal geformten Zellen (nicht TGF-β1 stimulierten Zellen) die Ausbildung eines Maschenwerks beobachtet werden, sowie in länglich geformten Zellen (TGF-β1 stimulierten Zellen) eine vermehrte Orientierung der Filamente parallel zur Längsachse der Zelle (vgl. die morphologischen Zellveränderungen in Kapitel 4.4). Aufgrund der kleineren Größe der H358 Zellen, im Vergleich zu den HCC44 Zellen, konnten die Veränderungen jedoch nicht so gut beobachtet werden (s. Abb. 25 Anhang).

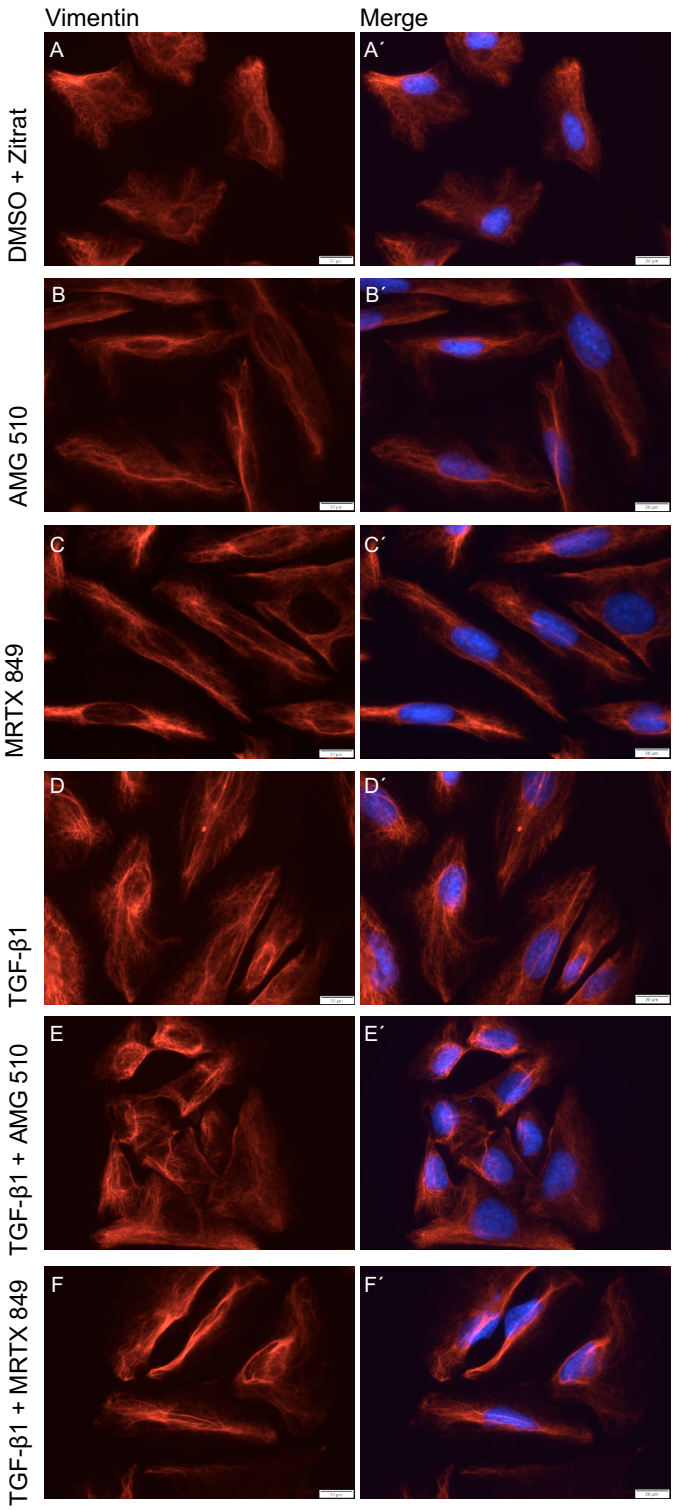


Abbildung 20: Immunzytochemische Analyse von Vimentin in HCC44 Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

HCC44 Zellen wurden mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Nach 48 h Inkubationszeit erfolgte die Fixierung mit 2 % Formaldehyd und Anfärbung der Proteine mit spezifischen Antikörpern und fluoreszierenden Zweitantikörpern (Vimentin – Cy3 - rot). Die Zellkerne wurde in Blau mittels DAPI dargestellt und sind in A´-F´ in der Überlagerung *(Merge)* mit Vimentin dargestellt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einem 60 x Objektiv. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt.
Maßstab ▭ : 20 µm

4.6 Analyse der Veränderungen der ESRP 1 & 2 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

Die beiden Isoformen des ESRP 1 und 2 konnten am besten in der NSCLC-Zelllinie H358 angefärbt werden und zeigten in dieser die eindeutigsten Veränderungen (s. Abb. 6).

Wie in Abbildung 21 A erkennbar veränderte sich die ESRP 1 Proteinmenge in den Zytosolfraktionen weder durch Inhibition der onkogenen K-Ras^{G12C} Proteine noch durch die TGF-β1 Stimulation oder die Kombination beider. Eine Ausnahme bildete die Behandlung mit TGF-β1 und MRTX 849, welche zu einer Abnahme der ESPR 1 Proteinmenge gegenüber dem Kontrollwert führte. In den Kernfraktionen veränderte sich die ESRP 1 Proteinmenge nach der 48-stündigen Inhibition der onkogenen K-Ras^{G12C} Proteine nicht gegenüber der DMSO-Zitrat Kontrolle. Durch die TGF-β1 Stimulation fiel die Proteinmenge in der Kernfraktion signifikant auf das 0,57 fache des Kontrollwerts ab (SD ± 0,16). H358 Zellen, die mit TGF-β1 und einem der beiden K-Ras Inhibitoren behandelt wurden, zeigten ebenfalls erniedrigte ESRP 1 Proteinmengen in den Kernfraktionen gegenüber dem Kontrollwert (TGF-β1 + AMG 510: 0,66 ± 0,34; TGF-β1 + MRTX 849: 0,61 ± 0,27).

In den Zytosolfraktionen, der mit den K-Ras^{G12C} Inhibitoren behandelten H358 Zellen, zeigten sich keine Veränderungen der ESRP 2 Proteinmenge (s. Abb. 21 B). Die ESRP 2 Proteinmenge stieg in den Kernfraktionen der H358 Zellen nach Inhibition der onkogenen K-Ras^{G12C} Proteine gegenüber dem Kontrollwert an (AMG 510: 1,50 ± 0,53; MRTX 849: 1,58 ± 0,81). Die TGF-β1 Stimulation bewirkte einen signifikanten Abfall der ESRP 2 Menge auf das 0,28 fache (SD ± 0,26) des DMSO-Zitrat Kontrollwerts in der Kernfraktion und auf das 0,30 fache (SD ± 0,12) in der entsprechenden Zytosolfraktion. Die Behandlung der H358 Zellen mit einem der beiden K-Ras^{G12C} Inhibitoren und TGF-β1 bewirkte, dass die Proteinmenge von ESRP 2 sowohl in den Zytosol- als auch in den Kernfraktionen signifikant gegenüber dem Kontrollwert absank. Durch den Einfluss von TGF-β1 und AMG 510 betrug die ESRP 2 Menge in den Kernfraktionen das 0,42 fache des Kontrollwerts (SD ± 0,32) und durch TGF-β1 und MRTX 849 das 0,63 fache (SD ± 0,1). Der Unterschied der ESRP 2 Proteinmenge zwischen den TGF-β1 und K-Ras^{G12C} Inhibitor behandelten Kernfraktionen und der alleinig TGF-β1 stimulierten Kernfraktion erwies sich als nicht signifikant.

In den mit TGF-β1 und / oder K-Ras^{G12C} Inhibitor behandelten Zytosol- und Kernfraktionen veränderte sich die ESPR 2 Proteinmenge somit gleichsinnig. Es konnte kein Shift zwischen Kern- und Zytosolfraktionen beobachtet werden.

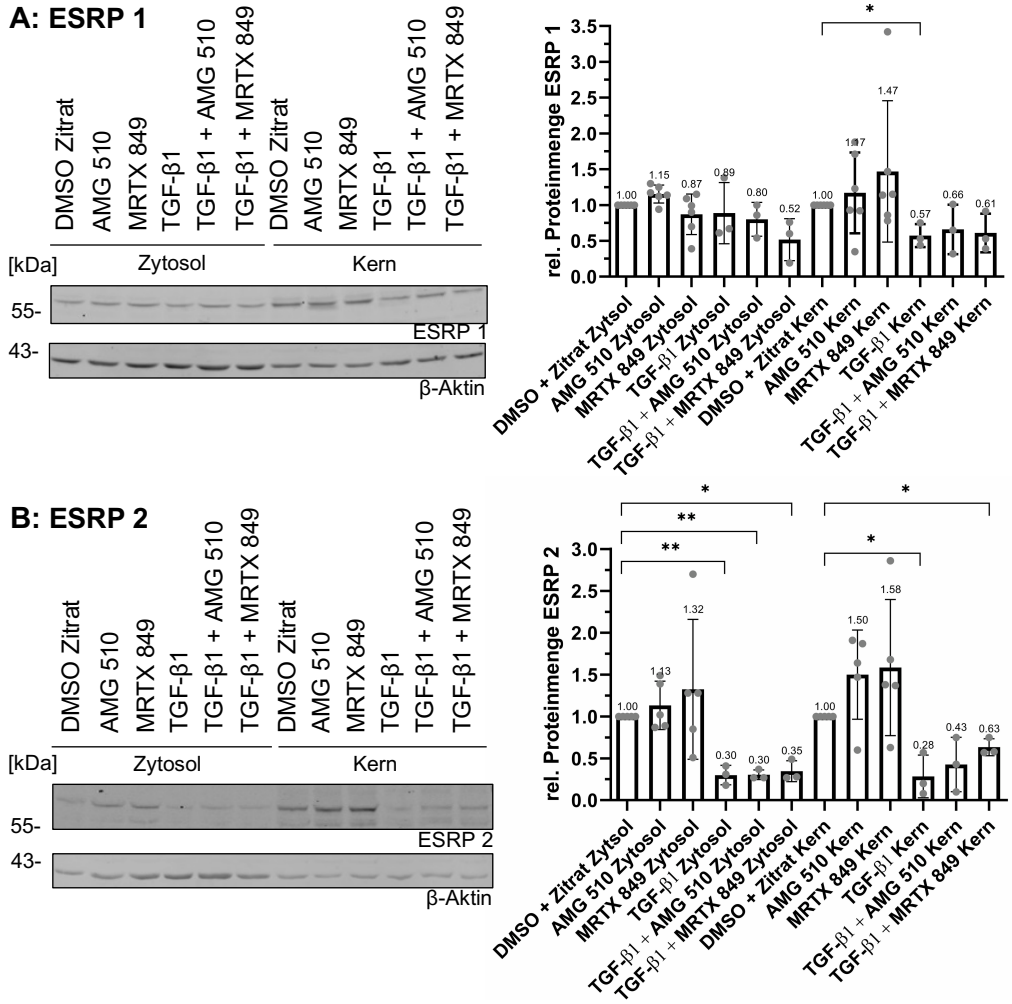


Abbildung 21: Veränderungen der ESRP 1 und 2 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1 in H358 Zellen

H358 Zellen wurden für 48 h mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Je 30 µg Protein der Kern- und Zytosolfraktion wurden in einem 12,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt. Die beiden Proteine wurden jeweils mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Blot aus min. drei unabhängigen Versuchen. Die densitometrische Auswertung erfolgte normiert auf die Beladungskontrolle β-Aktin und ist in Relation zur Menge der Kontrollfraktion (DMSO + Zitrat) (≙ 1,0) angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen sowie die Einzelwerte (•). Die statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte in Bezug auf die DMSO-Zitrat Kontrolle bzw. die TGF-β1 stimulierte Fraktion (Signifikanzniveau $p < 0,05$ = *, $p < 0,01$ = **) wurde mittels eines Einstichproben bzw. ungepaarten t-Tests analysiert.

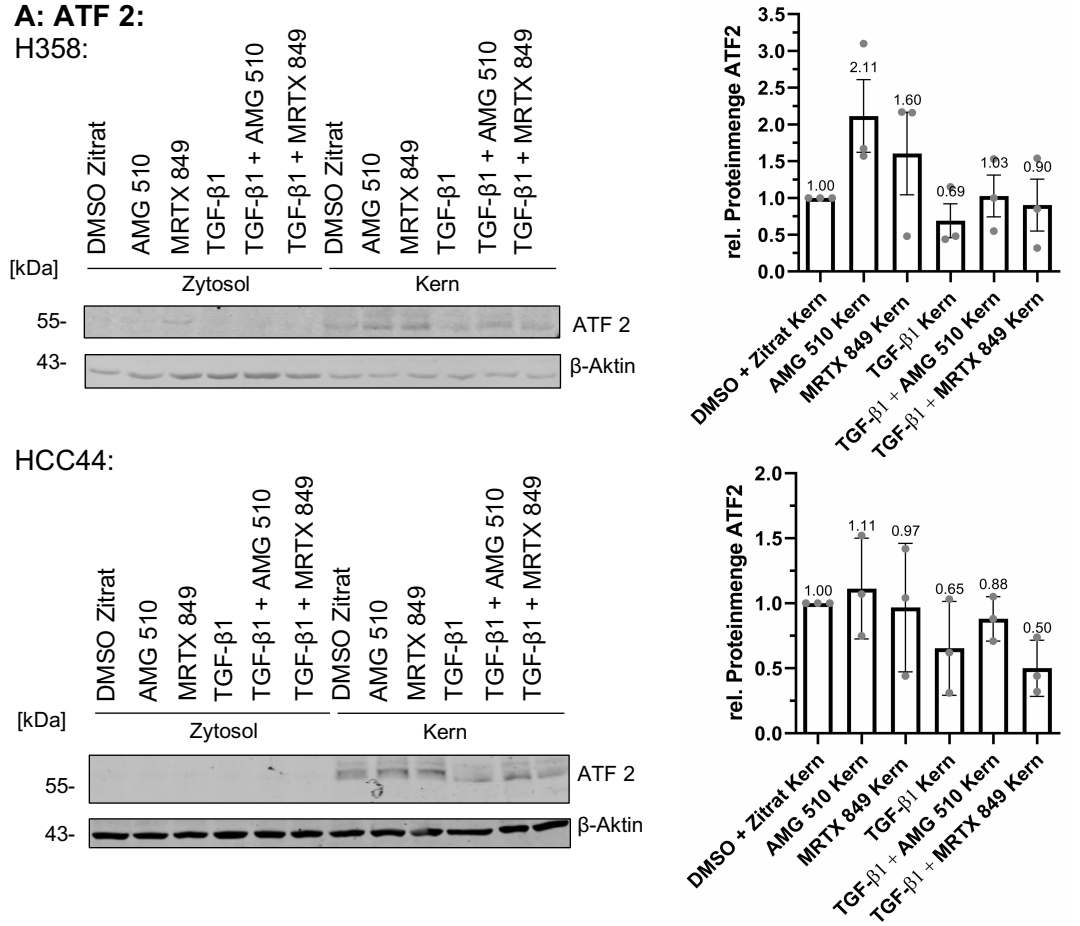
4.7 Analyse der Veränderungen der ATF 2 und STAT 3 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

Anhand des in Kapitel 4.5 beschriebenen Versuchsdesigns wurden auch die Transkriptionsfaktoren ATF 2 und STAT 3 analysiert.

Die Proteinmenge des ATF 2 Proteins verringerte sich in den Kernfraktionen der H358 Zellen durch die TGF-β1 Stimulation auf das 0,69 fache des Kontrollwerts (SD ± 0,40).

Durch AMG 510 oder MRTX 849 stieg die ATF 2 Proteinmenge tendenziell an (s. Abb. 22A H358). In den HCC44 Zellen ließ sich nicht eindeutig eine Erniedrigung der ATF2 Proteinmenge nach TGF-β1 Stimulation nachweisen (s. Abb. 22 A HCC44).

Die STAT 3 Proteinmenge verringerte sich in der Kernfraktion der H358 Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit TGF-β1 signifikant (s. Abb. 22 B). Die STAT 3 Proteinmenge fiel auf das 0,46 fache der DMSO-Zitrat Kontrolle ab (SD ± 0,1).



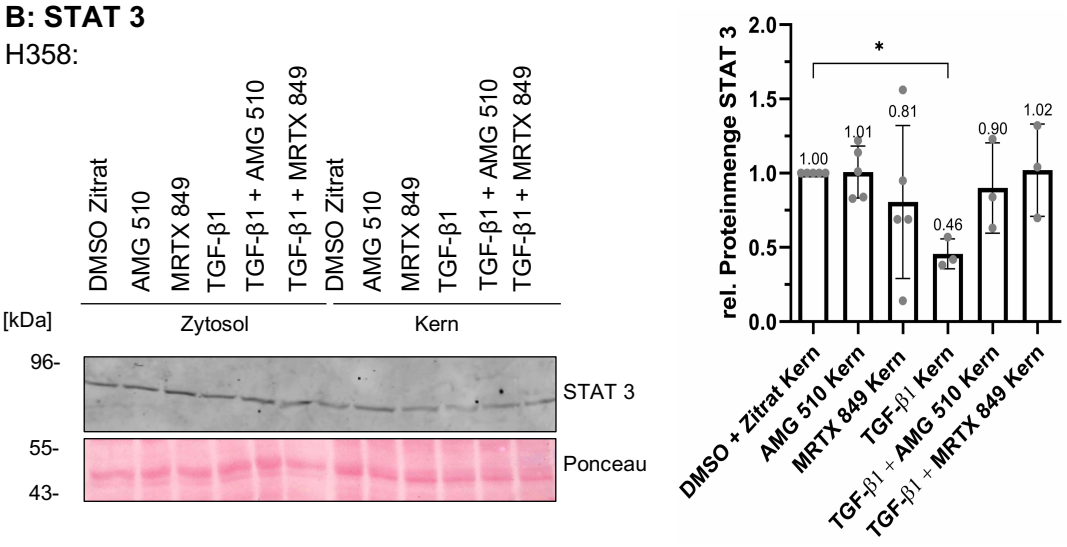


Abbildung 22: Veränderungen der Proteinmenge von ATF 2 und STAT 3 nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

HCC44 und H358 Zellen wurden für 48 h mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Je 30 µg Protein der Kern- und Zytosolfraktion wurden in einem 8,5 %igen (STAT 3) bzw. 10 %igen (ATF 2) Acrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden jeweils mittels eines spezifischen Antikörpers angefärbt. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Blot aus min. drei unabhängigen Versuchen. Die densitometrische Auswertung erfolgte normiert auf die Beladungskontrolle β-Aktin (ATF 2) bzw. Ponceau Rot (STAT 3) und ist in Relation zur Menge der Kontroll-Kernfraktion (DMSO + Zitrat) (≙ 1,0) angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen sowie die Einzelwerte (•). Die statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte in Bezug auf die DMSO-Zitrat Kontrolle bzw. die TGF-β1 stimulierte Fraktion (Signifikanzniveau $p < 0,05$ = *) wurde mittels eines Einstichproben bzw. ungepaarten t-Tests analysiert.

4.8 Analyse der Veränderungen der SMAD 2 / 3 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

Wie bereits in Abbildung 6 erkennbar enthielt die NSCLC Zelllinie H358 kaum SMAD 2 oder 3. Aus diesem Grund wurde diese Zelllinie im Folgenden nicht beschrieben oder abgebildet. Des Weiteren war bereits in Abbildung 6 zu beobachten, dass die Adenokarzinomzelllinien H23 und HCC44 wenig endogenes SMAD 3 besitzen. Zudem war es durch das ähnliche Molekulargewicht von SMAD 2 (52 kDa) und SMAD 3 (48 kDa), sowie die Anfärbung mit einem gemeinsamen Antikörper nicht möglich die Bandenstärke beider Proteine in der Densitometrie getrennt voneinander quantitativ zu beurteilen. Die Anfärbung von SMAD diente der Observation möglicher Veränderungen der Proteinmengen zwischen Zytosol- und Kernfraktionen.

Die Proteinmenge des SMAD 2 / 3 Proteins veränderte sich durch die K-Ras^{G12C} Inhibition und / oder die TGF-β1 Stimulation in den Kernfraktionen beider untersuchten NSCLC Zelllinien sowie in den Zytosolfraktionen der HCC44 Zellen nicht reproduzierbar (s. Abb. 26 A & B Anhang). In den Zytosolfraktionen der H23 Zellen fiel auf, dass es nach TGF-β1 Stimulation (0,53 fach; SD ± 0,08) und nach Behandlung mit TGF-β1 und K-Ras^{G12C} Inhibitoren (TGF-β1 + AMG 510: 0,50 fach, SD ± 0,1 / TGF-β1 + MRTX 849 0,49 fach, SD ± 0,16) zu einem signifikanten Abfall der SMAD 2 / 3 Proteinmenge gegenüber der jeweiligen Kontrolle kam (s. Abb. 26 B Anhang). Eindeutige Veränderungen in der Verteilung der Proteinmenge zwischen Zytosol- und Kernfraktionen konnten nicht beobachtet werden. Angedeutet ist eine Veränderung der Proteinmengenverteilung in beiden untersuchten Zelllinien nach Stimulation mit TGF-β1.

4.9 Lokalisationsanalyse von filamentösem Aktin (F-Aktin) und Vinculin nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

Sowohl der K-Ras als auch der TGF-β Signalweg spielen wichtige Rollen in Regulation des Zellzytoskeletts und der Zellmotilität. Aus diesem Grund wurden Aktin und Vinculin anhand von immunzytochemischen Analysen untersucht.

Die Aktin Filamente erstreckten sich durch die Peripherie der HCC44 und H358 Zellen und sparten dabei die Zellkerne aus. In Abbildung 23 und 27 (Anhang) sind die Zellkerne mittels DAPI blau angefärbt, sodass die Position der Zellkerne in der Überlagerung *(Merge)* mit der Lokalisation der Proteine F-Aktin (s. Abb. 23 A - F grün und Abb. 27 Anhang A – F rot) und Vinculin (s. Abb. 23 A´ - F´ rot) verglichen werden konnte.

Sowohl die mit DMSO und Zitrat behandelten HCC44 Zellen als auch die HCC44 Zellen, die mit K-Ras^{G12C} Inhibitoren und / oder TGF-β1 behandelt wurden, wiesen Stressfasern auf (s. grauer Pfeil Abb. 23 A - F). Die Ausbildung der Stressfasern war nach 48-stündiger TGF-β1 Stimulation am stärksten ausgeprägt (s. Abb. 23 D). Auch die mit TGF-β1 und K-Ras^{G12C} Inhibitoren behandelten HCC44 Zellen wiesen mehr Stressfasern auf (s. Abb. 23 E & F) als die Zellen, die alleinig mit den K-Ras^{G12C} Inhibitoren behandelt wurden (s. Abb. 23 B & C). Zudem fiel auf, dass die HCC44 Zellen durch den Einfluss von TGF-β1 länglicher wurden (s Abb. 23 D – F). Die mit TGF-β1 stimulierten Zellen zeigten vermehrt parallel zur Längsachse der Zelle ausrichtete Stressfasern im Gegensatz zu den K-Ras^{G12C} inhibierten Zellen. Die Kontrollzellen und die K-Ras^{G12C} inhibierten Zellen wiesen eher ein netzartig strukturiertes Aktin Zytoskelett auf (s. Abb. 23 A - C).

Bei hoher Vergrößerung erkennt man in der Immunzytochemie die grün gefärbten Aktin Filamente, die in einem orange-gelben Übergang in die rot gefärbten Vinculin Signale übergingen (s. Abb. 23 X, gewonnen aus E“ s. weißer Kasten). Vinculin befand sich an der Zellmembran in den fokalen Kontakten (s. exemplarisch graue Pfeilspitze Abb. 23 A´). Durch die TGF-β1 Stimulation wurden die Zelle länglicher und die Vinculin Proteine befanden sich nun hauptsächlich an den kurzen Seiten der Zellen (s. Abb. 23 D´) und nicht wie in den Kontrollzellen oder in den K-Ras^{G12C} inhibierten Zellen gleichmäßig verteilt an der gesamten Zellmembran (s. Abb. 23 B´& C´). Durch die Behandlung der HCC44 Zellen mit AMG 510 oder MRTX 849 und TGF-β1 war Vinculin über die gesamte Zellmembran verteilt. Die Anzahl der fokalen Kontakte pro Zelle (s. Tabelle 12 Anhang) erhöhten sich durch die K-Ras^{G12C} Inhibition gegenüber der DMSO-Zitrat Kontrolle nicht. Nach der TGF-β1 Stimulation erhöhte sich die Anzahl der fokalen Kontakte pro Zelle stark (DMSO-Zitrat: 55 fokale Kontakte / Zelle; TGF-β1: 113,67 fokale Kontakte / Zelle). Auch nach TGF-β1 Stimulation und gleichzeitiger Behandlung mit den K-Ras^{G12C} Inhibitoren war die Anzahl der fokalen Kontakte gegenüber den Kontrollzellen stark

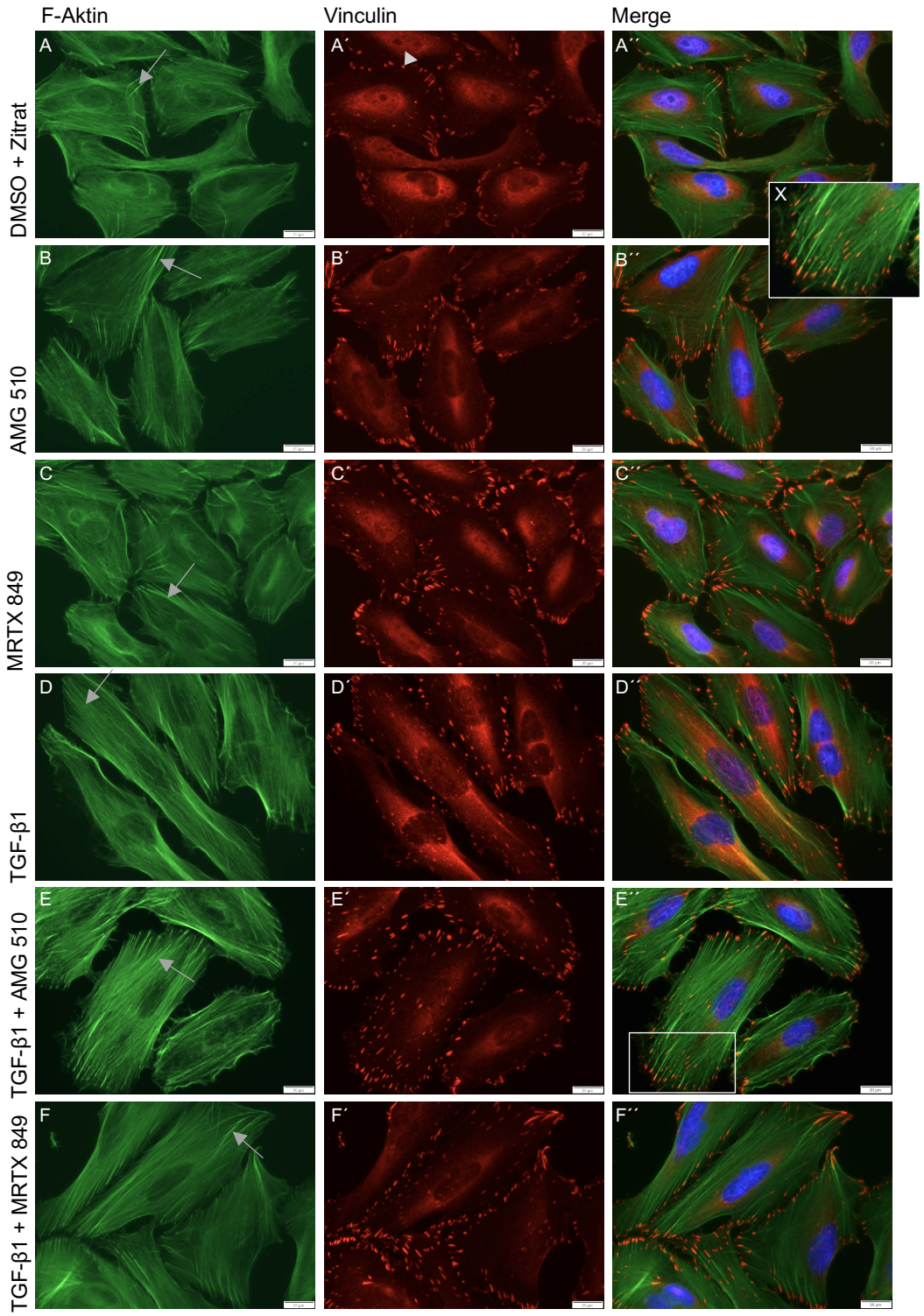


Abbildung 23: Immunzytochemische Analyse von F-Aktin und Vinculin in HCC44 Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

HCC44 Zellen wurden mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Nach 48 h Inkubationszeit erfolgte die Fixierung mit 2 % Formaldehyd. Vinculin wurde mittels eines spezifischen Antikörpers und fluoreszierenden Zweitantikörpers gefärbt (Vinculin – Cy3 – rot). F-Aktin wurde mit einer fluoreszenzmarkierten Sonde (Alexa FluorTM 488 Phalloidin – grün) gefärbt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI blau angefärbt und in A´´- F´´ in der Überlagerung *(Merge)* mit Vinculin und F-Aktin

dargestellt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einem 60 x Objektiv. Der Versuch wurde einmal (Vinculin) bzw. zweimal (Phalloidin) unabhängig durchgeführt. Maßstab ▭ : 20 µm
Der Abbildungsausschnitt X ist aus E``(s. weißer Kasten) gewonnen.
Pfeile: grauer Pfeil: Stressfasern; graue Pfeilspitze: fokaler Kontakt

erhöht (TGF-β1 + AMG 510: 108 fokale Kontakte / Zelle; TGF-β1 + MRTX 849: 117 fokale Kontakte / Zelle).

Aufgrund ihrer kleinen Größe und dem kaum vorhandenen Zytoskelett wurden H23 Zellen nicht angefärbt.

In den H358 Zellen zeigte sich ebenfalls eine Ausbildung von Stressfasern nach Stimulation mit TGF-β1 sowie TGF-β1 und den K-Ras^{G12C} Inhibitoren (s. Abb. 27 Anhang). Aufgrund der kleineren Größe der Zellen sind diese Veränderungen deutlicher schlechter zu beobachten wie in den HCC44 Zellen. Die Stressfasern sind vor allem in den TGF-β1 behandelten Zellen parallel zur Längsachse der Zellen ausgerichtet.

4.10 Analyse der Veränderungen der β- und ɣ-Catenin Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

Die Catenine, β- und ɣ-Catenin, spielen beide eine wichtige Rolle in den Zell-Zell-Kontakten (vgl. Kapitel 1.3) sowie in der Signaltransduktion der Zelle. Aufgrund der vielfältigen Funktionsweisen und der Rolle in der EMT wurden β- und ɣ-Catenin im Folgenden analysiert. Insbesondere sollte auf einen Shift zwischen zytosol- und kernhaltigen Fraktionen geachtet werden.

Die H358 Zellen wiesen in den Zytosolfraktionen einen Abfall der β-Catenin Proteinmenge sowohl nach Inhibition der onkogenen K-Ras^{G12C} Proteine (AMG 510: 0,62 ± 0,24; MRTX 849: 0,52 ± 0,22) als auch nach TGF-β1 Stimulation (0,60 ± 0,23) gegenüber dem Kontrollwert auf. Die Behandlung mit TGF-β1 und einem der K-Ras^{G12C} Inhibitoren führte in den Zytosolfraktionen zu keiner Veränderung der β-Catenin Proteinmenge (s. Abb. 24 A).

In den Zytosolfraktionen der HCC44 und H23 Zellen führt die Stimulation mit TGF-β1 zu einer Erhöhung der β-Catenin Proteinmenge gegenüber dem Kontrollwert (HCC44: 1,67 ± 0,67; H23: 1,52 ± 0,19). Auch die gleichzeitige Behandlung mit TGF-β1 und einem der beiden K-Ras^{G12C} Inhibitoren führte zum tendenziellen Anstieg der β-Catenin Proteinmenge gegenüber dem Kontrollwert (s. Abb. 24 B & C).

In den Kernfraktionen aller drei verwendeten NSCLC-Zelllinien kam es nach Inhibition der onkogenen K-Ras^{G12C} Proteine und / oder Stimulation mit TGF-β1 zu keiner reproduzierbaren Veränderung der β-Catenin Proteinmenge gegenüber dem jeweiligen Kontrollwert (s. Abb. 24 A-C).

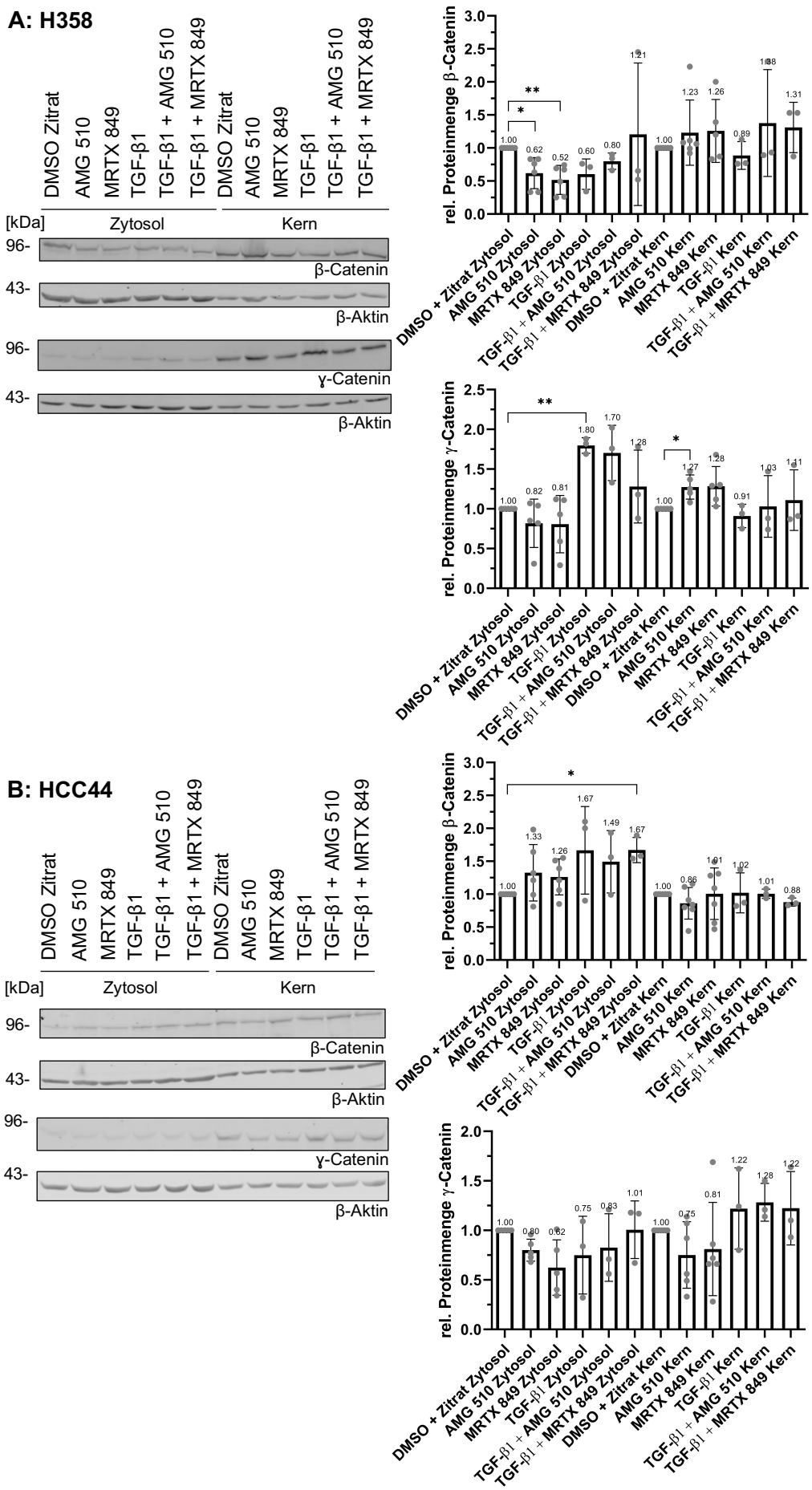
In der immunzytochemischen Anfärbung von β-Catenin in den HCC44 Zellen zeigte sich das Protein vor allem in der Zellmembran und den Zell-Zell-Kontakten (s. Abb. 28 Anhang). Eine quantitative Aussage über die Proteinmenge sowie die Anzahl und Veränderung der Zell-Zell-Kontakte lässt sich daran nicht treffen. Eine verstärkte Anfärbung des Nukleus nach K-Ras^{G12C} Inhibition kann diskutiert werden.

In der NSCLC-Zelllinie H358 waren in den Kernfraktionen, die zuvor entweder mit AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit TGF-β1 stimuliert wurden, keine reproduzierbaren Mengenveränderungen des ɣ-Catenin-Proteins im Vergleich zum DMSO-Zitrat Kontrollwert detektierbar. Ähnlich wie die β-Catenin Proteinmenge, stieg die ɣ-Catenin-Proteinmenge durch die TGF-β1 Stimulation in der Zytosolfraktion signifikant auf das 1,8 fache der DMSO-Zitrat Kontrolle an (SD ± 0,1). Die Inkubation der H358 Zellen mit AMG 510 und TGF-β1 führte zu einer 1,70 fach erhöhten ɣ-Catenin Menge (SD ± 0,35) gegenüber dem Kontrollwert (s. Abb. 24 A).

Die ɣ-Catenin Proteinmenge veränderte sich in der Zelllinie HCC44 weder durch Inhibition der onkogenen K-Ras^{G12C} Proteine noch durch Stimulation mit TGF-β1 oder die Kombination aus Inhibitor und TGF-β1 (s. Abb. 24 B).

In den Adenokarzinomzellen der Zelllinie H23 kam es in den Zytosolfraktionen weder durch Inhibition der onkogenen K-Ras^{G12C} Proteine noch durch Stimulation mit TGF-β1 oder die Kombination aus Inhibitor und TGF-β1 zu einer eindeutigen Veränderung der ɣ-Catenin-Proteinmenge. Durch den K-Ras^{G12C} Inhibitor AMG 510 kam es in den Kernfraktionen zu einem Anstieg der ɣ-Catenin-Proteinmenge auf das 1,65 fache (SD ± 0,42) des Kontrollwerts (s. Abb. 24 C). Die TGF-β1 Stimulation allein und in Kombination mit einem der K-Ras^{G12C} Inhibitoren führte in den Kernfraktionen zu einer verminderten ɣ-Catenin Proteinmenge (s. Abb. 24 C).

Eine Umverteilung der β- oder ɣ-Catenin Proteinmenge zwischen Zytosol-und Kernfraktion konnte nicht beobachtet werden. Angedeutet ist ein Shift zwischen Zytosol- und Kernfraktion sowohl der β- als auch der ɣ-Catenin Proteinmenge nach K-Ras^{G12C} Inhibition in den H358 Zellen (s. Abb. 24 A).


A: H358
DMSO Zitrat
AMG 510
MRTX 849
TGF-β1
TGF-β1 + AMG 510
TGF-β1 + MRTX 849
DMSO Zitrat
AMG 510
MRTX 849
TGF-β1
TGF-β1 + AMG 510
TGF-β1 + MRTX 849
[kDa]
Zytosol
Kern
96-
β-Catenin
43-
β-Aktin
96-
γ-Catenin
43-
β-Aktin
rel. Proteinmenge β-Catenin
rel. Proteinmenge γ-Catenin
DMSO + Zitrat Zytosol
AMG 510 Zytosol
MRTX 849 Zytosol
TGF-β1 Zytosol
TGF-β1 + AMG 510 Zytosol
TGF-β1 + MRTX 849 Zytosol
DMSO + Zitrat Kern
AMG 510 Kern
MRTX 849 Kern
TGF-β1 Kern
TGF-β1 + AMG 510 Kern
TGF-β1 + MRTX 849 Kern
B: HCC44
DMSO Zitrat
AMG 510
MRTX 849
TGF-β1
TGF-β1 + AMG 510
TGF-β1 + MRTX 849
DMSO Zitrat
AMG 510
MRTX 849
TGF-β1
TGF-β1 + AMG 510
TGF-β1 + MRTX 849
[kDa]
Zytosol
Kern
96-
β-Catenin
43-
β-Aktin
96-
γ-Catenin
43-
β-Aktin
rel. Proteinmenge β-Catenin
rel. Proteinmenge γ-Catenin
DMSO + Zitrat Zytosol
AMG 510 Zytosol
MRTX 849 Zytosol
TGF-β1 Zytosol
TGF-β1 + AMG 510 Zytosol
TGF-β1 + MRTX 849 Zytosol
DMSO + Zitrat Kern
AMG 510 Kern
MRTX 849 Kern
TGF-β1 Kern
TGF-β1 + AMG 510 Kern
TGF-β1 + MRTX 849 Kern

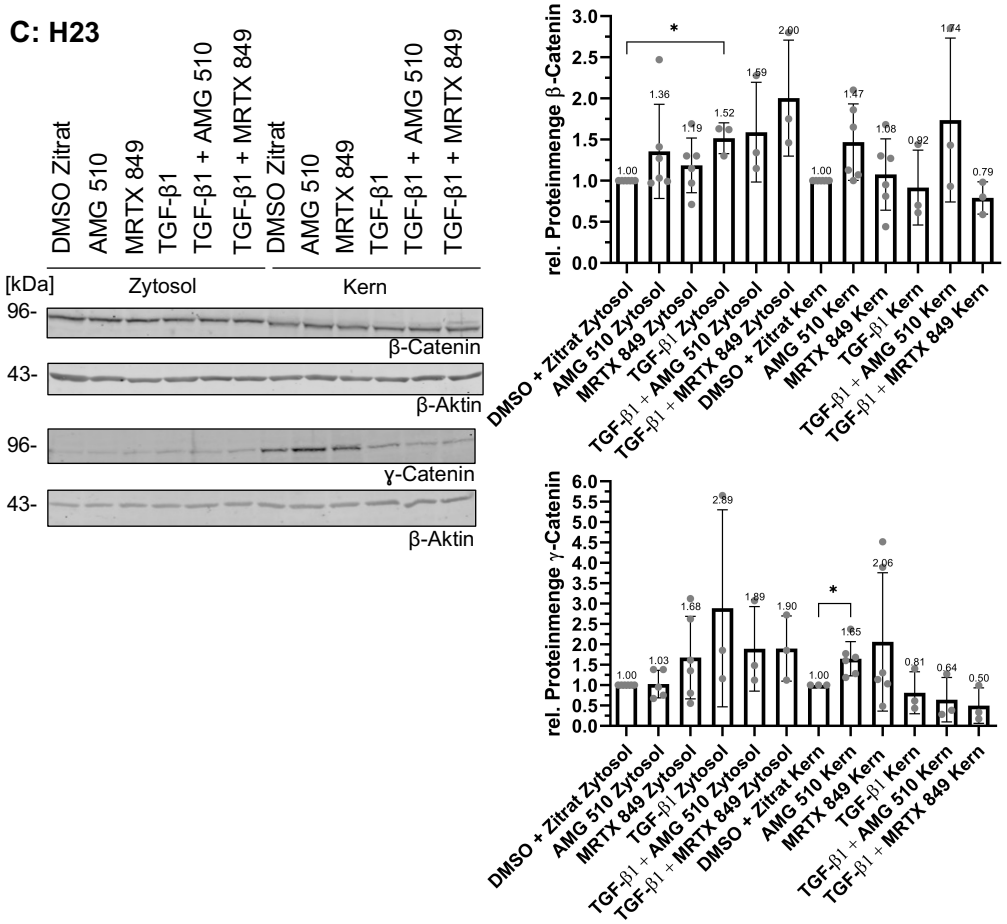


Abbildung 24: Veränderungen der β- und γ-Catenin Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

H23, HCC44 und H358 Zellen wurden für 48 h mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Je 30 µg Protein der Kern- und Zytosolfraktion wurden in einem 8,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Blot aus min. drei unabhängigen Versuchen.

Die densitometrische Auswertung erfolgte normiert auf die Beladungskontrolle β-Aktin und ist in Relation zur Menge der Kontroll-Kern- bzw. Zytosolfraktion (DMSO + Zitrat) (≙ 1,0) angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen sowie die Einzelwerte (•). Die statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte in Bezug auf die DMSO-Zitrat Kontrolle bzw. die TGF-β1 stimulierte Fraktion (Signifikanzniveau $p < 0,05$ = *, $p < 0,01$ = **) wurde mittels eines Einstichproben sowie ungepaarten t-Tests analysiert.

5 Diskussion

Die K-Ras^{G12C} Mutation ist die häufigste *KRAS* Mutation im NSCLC (Thai *et al.*, 2021a) und führt zu ungehemmtem Zellwachstum (Cekani *et al.*, 2022). Mit der Entdeckung kovalenter K-Ras^{G12C} Inhibitoren (Lanman *et al.*, 2020) und deren Zulassung in Europa (European Medicines Agency, 2022, 2024) gibt es endlich zielgerichtete Therapieoptionen für diese fortgeschrittene Form des Lungenadenokarzinoms. Lungenkarzinome metastasieren rasch und werden zu 57% erst im fernmetastasierten Stadium diagnostiziert (Robert Koch-Institut, 2023). Innerhalb des Metastasierungsprozesses spielt die EMT eine herausragende Rolle (Kalluri and Weinberg, 2009). Während der EMT nehmen die epithelialen Tumorzellen einen mesenchymalen Phänotyp an (Hay, 1995) und erreichen durch die veränderte Proteinausstattung unter anderem eine größere Motilität mithilfe derer sie die Basalmembran überwinden können. Einer der Stimulatoren der EMT ist TGF-β1, welcher die EMT durch eine Vielzahl transkriptioneller und nicht transkriptioneller Veränderungen induziert (Xu *et al.*, 2009).

Eine mögliche Interaktion oder gar Synergie zwischen den Ras und TGF-β1 Signalwegen ist Gegenstand anhaltender Diskussionen und bislang nicht vollständig geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteine, die am EMT Prozess beteiligt sind, unter dem Einfluss von TGF-β1 und den K-Ras^{G12C} Inhibitoren AMG 510 oder MRTX 849 untersucht, um Rückschlüsse auf mögliche Interaktionen zwischen den Ras und TGF-β1 Signalwegen ziehen zu können. Hierbei konnten vor allem in den H358 Zellen Veränderungen der Proteinausstattung beobachtet werden, die auf eine mögliche Synergie des Ras und TGF-β Signalwegs hindeuten. Beispielweise bei den EMT Transkriptionsfaktoren Slug und ZEB 1 sowie von den RNA *Splicing* Proteinen ESRP1 und ESRP 2. Darüber hinaus konnten neben phänotypischen Veränderungen auch Veränderungen des Aktinzytoskeletts und der Fokalkontakte beobachtet werden. Die Diskussion der einzelnen Teilaspekte erfolgt in den folgenden Kapiteln.

5.1 Veränderungen der EMT-Transkriptionsfaktoren nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

Zu den klassischen EMT Transkriptionsfaktoren gehören Snail, Slug, Twist, ZEB 1 und ZEB 2. Ihnen ist gemeinsam, dass sie als direkter Repressor am E-Cadherin Promotor binden können und eine zentrale Rolle in der EMT Regulation spielen (Peinado *et al.*, 2007) (vgl. Kapitel 1.4.2.1). Aufgrund dieser zentralen Bedeutung wurde untersucht, ob und inwiefern der Ras und TGF-β1 Signalweg synergistisch auf die Proteinmenge dieser Transkriptionsfaktoren in NSCLC Zellen wirken.

5.1.1 Slug

In den hier durchgeführten Experimenten kam es nach der Behandlung der H358 Zellen mit MRTX 849 zu einer signifikanten Erniedrigung der Slug Proteinmenge. In den HCC44 Zellen kam es zu keiner Veränderung der Slug Proteinmenge durch die beiden K-Ras^{G12C} Inhibitoren (s. Abb. 11). Lea Henrich untersuchte in unserer Arbeitsgruppe den Einfluss der K-Ras^{G12C} Inhibitoren auf die Promotoraktivität des Slug-Reporter-*Assays* in H358 Zellen und konnte keine Veränderungen der mittleren relativen Promotoraktivität feststellen (Henrich, 2025)

In Kolonkarzinomzellen mit *KRAS* Mutation ist die Slug Expression höher als in Kolonkarzinomzellen mit Wildtyp *KRAS*. Die Aktivierung des Ras Signalwegs führt MAPK und PI3K vermittelt zur Erhöhung der Slug mRNA Menge (Wang *et al.*, 2010). In verschiedenen Literaturquellen wurde für unterschiedliche Zelllinien beschrieben, dass onkogenes Ras (Schmidt et al., 2005), sowie Proteine des MAPK Signalwegs wie Raf (Z. Wang et al., 2007) oder Erk (Conacci-Sorrell et al., 2003), die Slug mRNA Expression oder Proteinmenge erhöhen kann. Ein *Knockdown* von *KRAS* mittels shRNA verringert die Slug mRNA Menge (Wang *et al.*, 2010). Auch in A549 Zellen mit *KRAS* Mutation ist die Slug Expression höher als in A549 Zellen nach Transfektion von dominant negativem *KRAS*. Eine Inhibition des Ras Signalwegs mittels Transfektion von dominant negativem *KRAS* oder Inhibition von Mek oder Erk mittels siRNA führt zu einer Verringerung der Slug mRNA- und Proteinmenge gegenüber der Kontrolle (Khan *et al.*, 2016). In A549 und anderen NSCLC Zellen mit *KRAS* Mutation führte eine direkte und indirekte Erk Inhibition jedoch zur Steigerung der Slug Expression. Allerdings nicht in H358 Zellen (Cai *et al.*, 2022). In *KRAS* mutierten Lungen- und Pankreasadenokarzinomzellen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass auch die Depletion von Akt die Slug mRNA Menge verringert. Die Ergebnisse waren abhängig von der Zelllinie und der Akt Isoform (Geißert *et al.*, 2024). Bilal *et al.* (2021) zeigten zudem, dass Slug die AMG 510 Resistenz in Mia PaCa-2 Zellen vermittelt, da in AMG 510 resistenten Mia PaCa-2 Zellen Slug überexprimiert ist. Die Inhibition von Slug führt zu einer erneuten Sensitivität der Zellen gegenüber dem K-Ras Inhibitor.

In H358 Zellen zeigte sich nach TGF-β1 Stimulation eine erhöhte Slug Expression (Wang *et al.*, 2010). Aber auch in anderen Lungenkrebszelllinien führt die TGF-β Stimulation zu einer erhöhten Slug Expression (Shih and Yang, 2011; Kim *et al.*, 2020). Ebenso konnte in den hier durchgeführten Western Blots mit H358 und HCC44 Lysaten gezeigt werden, dass die TGF-β1 Stimulation zu einer erhöhten Slug Proteinmenge gegenüber dem Kontrollwert führt (s. Abb. 11).

Lee *et al.* (2024) konnten für Lungenadenokarzinomzellen verschiedene Gene identifizieren, die abhängig vom MAPK aktivierten *Ras-responsive element binding*

protein 1 (RREB 1) und TGF-β1 aktiviert werden. Dazu gehört auch das Gen *SNAI2* (kodiert für Slug). Die Rolle und Regulation von Slug ist allgemein nicht so umfassend untersucht wie die von Snail. Es ist unklar, ob Slug durch eine Synergie von TGF-β und Ras Signalwegen reguliert wird (Saitoh, 2023). Safina *et al.* (2009) zeigten anhand einer *Microarry* Analyse in NMuMG Zellen, dass die EMT-Transkriptionsfaktoren, darunter Snail, Slug und Twist, in der Maus nicht von RasV12 und TGF-β reguliert werden. Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass in H358 und HCC44 Zellen die TGF-β1 Stimulation und gleichzeitige K-Ras^{G12C} Inhibition zur Erhöhung der Slug Proteinmenge führt. In den H358 Zellen ist die Slug Proteinmenge nach TGF-β1 Stimulation und gleichzeitiger K-Ras^{G12C} Inhibition, vor allem mit MRTX 849, tendenziell geringer als nach alleiniger TGF-β1 Stimulation. Dieser Unterschied ist nicht signifikant (s. Abb. 11 A).
Somit gibt es sowohl in der Literatur, als auch in den Daten dieser Arbeit Hinweise auf eine mögliche Synergie des Ras und TGF-β1 Signalwegs in der Regulation der Proteinmenge des Transkriptionsfaktors Slug.

5.1.2 Snail

In den hier aufgeführten Experimenten kam es in den Zelllinien H358 und HCC44 nach K-Ras^{G12C} Inhibition zu keiner eindeutigen Veränderung der Snail Proteinmenge (s. Abb. 14). In einer parallel durchgeführten Arbeit von Lea Henrich konnte gezeigt werden, dass sich die K-Ras^{G12C} Inhibitoren ebenfalls nicht auf die Promotoraktivität des *Snai1* (kodiert für Snail) Reporter-*Assays* in H358 Zellen auswirken (Henrich, 2025).
In Brustkrebszellen konnte gezeigt werden, dass *KRAS* und *KRAS* Mutationen, darunter auch die K-Ras4B^{G12C} Mutation, die Expression der Snail mRNA und die Snail Proteinmenge steigern (Mabry *et al.*, 2024). Auch in Kolonkarzinomzellen mit *HRAS* Mutation zeigte sich eine Steigerung der Snail mRNA Expression (Wang *et al.*, 2010). Ebenso aktivieren *MEK* Mutationen (Barberà *et al.*, 2004) oder die Transfektion von konstitutiv aktivem *HRAS* den Snail Promotor (Peinado *et al.*, 2003). Die daraus resultierende Überlegung, dass eine K-Ras Inhibition die Snail Proteinmenge und die Promotoraktivität senken müsste, konnte hier nicht beobachtet werden. Auch in K-Ras^{G13D} mutierten Kolonkarzinomzellen (HCT-116) führte ein K-Ras *Knockdown* mittels shRNA nicht zu einer erniedrigten Snail mRNA Menge (Wang *et al.*, 2010). In A549 Zellen konnte durch Inaktivierung von Erk sogar eine verstärke Expression von Snail mRNA beobachtet werden (Cai *et al.*, 2022).
Dass TGF-β1 sowohl die Promotoraktivität von Snail in dosisabhängiger Weise (Peinado *et al.*, 2003) als auch die mRNA Menge (Shirakihara *et al.*, 2007) und die Proteinmenge (R.-Y. Liu *et al.*, 2014) steigert, ist bekannt und in vielen unterschiedlichen Zelllinien zu beobachten. In den hier durchgeführten Experimenten, vor allem in der Zelllinie H358,

konnte ebenfalls eine erhöhte Snail Proteinmenge nach TGF-β1 Stimulation detektiert werden (s. Abb. 14).

In der Literatur gibt es verschiedene Hinweise auf eine Synergie von Ras und TGF-β Signalwegen, die zu einer Steigerung der Snail Expression führen (Peinado *et al.*, 2003; Barberà *et al.*, 2004; Horiguchi *et al.*, 2009; Saitoh *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2020).

Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Transfektion von konstitutiv aktivem *HRAS* und die zusätzliche Stimulation mit TGF-β1 in Pankreaskarzinomzellen den Snail Promotor stärker aktivieren als die separate Transfektion oder Stimulation beziehungsweise die Transfektion von dominant negativem *HRAS* und die gleichzeitige Stimulation mit TGF-β (Peinado *et al.*, 2003).

Panc-1 Zellen, welche eine K-Ras^{G12V} Mutation aufweisen, zeigen erhöhte Snail mRNA und Proteinmengen nach Stimulation mit TGF-β. Wird K-Ras durch eine siRNA inhibiert, führt die Stimulation mit TGF-β nicht zu einer erhöhten Snail mRNA und Proteinmenge. Auch HeLa Zellen, die mit konstitutiv aktivem *KRAS* transfiziert wurden, weisen nach Transfektion und gleichzeitiger Stimulation mit TGF-β deutlich höhere Mengen von Snail mRNA und Protein, sowie eine erhöhte Promotoraktivität auf verglichen mit der alleinigen Transfektion oder Stimulation (Horiguchi *et al.*, 2009). Gleiches konnte in Epithelorganoiden der Bauchspeicheldrüse nach Transfektion von *KRAS^{G12V}* und Stimulation mit TGF-β beobachtet werden (Su *et al.*, 2020). In weiteren untersuchten Zelllinien, darunter auch in der Lungenkarzinomzelllinie A549, konnte gezeigt werden, dass nur in Zelllinien mit einer *RAS* Mutation die TGF-β Stimulation zur Snail Induktion führt (Horiguchi *et al.*, 2009). Als Grund für die synergistische Erhöhung von Snail wird das *Ras-responsive element binding protein 1* (RREB 1) diskutiert, welches MAPK abhängig aktiviert wird und in der Nähe des *Snai1* Promotors bindet. Dort bereitet es den Enhancer beispielsweise durch eine Veränderung der Chromatinstruktur für die Aktivierung vor. An den Enhancer bindet nach TGF-β Stimulation ein Komplex aus unter anderem phosphorylierten R-SMADs und induziert so die Transkription von Snail (Su *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2024). Lee *et al.* (2024) konnten dies auch in *RAS* mutierten Lungenadenokarzinomzelllinien zeigen. Die Inhibierung von Erk vermindert die RREB 1 Aktivität sowie dessen DNA Bindung und damit die Induktion von *Snai1* (Su *et al.*, 2020). A549 Zellen, die mit einem Mek Inhibitor vorbehandelt wurden, zeigen nach TGF-β Stimulation eine verringerte Snail Proteinmenge im Vergleich zu Zellen, die alleinig mit TGF-β stimuliert wurden (Liu *et al.*, 2012). Obwohl die *KRAS* mutierten A549 Zellen als resistent gegenüber Mek Inhibitoren beschrieben wurden (Yoon *et al.*, 2010). In *KRAS^{G12C}* mutierten Kolonkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass AMG 510 zur Inhibition der EMT und des TGF-β Signalwegs führen kann (Guo *et al.*, 2024). Ähnliches konnte in den hier durchgeführten Experimenten nicht beobachtet werden. Nach

Stimulation mit TGF-β1 und den K-Ras^{G12C} Inhibitoren kam es zu einer Erhöhung der Snail Proteinmenge gegenüber der DMSO und Zitrat Kontrolle (s. Abb. 14). Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zur alleinigen Stimulation mit TGF-β1 nachweisen.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass in den durchgeführten Experimenten keine eindeutigen Hinweise auf eine gemeinsame Regulation von Snail durch den Ras und TGF-β Signalweg gefunden werden konnten, kann sein, dass die EMT Induktion durch die TGF-β Stimulation oder Expression von Twist oder Snail zur Resistenz gegenüber K-Ras^{G12C} Inhibitoren in NSCLC Zelllinien führen kann. Dies kann über eine erhaltene PI3K Aktivierung vermittelt werden. Interessanterweise führt eine EMT Induktion durch TGF-β, Snail oder Twist zu einer Erhöhung der Menge des phosphorylierten Erks (Adachi *et al.*, 2020). Dies konnte ebenfalls in den hier aufgeführten Experimenten (s. Abb. 8) sowie in MDCK Zellen (Peinado *et al.*, 2003), NMuMG Zellen (Xie *et al.*, 2004), Pankreaskarzinomzellen (Ellenrieder *et al.*, 2001; Principe *et al.*, 2017) und Brustkrebszellen (Imamichi *et al.*, 2005; Virtakoivu *et al.*, 2015) beobachtet werden. Dies kann bereits auf eine Synergie zwischen TGF-β1 und Ras Signalweg hindeuten.

Die gleichzeitige Behandlung mit AMG 510 und die EMT-Induktion mittels TGF-β1 führten sowohl in den hier durchgeführten Experimenten (s. Abb. 8), als auch in den Experimenten von Adachi *et al.* (2020) zu einer verminderten pErk Proteinmenge gegenüber der alleinigen TGF-β1 Stimulation und der Kontrolle. Gleiches konnte durch den Mek Inhibitor U0126 und TGF-β in *KRAS* mutierten Pankreaskarzinomzellen beobachtet werden (Principe *et al.*, 2017). Somit muss in diesen Experimenten von einer Sensitivität der Zellen gegenüber den K-Ras^{G12C} Inhibitoren ausgegangen werden. Die Inhibitorsensitivität ist jedoch zelltypspezifisch: Während H358 Zellen eine hohe Sensitivität gegenüber dem K-Ras^{G12C} Inhibitor aufweisen, haben H23 und HCC44 Zellen eine eher intermediäre Sensitivität (Adachi et al., 2020).

5.1.3 ZEB 1

5.1.3.1 Detektion multipler ZEB 1 Signale im Western Blot: Isoformen und posttranslationale Modifikationen

Das Protein ZEB 1 (Funahashi *et al.*, 1993) ist ein Transkriptionsfaktor mit zentraler Bedeutung in der EMT (Gemmill *et al.*, 2011). Die kanonische Isoform von ZEB 1 hat ein Molekulargewicht von 124,07 kDa (The UniProt Consortium, 2024c). Jedoch konnte diese in den hier durchgeführten Western Blots nicht detektiert werden. Es konnte die Anfärbung mehrerer Banden zwischen 40 und 200 kDa beobachtet werden (s. Abb. 6, 7 und 17). Aufgrund der Verwendung von 8,5-prozentigen Acrylamidgelen konnten kleinere Banden nicht abgebildet werden. Somit ergibt sich die Frage, bei welcher dieser

Banden es sich um ZEB 1 handelt und wodurch die Veränderungen des Molekulargewichts und die multiplen Banden zustande kommen.

Neben der bereits beschriebenen 124,07 kDa schweren kanonischen Isoform gibt es vier weitere Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen und ein ähnlich großes Molekulargewicht, wie die kanonische Isoform aufweisen (s. Tabelle 13 Anhang). Darüber hinaus sind in der Proteindatenbank *UniProt* zum aktuellen Zeitpunkt vier weitere mögliche, deutlich kleinere Isoformen aufgeführt. Hingegen keine Isoform, welche schwerer als 124 kDa ist (s. Tabelle 13 Anhang).

In der vorliegenden Arbeit wurde der ZEB 1 Antikörper mit der Bestellnummer HPA027524 der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Der Hersteller des Antikörpers gibt in seinem aktuellen technischen Datenblatt kein Molekulargewicht von ZEB 1 an, sondern verweist auf die Charakterisierungsdaten des *Human Protein Atlas* (Sigma Aldrich, n.d.). Dort sind mit o.g. Antikörper in den verwendeten Glioblastomzellen multiple Banden zwischen ca. 60 – 180 kDa angefärbt inklusive der kanonischen Isoform (The Human Protein Atlas, n.d.). Somit konnte mit dem verwendeten Antikörper die kanonische Isoform gefärbt werden, indes nicht in den hier verwendeten NSCLC Zelllinien. Ein Versuch von Dirk Lohfink aus der Arbeitsgruppe, ZEB 1 mittels siRNA zu reprimieren, konnte eine ca. 180 kDa schwere Bande ZEB 1 zuordnen (s. Abb. 7). Das in dieser Arbeit beobachtete Molekulargewicht deckt sich mit den Angaben verschiedener Literaturquellen, die ebenfalls ZEB 1 Proteine mit einem erhöhten Molekulargewicht von 170 bis 250 kDa, je nach Quelle, nachweisen konnten (Wang *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2011; Dave *et al.*, 2011; Preca *et al.*, 2017; Perez-Oquendo and Gibbons, 2022a; Perez-Oquendo *et al.*, 2023). Die Diskrepanz der unterschiedlichen Molekulargewichte könnte durch posttranslationale Modifikationen (PTM) zustande kommen. PTMs sind Enzym-abhängige Veränderungen von Proteinen nach ihrer Translation, wie beispielsweise Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung oder Sumoylierung. Diese Proteinveränderungen können sich auf die Transkriptionsaktivität, Lokalisierung, Proteinstabilität, DNA-Bindung und Proteinkomplexinteraktionen auswirken (Perez-Oquendo and Gibbons, 2022a).

Ein Beispiel für eine PTM von ZEB 1 in NSCLC Zellen ist die Acetylierung an der Stelle K811. Neben vier ebenfalls vorhandenen Phosphorylierungen trägt diese zu einem erhöhten Molekulargewicht des ZEB 1 Proteins von ca. 225 kDa bei. Die K811 Acetylierung führt zu einer längeren Halbwertszeit und einer höheren Proteinstabilität von ZEB 1. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der acetylierten ZEB 1 Form und einer verstärkten Promotorbindung über Interaktionen mit dem NuRD Transkriptions-Co-Repressor-Komplex an die Gene für miR-200c und *SEMA3F*. Zudem korreliert die K811 Acetylierung mit einer verstärkten Zellinvasion und

Metastasierung von NSCLC Zellen durch die verstärkte Repression von E-Cadherin und erhöhte Expression von Vimentin und N-Cadherin (Perez-Oquendo *et al.*, 2023).
Inwiefern sich PTMs auf die Funktionen und die Proteinstabilität von ZEB 1 auswirken, ist nicht vollständig geklärt, da es hierzu kontroverse Daten gibt (Chang *et al.*, 2016; Perez-Oquendo and Gibbons, 2022a).
Mittels Massenspektrometrie wurden kürzere Transkriptionsvarianten von ZEB 1 entdeckt, die durch die nicht kanonische Öffnung von Leserahmen in der Transkription entstanden sind (Vanderperre *et al.*, 2013). Zudem kann die Degradation von Proteinen zu vermeintlich leichteren Banden von ZEB 1 im Western Blot führen (Gubelmann *et al.*, 2014; Bass *et al.*, 2017). Die Degradation kann durch unterschiedliche PTM wie Acetylierung und Ubiquitinierung begünstigt werden (Perez-Oquendo and Gibbons, 2022a), aber auch durch die verwendete Methodik des Western Blots selbst entstehen (Bass *et al.*, 2017). Zudem kann es zu unspezifischen Antikörperbindungen kommen, welche sich ebenfalls als Bande im Western Blot darstellen (Begum *et al.*, 2022).
Wie genau die unterschiedlich großen Formen von ZEB 1 zustande kommen, kann somit nicht vollständig geklärt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der hier aufgeführten Daten die 180 kDa große Isoform analysiert.

5.1.3.2 Veränderungen der ZEB 1 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

In den durchgeführten Experimenten kam es durch die Inhibition der onkogenen K-Ras^{G12C} Proteine in den H358 Zellen zu einem Abfall der ZEB 1 Proteinmenge (s. Abb. 17 A). Durch die Behandlung mit TGF-β1 allein oder in Kombination mit den K-Ras^{G12C} Inhibitoren kam es zu einem Anstieg der ZEB 1 Proteinmenge. In der Adenokarzinomzelllinie HCC44 kam es nach der Inkubation der Zellen mit den K-Ras^{G12C} Inhibitoren und / oder TGF-β1 für 48 h zu keiner Veränderung der ZEB 1 Proteinmenge gegenüber dem Kontrollwert (s. Abb. 17 B). In den H23 Zellen verursachen die K-Ras^{G12C} Inhibitoren weder allein noch nach gleichzeitiger Stimulation mit TGF-β1 Veränderungen der ZEB 1 Proteinmenge. TGF-β1 allein führte zu einem Anstieg der ZEB 1 Proteinmenge (s. Abb. 17 C). Somit ergeben sich in den hier erhobenen Daten nur in den H358 Zellen Hinweise auf eine gemeinsame Regulation von ZEB 1 durch Ras und TGF-β1.
Die Induktion von onkogenem *HRAS* in Brustkrebszellen (De Blander *et al.*, 2024) oder onkogenem *KRAS* in Kolon- (Sun *et al.*, 2023) sowie in Lungenadenokarzinomzellen (Y. Liu *et al.*, 2014) führt zu einer erhöhten Menge ZEB 1 mRNA und / oder Protein. Hierfür greift der Ras Signalweg an unterschiedlichen Punkten an.

Zum einen phosphoryliert und aktiviert konstitutiv aktives Erk 1 und 2 die E26 *transformation-specific transcription factors* 1 und 2 (ETS 1 / 2). Diese binden an die ETS Bindestelle im ZEB 1 Promotor (Dittmer, 2015) und steigern so die ZEB 1 Expression (Shirakihara *et al.*, 2007; Sinh *et al.*, 2017). Über die IIIc Isoform des *Fibroblast Growth Factor Receptors* (FGFR) wird zudem der MAPK Signalweg aktiviert, welcher über ETS 1 / 2 hohe Konzentrationen an ZEB 1 / 2 aufrechterhält. Über ZEB 1 / 2 werden die *Epithelial Splicing Regulatory Proteins* 1 / 2 (ESPR 1 / 2) reprimiert (s. unten), was zur Aufrechterhaltung der IIIc Isoform von FGFR führt (Horiguchi *et al.*, 2012). So wird ein positiver *Feedback* Mechanismus aufgebaut, der hohe ZEB 1 Mengen aufrechterhält und somit die EMT vorantreiben kann (Saitoh, 2023).

Zum anderen reprimiert onkogenes K-Ras die *microRNA*-200 (miR-200) Expression und steigert so die ZEB 1 Expression (Zhong *et al.*, 2016). miR-200 und ZEB 1 bilden einen doppelten negativen *Feedback* Mechanismus zueinander: ZEB 1 reprimiert die miR-200 Familie durch direkte Bindung an die Promotorregion. Mitglieder der miR-200 Familie hingegen können an die 3´ untranlantierte Region der ZEB 1 mRNA binden und so den mRNA Abbau induzieren oder die Translation hemmen (Perez-Oquendo and Gibbons, 2022). Experimente von Zhong *et al.* (2016) zeigten, dass hierfür sowohl der PI3K-Akt als auch der MAPK Signalweg notwendig sind und die Inhibition von Erk 2 mittels siRNA wiederum zur gesteigerten Expression von miR-200 führt. Die Inhibition von Mek oder Erk reduziert die ZEB 1 Proteinmenge (Graham *et al.*, 2008; Sánchez-Tilló *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2023). Der *Knockdown* von K-Ras führt in K-Ras^{G12D} mutierten Kolonkarzinomzellen ebenfalls zur Reduktion der ZEB 1 mRNA und Proteinmenge, während die K-Ras^{G12D} Überexpression zur einer Erhöhung führt (Sánchez-Tilló *et al.*, 2023). Dies ist abhängig von der Zelllinie und dem Mutationsstatus: A549 Zellen mit *KRAS* Mutation zeigen beispielsweise eine erhöhte ZEB 1 mRNA Menge nach Erk Inhibition, HCC857 Zellen mit *EGFR* Mutation hingegen zeigen eine verminderte ZEB 1 mRNA Menge nach Erk Inhibition (Cai *et al.*, 2022).

TGF-β induziert die Expression von ZEB 1 in vielen unterschiedlichen Zelllinien (Hao *et al.*, 2019; Saitoh, 2023), darunter auch in NSCLC Zelllinien (Zhang *et al.*, 2017), wie H358 (Wang *et al.*, 2010). TGF-β induziert die ZEB 1 Expression vor allem in den frühen Stadien der Karzinogenese. In späteren Stadien erhalten positive *Feedback* Mechanismen hohe Konzentrationen von ZEB 1 aufrecht unabhängig von TGF-β und SMAD Proteinen (Saitoh, 2023). TGF-β induziert die Proteinexpression von ZEB 1 einerseits durch SMAD Proteine und andererseits durch die Aktivierung von ETS 1 / 2 (Shirakihara *et al.*, 2007; Ichikawa *et al.*, 2022) oder Repression der miR-200 Familie (Gibbons *et al.*, 2009).

Lee *et al.* (2024) zählen ZEB 1 zu dem RREB1 und TGF-β1 aktivierten Gensatz hinzu (s. oben) und gehen somit von einer gemeinsamen Regulation durch Ras und TGF-β aus. Epithelorganoide der Bauchspeicheldrüse zeigen bei aktiver K-Ras Onkogen Expression und gleichzeitiger TGF-β1 Stimulation eine stärkere ZEB 1 Proteinexpression als bei inaktivem K-Ras Onkogen (Su *et al.*, 2020). Auch Lui *et al.* (2014) vermuteten einen Zusammenhang zwischen onkogenem Ras und TGF-β in der Induktion der ZEB 1 Expression. Der molekulare Mechanismus dieser interaktiven Regulation bleibt nach wie vor unklar und erfordert weitere intensive Studien.

5.2 Veränderungen der ESRP 1 & 2 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

ESRP 1 und 2 sind RNA-bindende Proteine, die zelltypspezifisch das alternative Spleißen regulieren. Sie aktivieren beispielsweise das Spleißen von Exon IIIb und hemmen das von Exon IIIc des FGFR 2 (Warzecha *et al.*, 2009a). Die Expression des Exons IIIb ist typisch für epitheliale Zellen, während die Expression von IIIc typisch für mesenchymale Zellen ist (Orr-Urtreger *et al.*, 1993). Neben dem FGFR 2 regulieren ESRPs auch eine Vielzahl anderer Proteine, die an der Regulation des Aktin Zytoskeletts, der Zell-Zell-Adhäsion, der Zellpolarität und der Zellmigration beteiligt sind (Warzecha *et al.*, 2009b). Man geht davon aus, dass viele Proteine unterschiedliche Spleißformen aufweisen, die spezifisch für epitheliale oder mesenchymale Zellen sind und so unterschiedliche Funktionen ausüben (Warzecha *et al.*, 2010)

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach Stimulation mit TGF-β1 eine signifikant verminderte Proteinmenge von ESRP 1 und 2, vor allem in den Kernfraktionen der H358 Zellen. Auch nach gleichzeitiger Behandlung mit den K-Ras^{G12C} Inhibitoren AMG 510 oder MRTX 849 und TGF-β1 zeigte sich die Proteinmenge der *Splicing* Proteine vermindert. Die ESRP 2 Proteinmenge stieg nach K-Ras^{G12C} Inhibition in den Kernfraktionen gegenüber der Kontrolle an (s. Abb. 21). Otake *et al.* (2021) konnten nach einem *Knockdown* von *KRAS* mittels siRNA in Panc-1 Zellen eine signifikant erhöhte ESRP 2 Genexpression detektieren. TGF-β1 reprimiert über den Transkriptionsfaktor ZEB 1 ESRP 1 in verschiedenen NSCLC Zelllinien (Larsen *et al.*, 2016) und ESRP 2 in NMuMG Zellen. In Panc-1 Zellen sind nach TGF-β1 Stimulation sowohl ESRP 1 als auch ESRP 2 reprimiert. Allerdings nicht durch ZEB 1 sondern durch den Transkriptionsfaktor Snail (Horiguchi *et al.*, 2012). Allgemein kommt es während der EMT zur Herabregulation der ESRPs (Warzecha *et al.*, 2009a). Ein ESRP *Knockdown* kann die EMT sogar induzieren (Warzecha *et al.*, 2010).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten im Kontext der vorhandenen Literatur darauf hin, dass TGF β1 die Menge des ESRP-Proteins senkt und eine Inhibition von K-

Ras^{G12C} diese steigert. Da die Proteinmengen von ESRP 1 und 2 unter Inhibition von K-Ras und gleichzeitiger Stimulation mit TGF-β1 niedrig sind, scheinen die reprimierenden Effekte von TGF-β1 zu überwiegen. Somit ergeben sich Hinweise auf eine mögliche gemeinsame Regulation von ESRPs, vor allem ESRP 2 in H358 Zellen, durch den Ras und TGF-β1 Signalweg.

5.3 Morphologische Veränderungen von NSCLC Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

Neben Veränderungen in der Proteinausstattung ist die Veränderung des Phänotyps von epithelial zu mesenchymal ein Charakteristikum der EMT (Kalluri and Weinberg, 2009). Die morphologischen Veränderungen wurden in dieser Arbeit anhand von Phasenkontrastaufnahmen analysiert. Ziel war es die morphologischen Veränderungen durch die K-Ras^{G12C} Inhibition zu charakterisieren, vor allem unter gleichzeitiger Behandlung mit TGF-β1. Zudem sollten phänotypische Veränderungen analysiert werden, welche Rückschlüsse auf einen möglicherweise stattfinden EMT Prozess ziehen lassen.

In den aufgeführten Ergebnissen kam es nach Stimulation mit TGF-β1 in allen drei untersuchten Zelllinien zu einer spindelförmigen Morphologie mit langen Zellfortsätzen (s. Abb. 10 D, J & P). Zudem konnte vor allem bei den H358 Zellen beobachtet werden, dass es zur Auflösung kohäsiver Zellverbände epithelialer Zellen kam. A549 Zellen weisen nach EMT Induktion durch TGF-β morphologisch mehr Zellausläufer auf, sind elongiert und haben eine um 25 % vergrößerte Zelloberfläche (Nurmagambetova *et al.*, 2023). Auch an Pankreaskarzinomzellen (Ellenrieder *et al.*, 2001), wie Panc-1 (Horiguchi *et al.*, 2009) sowie H358 Zellen (Singh *et al.*, 2009; Peindl *et al.*, 2022) oder anderen humanen Epithelzellen (Oft *et al.*, 1996, 1998) konnte eine spindelförmige Morphologie sowie das vermehrte Auftreten von Zellausläufern nach Behandlung mit TGF-β beobachtet werden. Zudem kommt es zur Auflösung kohäsiver Zellverbände durch verminderte Zell-Zell-Kontakte (Ellenrieder *et al.*, 2001; Peinado *et al.*, 2003; Horiguchi *et al.*, 2009).

Während die Morphologie der K-Ras^{G12C} inhibierten H358 Zellen länglicher erscheint (s. Abb. 10 B & C) als die mit DMSO und Zitrat behandelten Zellen, waren sowohl die HCC44 (s. Abb. 10 H & I) als auch die H23 Zellen (s. Abb. 10 N & O) polygonal oder rundlich geformt. Dies konnte ebenfalls in anderen Arbeiten, wie der von Aliena Vangerow in der Arbeitsgruppe Giehl beobachtet werden. Sie konnte durch Flächenmessungen nachweisen, dass die HCC44 Zellen durch K-Ras^{G12C} Inhibition größer wurden (Vangerow, 2026). Panc-1 Zellen zeigten nach Expression von EGFP-K-Ras^{V12} einen Fibroblasten-artigen Phänotyp mit unregelmäßiger Zellform

(Dreissigacker *et al.*, 2006) und somit Hinweise auf einen EMT Prozess. In manchen Zelllinien reicht onkogenes Ras aus, um EMT zu induzieren (Edme et al., 2002; Thiery, 2002; Y. Wang et al., 2010). H358 Zellen gelten als typisches Beispiel für eine Zelllinie, in der *RAS* Mutationen alleine nicht ausreichen, um EMT zu induzieren, sondern hierfür eine zusätzliche Stimulation über einen weiteren Signalweg, wie beispielsweise den TGF-β1 Signalweg benötigen (Y. Wang et al., 2010). Zudem sind die verwendeten Zelllinien unterschiedlich sensibel gegenüber den K-Ras^{G12C} Inhibitoren und haben einen unterschiedlichen Mutationsstatus (vgl. Kapitel 2.7 und 5.1.2).

Eine Mek Inhibition in Raf mutierten Zellen führt zum Wachstum in kohäsiven Zellverbänden und blockiert das *cell scattering* und somit die Annahme von mesenchymalen Zellcharakteristika (Lehmann *et al.*, 2000). Eine mesenchymale Morphologie wurde vor allem bei K-Ras^{G12C} Inhibitor resistenten Zellen beobachtet (Lin *et al.*, 2024). Der EMT Prozess selbst kann auch zur intrinsischen Resistenz gegenüber den Inhibitoren führen (Adachi *et al.*, 2020; Solanki *et al.*, 2021). Die K-Ras^{G12C} inhibierten NSCLC Zellen in diesen Experimenten präsentieren eher epitheliale Zellmerkmale.

Wurden die Zellen aller verwendeten Zelllinien mit TGF-β1 und den K-Ras^{G12C} Inhibitoren behandelt, so konnten überwiegend polygonale Zellen beobachtet werden (s. Abb. 9 E & F; K & L; Q & R). Vereinzelt fanden sich auch spindelförmige Zellen. Ellenrieder *et al.* (2001) beobachteten, dass Pankreaskarzinomzellen, die mit einem Mek Inhibitor vorbehandelt wurden, weniger sensitiv für die mesenchymale Transdifferenzierung durch TGF-β sowie Veränderungen von Proteinmarkern (Zytokeratin 8 / 19 und Vimentin) waren. Dies kann auch hier beobachtet werden, da die mit TGF-β1 und den K-Ras^{G12C} Inhibitoren behandelten Zellen eher den K-Ras^{G12C} inhibierten als den TGF-β1 stimulierten Zellen ähnelten und somit eher epitheliale Merkmale aufwiesen.

5.4 Veränderungen des Aktin Zytoskeletts sowie des Vinculin Proteins in NSCLC Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

Das Aktin Zytoskelett kann in Nicht-Muskelzellen sogenannte Stressfasern (Lewis and Lewis, 1924) aus 10 bis 30 Aktinfilamenten ausbilden (Cramer *et al.*, 1997), die sich über integrinhaltige Fokalkontakte an der Zellmembran verankern (Burridge, 1986). Sie entstehen vor allem in Zellen, die Scherkräften ausgesetzt sind (Franke *et al.*, 1984). Ihre Funktion in der Zellmigration ist die Definierung einer langen Zellachse (Rid *et al.*, 2005), die Adhäsion an die EZM und die Ausstülpung der Führungslamelle (DeMali *et al.*, 2002; Tojkander *et al.*, 2012; Thievessen *et al.*, 2013). In Zell-Zell- und Zell-Matrix Kontakten spielt das Protein Vinculin eine entscheidende Rolle (Geiger, 1979). Vinculin

befindet sich in einer aktiven, geöffneten Form in den Fokalkontakten und in einer inaktiven, gefalteten Form im Zytoplasma (Chen *et al.*, 2005). Einer der Aktivierungsmechanismen ist die Wirkung von Zugkräften auf die Zelle (Grashoff *et al.*, 2010). In den Zell-Matrix Kontakten bindet Vinculin an das Aktin Zytoskelett (Burridge and Feramisco, 1980).

In der immunzytochemischen Analyse konnten durch die Stimulation mit TGF-β1 deutlich ausgeprägte Stressfasern in HCC44 und H358 Zellen beobachtet werden (s. Abb. 23 D & 27 D Anhang). In den Zellen mit mesenchymalem Phänotyp orientierten sich die Stressfasern vermehrt parallel zur longitudinalen Zellachse. Die mit TGF-β1 und K-Ras^{G12C} Inhibitoren behandelten HCC44 Zellen scheinen mehr Stressfasern aufzuweisen (s. Abb. 23 E & F), als die Zellen, die nur mit den K-Ras^{G12C} Inhibitoren behandelt wurden (s. Abb. 23 B & C). Die Kontrollzellen und die K-Ras^{G12C} inhibierten Zellen verfügen über ein eher netzartig strukturiertes Aktin Zytoskelett (s. Abb. 23 A - C). Nach der TGF-β1 Stimulation orientieren sich die vinculinhaltigen Zell-Matrix Kontakte vermehrt an den kurzen Zellseiten (s. Abb. 23 D`). In den Kontrollzellen oder in den K-Ras^{G12C} inhibierten Zellen verteilen sie sich gleichmäßiger an der gesamten Zellmembran (s. Abb. 23 B´& C´). Die Anzahl vinculinhaltiger Zell-Matrix Kontakte pro Zelle nahmen nach Stimulation mit TGF-β1 deutlich zu. Auch nach TGF-β1 Stimulation und gleichzeitiger Behandlung mit den K-Ras^{G12C} Inhibitoren war die Anzahl der fokalen Kontakte gegenüber den Kontrollzellen erhöht (s. Tabelle 12 Anhang). In der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 konnte nach TGF-β Stimulation keine erhöhte Anzahl von vinculinhaltigen Fokalkontakten nachgewiesen werden. In HaCaT Zellen (humanen Keratinozyten) verdoppelte sich die Anzahl der vinculinhaltigen Fokalkontakte hingegen fast (Nurmagambetova *et al.*, 2023). Eine Zunahme der vinculinhaltigen Fokalkontakte nach TGF-β Stimulation konnte zudem in Brustkrebszellen gefunden werden (Imamichi *et al.*, 2005). In unstimulierten A549 und NMuMG Zellen befindet sich Vinculin vor allem im Zytoplasma und in den Adhärenskontakten. Nach TGF-β Stimulation befindet es sich vor allem an den Spitzen der Aktinfilamente (Safina *et al.*, 2009). Aliena Vangerow konnte in ihrer Arbeit nach K-Ras^{G12C} Inhibition in HCC44 und H23 Zellen sowohl eine erhöhte Anzahl an vinculinhaltigen Fokalkontakten sowie eine Umverteilung aus dem Zytoplasma und von perinukleär lokalisierten Proteinen an die Zellwand nachweisen. Darüber hinaus verzeichnete sie eine Zunahme der Stressfasern durch K-Ras^{G12C} Inhibition. Allerdings wählte sie für ihre Arbeit längere Inhibitionszeiten und höhere Inhibitorkonzentrationen (Vangerow, 2026).

TGF-β führt zur Bildung von Stressfasern (Peinado *et al.*, 2003; Bakin *et al.*, 2004; Safina *et al.*, 2009). In A549 Zellen sind Stressfasern nach TGF-β Stimulation prominenter und

fast in doppelter Anzahl vorhanden wie vor der EMT-Induktion. Zudem orientieren sie sich vermehrt gleichsinnig (Nurmagambetova *et al.*, 2023).
RAS mutierte Zellen weisen einen *actin adhesion belt* auf, ein Charakteristikum von epithelialen Zellen. In diesem sind die Aktinfasern dünner und weniger prominent als in nicht mutierten Zellen (Safina *et al.*, 2009). Eine Stimulation mit TGF-β führt in Zellen mit konstitutiv aktivem Ras Signalweg nicht zur Formation von Stressfasern sondern zur Auflösung des kortikalen Aktinnetzwerks und zur Steigerung der Migration. In Zellen mit aktiver *RAS* Mutation führt die Mek Inhibition und TGF-β Stimulation erneut zur Stressfaserformation (Bakin *et al.*, 2004; Safina *et al.*, 2009).

5.5 Methodendiskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich Western Blots verwendet, um Mengenunterschiede von EMT assoziierten Proteinen unter dem Einfluss der K-Ras^{G12C} Inhibitoren AMG 510 oder MRTX 849, TGF-β1 und deren Kombination zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Zelllysate mit Kern-Zytosolfraktionierungen modifiziert nach Andrews und Faller (1991) hergestellt (vgl. Kapitel 3.5.1). Probleme bei dieser Art der Lysatherstellung sind, dass eine Kontamination mit anderen Zellkompartimenten nicht zu vermeiden ist. Zudem besteht die Gefahr, dass im ersten Schritt neben der Plasmamembran auch die Zellkernmembran beschädigt wird, wodurch es zur Durchmischung der Kompartimente kommen kann (Ogawa and Imamoto, 2021). Transportprozesse zwischen Zellkern und Zytoplasma sind sehr temperaturempfindlich. Bei zu langer Inkubation bei niedrigen Temperaturen während der Fraktionierung kann es zur Fehllokalisation von Kernproteinen kommen (Ogawa and Imamoto, 2018). Darüber hinaus können auch bei intakter Zellkernmembran lösliche Proteine unter 60 kDa durch Kernporen austreten (Gorlich, 1998). Beispiele für das Fehlen einer strikten Trennung der Kompartimente können der Abbildung 6 entnommen werden. E-Cadherin und Vimentin, Proteine der Zellmembran bzw. des Zytoplasmas, befinden sich in gleich großen oder sogar größeren Mengen in den kernhaltigen bzw. unlöslichen Fraktionen.
Um quantitative Unterschiede in Western Blots zu detektieren, werden ubiquitär vorkommende Einzelproteine wie GAPDH, β-Aktin oder Tubulin als Beladungskontrolle verwendet (Taylor and Posch, 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich β-Aktin genutzt. Für die quantitative Darstellung werden die densitometrischen Werte des zu untersuchenden Proteins durch die der Beladungskontrolle dividiert. Diese Berechnung wird als Normalisierung bezeichnet. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Normalisierung Beladungsfehler oder einen ungleichen Transfer ausgleicht. Oft ist das zu untersuchende Protein in deutlich geringeren Mengen in der Zelle vorhanden als

das Protein der Beladungskontrolle. Dies führt dazu, dass die Konzentration des zu untersuchenden Proteins zwar im linearen Detektionsbereich liegt, die Konzentration des Proteins der Beladungskontrolle allerdings nicht (Aldridge *et al.*, 2008). Große Proteinmengen der Beladungskontrollen bei geringer Proteinbeladung des Blots können zu stark gesättigten Signalen der Antikörperdetektion führen, wodurch quantitative Unterschiede nicht gut widergespiegelt werden können (Taylor and Posch, 2014). Um diesen Fehler zu minimieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ein fluoreszenzbasiertes Verfahren von LICOR verwendet. Im Vergleich zu chemilumineszenzbasierten Verfahren sind die Ergebnisse deutlich reproduzierbarer, da keine Abhängigkeit von Zeit und Substratverfügbarkeit besteht und eine Multiplex Detektion möglich ist. Zudem ist das fluoreszenzbasierte Verfahren weniger anfällig für Übersättigungsartefakte, da es über einen größeren linearen Detektionsbereich zwischen Bandenintensität und Proteinmenge verfügt als chemilumineszenzbasierte Verfahren (Pillai-Kastoori *et al.*, 2020).

Darüber hinaus spielt der optimale Trennbereich des Gels noch eine wichtige Rolle bei der Auswahl der optimalen Beladungskontrolle. Das 8,5-prozentige Acrylamidgel, welches von 50 - 150 kDa den optimalen Trennbereich aufweist, erfasst das 42 kDa schwere β-Aktin Protein nicht mehr zuverlässig. Aus diesem Grund wurde für ZEB 1 das Kernprotein Lamin A / C und für STAT 3 die Gesamtproteinfärbung Ponceau Rot als Beladungskontrolle verwendet.

Eine weitere potenzielle Fehlerquelle ist, dass sich die Proteinmenge der Beladungskontrolle durch biologische und experimentelle Bedingungen verändert (Aldridge *et al.*, 2008). Greer *et al.* (2010) zeigten, dass sich die Mengen von GAPDH und α-Tubulin mit zunehmender Konfluenz der Zellkultur erhöhten, während sich die Mengen von Hsp90 und β-Aktin Mengen nicht veränderten. Lamin A / C ist in NSCLC Zellen in geringeren Mengen vorhanden als in Nicht-Krebszellen (Stefanello *et al.*, 2021). In der Literaturrecherche konnten keine Hinweise darauf gefunden werden, dass sich die Proteinmenge von Lamin A / C oder β-Aktin durch die TGF-β1 Stimulation oder K-Ras^{G12C} Inhibition verändert, weshalb diese in der vorliegenden Arbeit auch als Beladungskontrolle verwendet wurden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Beurteilung quantitativer Unterschiede im Western Blot kritisch hinterfragt werden sollte. Man sollte sich nicht nur auf die Normalisierung und die Beladungskontrolle verlassen, sondern jeden Western Blot einzeln auf die Plausibilität der Densitometrieergebnisse prüfen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Ergebnisse zwischen unterschiedlichen Beladungskontrollen wie GAPDH, β-Aktin, Lamin A / C und Ponceau S verglichen und Western Blots bei Vorliegen großer intraexperimenteller Schwankungen wiederholt.

6 Zusammenfassung

Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) kann ein zentraler Vorgang in der Metastasierung von Karzinomen sein, bei dem epitheliale Karzinomzellen ganz oder teilweise mesenchymale Charakteristika annehmen. Dieser Prozess geht einher mit einem Wechsel der Proteinausstattung: Epitheliale Proteine wie E-Cadherin und Zytokeratin werden herab- und mesenchymale Proteine wie N-Cadherin und Vimentin heraufreguliert. Dadurch kommt es zum Abbau der Zell-Zell-Kontakte und Veränderungen des Zytoskeletts. Einer der zentralen Modulatoren der EMT ist der *Transforming-Growth-Factor β1* (TGF-β1). Dieser induziert die Expression einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie Slug, Snail, Twist, ZEB 1 oder ZEB 2, welche die EMT vorantreiben. Die EMT ist auch ein wichtiger Vorgang in der Metastasierung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC), einer Entität, die oftmals Treibermutationen im *KRAS* Gen aufweist. Am häufigsten findet sich die spezifische Mutation K-Ras^{G12C}. Diese führt zu einem konstitutiv aktiven Ras Signalweg und damit zur Karzinogenese.
Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob der Ras und TGF-β1 Signalweg in der EMT des NSCLCs synergieren. Hierzu wurden die NSCLC Zellen sowohl mit spezifischen K-Ras^{G12C} Inhibitoren (AMG 510 oder MRTX 849) als auch mit TGF-β1 behandelt. Die Proteinmenge und -lokalisation verschiedener EMT-Markerproteine, Transkriptionsfaktoren und -regulatoren sowie Zelladhäsionsproteine, die eine mögliche Rolle im EMT Prozess spielen, wurden mittels Western Blot und Immunzytochemie analysiert.
Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen, dass die Proteinmenge der EMT-Transkriptionsfaktoren Slug und ZEB 1 durch die K-Ras^{G12C} Inhibition verringert und durch die TGF-β1 Stimulation gesteigert wird. In der Literatur gibt es für diese Transkriptionsfaktoren Hinweise auf eine gemeinsame Regulation durch den Ras und TGF-β Signalweg. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Interpretation. Diese Beobachtungen konnten vor allem in den H358 Zellen gemacht werden. Die H23 und HCC44 Zellen hingegen, zeigten kaum Veränderungen durch die K-Ras^{G12C} Inhibition und / oder die TGF-β1 Stimulation. Auch für die RNA *Splicing* Proteine ERSP 1 und ESRP 2 ergaben sich Hinweise auf eine gemeinsame Regulation. Die anderen in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien und Proteine zeigten einen weitgehend parallelen Verlauf der beiden Signalwege ohne Hinweise auf Interaktionen.
Der genaue molekulare Mechanismus der Synergie des Ras und TGF-β Signalwegs kann anhand dieser Untersuchungen jedoch nicht bestimmt werden. Dieses Verständnis wäre für die Entwicklung zielgerichteter Therapien von entscheidendem Vorteil.

7 Summary

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) may be a key process in the metastasis of carcinomas, in which epithelial carcinoma cells acquire mesenchymal characteristics either completely or partially. This process is accompanied by a change in protein expression: epithelial proteins such as E-cadherin and cytokeratin are downregulated, while mesenchymal proteins such as N-cadherin and vimentin are upregulated. This leads to a disruption of cell-cell contacts and changes in the cytoskeleton. One of the central inducers of EMT is transforming growth factor β1 (TGF-β1). It induces the expression of several transcription factors, such as Slug, Snail, Twist, ZEB 1, and ZEB 2, which drive individually or in combination EMT. EMT is also an important process in the metastasis of non-small cell lung cancer (NSCLC), which is often characterized by driver mutations in the *KRAS* gene. The most common mutation is K-Ras^{G12C}. The mutation leads to a constitutively active Ras signaling pathway and thus to carcinogenesis.

The aim of this study was to investigate whether the Ras and TGF-β1 signaling pathways synergize in the EMT of NSCLC. For this purpose, NSCLC cells were treated with specific K-Ras^{G12C} inhibitors (AMG 510 or MRTX 849) as well as with TGF-β1. The protein concentration and localization of various EMT marker proteins, transcription factors and regulators, as well as cell adhesion proteins that play a possible role in the EMT process, were analyzed using Western blot and immunocytochemistry.

The results of this work show that the protein levels of the EMT transcription factors Slug and ZEB 1 are reduced by K-Ras^{G12C} inhibition and increased by TGF-β1 stimulation. In the literature, there are indications for these transcription factors of joint regulation by the Ras and TGF-β signaling pathways. The results presented in the present study support this view. These observations were made primarily in H358 cells. H23 and HCC44 cells, on the other hand, showed little change due to K-Ras^{G12C} inhibition and / or TGF-β1 stimulation. There was also evidence of joint regulation for the RNA splicing proteins ERSP 1 and ESRP 2. The other cell lines and proteins examined in this study, show largely independent effects of the two signaling pathways without major crosstalk.

However, the exact molecular mechanism of the synergy of the Ras and TGF-β signaling pathways cannot be determined based on these investigations. Nevertheless, understanding this would be of decisive advantage for the development of targeted therapies in the future.

8 Literaturverzeichnis

Adachi, Y., Ito, K., Hayashi, Y., Kimura, R., Tan, T.Z., Yamaguchi, R., Ebi, H., 2020. Epithelial-to-Mesenchymal Transition is a Cause of Both Intrinsic and Acquired Resistance to KRAS G12C Inhibitor in KRAS G12C–Mutant Non–Small Cell Lung Cancer. Clinical Cancer Research 26, 5962–5973. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2077

Adib, E., Nassar, A.H., Abou Alaiwi, S., Groha, S., Akl, E.W., Sholl, L.M., Michael, K.S., Awad, M.M., Jänne, P.A., Gusev, A., Kwiatkowski, D.J., 2022. Variation in targetable genomic alterations in non-small cell lung cancer by genetic ancestry, sex, smoking history, and histology. Genome Med 14, 39. https://doi.org/10.1186/s13073-022-01041-x

Akhurst, R.J., Hata, A., 2012. Targeting the TGFβ signalling pathway in disease. Nat Rev Drug Discov 11, 790–811. https://doi.org/10.1038/nrd3810

Aldridge, G.M., Podrebarac, D.M., Greenough, W.T., Weiler, I.J., 2008. The use of total protein stains as loading controls: An alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. Journal of Neuroscience Methods 172, 250–254. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.05.003

Andrews, N.C., Faller, D.V., 1991. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. Nucl Acids Res 19, 2499–2499. https://doi.org/10.1093/nar/19.9.2499

Bae, G.-Y., Choi, S.-J., Lee, J.-S., Jo, J., Lee, J., Kim, J., Cha, H.-J., 2013. Loss of E-cadherin activates EGFR-MEK/ERK signaling, which promotes invasion via the ZEB1/MMP2 axis in non-small cell lung cancer. Oncotarget 4, 2512–2522. https://doi.org/10.18632/oncotarget.1463

Bakin, A.V., Rinehart, C., Tomlinson, A.K., Arteaga, C.L., 2002. p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFβ-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. Journal of Cell Science 115, 3193–3206. https://doi.org/10.1242/jcs.115.15.3193

Bakin, A.V., Safina, A., Rinehart, C., Daroqui, C., Darbary, H., Helfman, D.M., 2004. A Critical Role of Tropomyosins in TGF-β Regulation of the Actin Cytoskeleton and Cell Motility in Epithelial Cells. MBoC 15, 4682–4694. https://doi.org/10.1091/mbc.e04-04-0353

Barberà, M.J., Puig, I., Domínguez, D., Julien-Grille, S., Guaita-Esteruelas, S., Peiró, S., Baulida, J., Francí, C., Dedhar, S., Larue, L., García De Herreros, A., 2004. Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. Oncogene 23, 7345–7354. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207990

Barta, J.A., Powell, C.A., Wisnivesky, J.P., 2019. Global Epidemiology of Lung Cancer. Annals of Global Health 85, 8. https://doi.org/10.5334/aogh.2419

Bass, J.J., Wilkinson, D.J., Rankin, D., Phillips, B.E., Szewczyk, N.J., Smith, K., Atherton, P.J., 2017. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. Scandinavian Med Sci Sports 27, 4–25. https://doi.org/10.1111/sms.12702

Begum, H., Murugesan, P., Tangutur, A.D., 2022. Western Blotting: A Powerful Staple In Scientific and Biomedical Research. BioTechniques 73, 58–69. https://doi.org/10.2144/btn-2022-0003

Bhowmick, N.A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C.A., Engel, M.E., Arteaga, C.L., Moses, H.L., 2001. Transforming Growth Factor-β1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoA-dependent Mechanism. MBoC 12, 27–36. https://doi.org/10.1091/mbc.12.1.27

Bierie, B., Moses, H.L., 2006. TGFβ: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. Nat Rev Cancer 6, 506–520. https://doi.org/10.1038/nrc1926

Bilal, F., Arenas, E.J., Pedersen, K., Martínez-Sabadell, A., Nabet, B., Guruceaga, E., Vicent, S., Tabernero, J., Macarulla, T., Arribas, J., 2021. The Transcription Factor SLUG Uncouples Pancreatic Cancer Progression from the RAF–MEK1/2–ERK1/2 Pathway. Cancer Research 81, 3849–3861. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-4263

Brown, J.D., DiChiara, M.R., Anderson, K.R., Gimbrone, M.A., Topper, J.N., 1999. MEKK-1, a Component of the Stress (Stress-activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Kinase) Pathway, Can Selectively Activate Smad2-mediated Transcriptional Activation in Endothelial Cells. Journal of Biological Chemistry 274, 8797–8805. https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8797

Burnette, W.N., 1981. “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Analytical Biochemistry 112, 195–203. https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5

Burridge, K., 1986. Substrate adhesions in normal and transformed fibroblasts: organization and regulation of cytoskeletal, membrane and extracellular matrix components at focal contacts. Cancer 4, 18–78.

Burridge, K., Feramisco, J., 1980. Microinjection and localization of a 130K protein in living fibroblasts: a relationship to actin and fibronectin. Cell 19, 587–595. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(80)80035-3

Cai, S., Li, N., Bai, X., Liu, L., Banerjee, A., Lavudi, K., Zhang, X., Zhao, J., Venere, M., Duan, W., Zhang, J., Welliver, M.X., He, K., Wang, Q.-E., 2022. ERK inactivation enhances stemness of NSCLC cells via promoting Slug-mediated epithelial-to-mesenchymal transition. Theranostics 12, 7051–7066. https://doi.org/10.7150/thno.73099

Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J., Der, C.J., 1998. Increasing complexity of Ras signaling. Oncogene 17, 1395–1413. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202174

Cascetta, P., Marinello, A., Lazzari, C., Gregorc, V., Planchard, D., Bianco, R., Normanno, N., Morabito, A., 2022. KRAS in NSCLC: State of the Art and Future Perspectives. Cancers 14, 5430. https://doi.org/10.3390/cancers14215430

Ceddia, S., Landi, L., Cappuzzo, F., 2022. KRAS-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer: From Past Efforts to Future Challenges. IJMS 23, 9391. https://doi.org/10.3390/ijms23169391

Cekani, E., Epistolio, S., Dazio, G., Cefalì, M., Wannesson, L., Frattini, M., Froesch, P., 2022. Molecular Biology and Therapeutic Perspectives for K-Ras Mutant Non-Small Cell Lung Cancers. Cancers 14, 4103. https://doi.org/10.3390/cancers14174103

Chang, C.-J., Chao, C.-H., Xia, W., Yang, J.-Y., Xiong, Y., Li, C.-W., Yu, W.-H., Rehman, S.K., Hsu, J.L., Lee, H.-H., Liu, M., Chen, C.-T., Yu, D., Hung, M.-C., 2011. p53 regulates epithelial–mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. Nat Cell Biol 13, 317–323. https://doi.org/10.1038/ncb2173

Chang, R., Zhang, P., You, J., 2016. Post-translational modifications of EMT transcriptional factors in cancer metastasis. Open Life Sciences 11, 237–243. https://doi.org/10.1515/biol-2016-0033

Chen, H., Cohen, D.M., Choudhury, D.M., Kioka, N., Craig, S.W., 2005. Spatial distribution and functional significance of activated vinculin in living cells. The Journal of Cell Biology 169, 459–470. https://doi.org/10.1083/jcb.200410100

Christensen, J.G., Olson, P., Briere, T., Wiel, C., Bergo, M.O., 2020. Targeting Kras ^{g12c} -mutant cancer with a mutation-specific inhibitor. J Intern Med 288, 183–191. https://doi.org/10.1111/joim.13057

Congdon, R.W., Muth, G.W., Splittgerber, A.G., 1993. The Binding Interaction of Coomassie Blue with Proteins. Analytical Biochemistry 213, 407–413. https://doi.org/10.1006/abio.1993.1439

Cramer, L.P., Siebert, M., Mitchison, T.J., 1997. Identification of Novel Graded Polarity Actin Filament Bundles in Locomoting Heart Fibroblasts: Implications for the Generation of Motile Force. The Journal of Cell Biology 136, 1287–1305. https://doi.org/10.1083/jcb.136.6.1287

Damalas, A., Vonkova, I., Tutkus, M., Stamou, D., 2022. TGFβ-induced changes in membrane curvature influence Ras oncoprotein membrane localization. Sci Rep 12, 13486. https://doi.org/10.1038/s41598-022-17482-8

Dave, N., Guaita-Esteruelas, S., Gutarra, S., Frias, À., Beltran, M., Peiró, S., De Herreros, A.G., 2011. Functional Cooperation between Snail1 and Twist in the Regulation of ZEB1 Expression during Epithelial to Mesenchymal Transition. Journal of Biological Chemistry 286, 12024–12032. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.168625

De Blander, H., Tonon, L., Fauvet, F., Pommier, R.M., Lamblot, C., Benhassoun, R., Angileri, F., Gibert, B., Rodriguez, R., Ouzounova, M., Morel, A.-P., Puisieux, A., 2024. Cooperative pro-tumorigenic adaptation to oncogenic RAS through epithelial-to-mesenchymal plasticity. Sci. Adv. 10, eadi1736. https://doi.org/10.1126/sciadv.adi1736

De Caestecker, M.P., Parks, W.T., Frank, C.J., Castagnino, P., Bottaro, D.P., Roberts, A.B., Lechleider, R.J., 1998. Smad2 transduces common signals from receptor serine–threonine and tyrosine kinases. Genes Dev. 12, 1587–1592. https://doi.org/10.1101/gad.12.11.1587

De Martin, R., Haendler, B., Hofer-Warbinek, R., Gaugitsch, H., Wrann, M., Schlüsener, H., Seifert, J.M., Bodmer, S., Fontana, A., Hofer, E., 1987. Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-beta gene family. The EMBO Journal 6, 3673–3677. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02700.x

Dearden, S., Stevens, J., Wu, Y.-L., Blowers, D., 2013. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap). Annals of Oncology 24, 2371–2376. https://doi.org/10.1093/annonc/mdt205

Dela Cruz, C.S., Tanoue, L.T., Matthay, R.A., 2020. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. Clinics in Chest Medicine 32, 605–644. https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.09.001

DeMali, K.A., Barlow, C.A., Burridge, K., 2002. Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin. The Journal of Cell Biology 159, 881–891. https://doi.org/10.1083/jcb.200206043

Derynck, R., Akhurst, R.J., Balmain, A., 2001. TGF-β signaling in tumor suppression and cancer progression. Nat Genet 29, 117–129. https://doi.org/10.1038/ng1001-117

Derynck, R., Jarrett, J.A., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Bell, J.R., Assoian, R.K., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Goeddel, D.V., 1985. Human transforming growth factor-β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. Nature 316, 701–705. https://doi.org/10.1038/316701a0

Derynck, R., Zhang, Y.E., 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-β family signalling. Nature 425, 577–584. https://doi.org/10.1038/nature02006

Dittmer, J., 2015. The role of the transcription factor Ets1 in carcinoma. Seminars in Cancer Biology 35, 20–38. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.09.010

Dogan, S., Shen, R., Ang, D.C., Johnson, M.L., D'Angelo, S.P., Paik, P.K., Brzostowski, E.B., Riely, G.J., Kris, M.G., Zakowski, M.F., Ladanyi, M., 2012. Molecular Epidemiology of *EGFR* and *KRAS* Mutations in 3,026 Lung Adenocarcinomas: Higher Susceptibility of Women to Smoking-Related *KRAS* -Mutant Cancers. Clinical Cancer Research 18, 6169–6177. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3265

Downward, J., 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. Nat Rev Cancer 3, 11–22. https://doi.org/10.1038/nrc969

Dreissigacker, U., Mueller, M.S., Unger, M., Siegert, P., Genze, F., Gierschik, P., Giehl, K., 2006. Oncogenic K-Ras down-regulates Rac1 and RhoA activity and enhances migration and invasion of pancreatic carcinoma cells through activation of p38. Cellular Signalling 18, 1156–1168. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.09.004

Ellenrieder, V., Hendler, S.F., Boeck, W., Seufferlein, T., Menke, A., Ruhland, C., Adler, G., Gress, T.M., 2001. Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. Cancer Res 61, 4222–4228.

Engel, M.E., McDonnell, M.A., Law, B.K., Moses, H.L., 1999. Interdependent SMAD and JNK Signaling in Transforming Growth Factor-β-mediated Transcription. Journal of Biological Chemistry 274, 37413–37420. https://doi.org/10.1074/jbc.274.52.37413

European Medicines Agency, 2024. Krazati: EPAR – Public Overview.

European Medicines Agency, 2022. Lumykras: EPAR – Public Overview.

Flanders, K.C., Yang, Y., Herrmann, M., Chen, J., Mendoza, N., Mirza, A.M., Wakefield, L.M., 2016. Quantitation of TGF-β proteins in mouse tissues shows reciprocal changes in TGF-β1 and TGF-β3 in normal vs neoplastic mammary epithelium. Oncotarget 7, 38164–38179. https://doi.org/10.18632/oncotarget.9416

Franke, R.-P., Gräfe, M., Schnittler, H., Seiffge, D., Mittermayer, C., Drenckhahn, D., 1984. Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress. Nature 307, 648–649. https://doi.org/10.1038/307648a0

Frémin, C., Meloche, S., 2010. From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. J Hematol Oncol 3, 8. https://doi.org/10.1186/1756-8722-3-8

Friedlaender, A., Perol, M., Banna, G.L., Parikh, K., Addeo, A., 2024. Oncogenic alterations in advanced NSCLC: a molecular super-highway. Biomark Res 12, 24. https://doi.org/10.1186/s40364-024-00566-0

Funahashi, J., Sekido, R., Murai, K., Kamachi, Y., Kondoh, H., 1993. δ-crystallin enhancer binding protein δEF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis. Development 119, 433–446. https://doi.org/10.1242/dev.119.2.433

Geiger, B., 1979. A 130K protein from chicken gizzard: Its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. Cell 18, 193–205. https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90368-4

Geißert, R., Lammert, A., Wirth, S., Hönig, R., Lohfink, D., Unger, M., Pek, D., Schlüter, K., Scheftschik, T., Smit, D.J., Jücker, M., Menke, A., Giehl, K., 2024. K-Ras(V12) differentially affects the three Akt isoforms in lung and pancreatic carcinoma cells and upregulates E-cadherin and NCAM via Akt3. Cell Commun Signal 22, 85. https://doi.org/10.1186/s12964-024-01484-2

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., 2011. ZEB1-responsive genes in non-small cell lung cancer. Cancer Letters 300, 66–78. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.09.007

Gibbons, D.L., Lin, W., Creighton, C.J., Rizvi, Z.H., Gregory, P.A., Goodall, G.J., Thilaganathan, N., Du, L., Zhang, Y., Pertsemlidis, A., Kurie, J.M., 2009. Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression. Genes Dev. 23, 2140–2151. https://doi.org/10.1101/gad.1820209

Giehl, K., 2005. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. Biological Chemistry 386. https://doi.org/10.1515/BC.2005.025

Giehl, K., Imamichi, Y., Menke, A., 2007. Smad4-Independent TGF-β Signaling in Tumor Cell Migration. Cells Tissues Organs 185, 123–130. https://doi.org/10.1159/000101313

Gorlich, D., 1998. Transport into and out of the cell nucleus. The EMBO Journal 17, 2721–2727. https://doi.org/10.1093/emboj/17.10.2721

Gotzmann, J., Huber, H., Thallinger, C., Wolschek, M., Jansen, B., Schulte-Hermann, R., Beug, H., Mikulits, W., 2002. Hepatocytes convert to a fibroblastoid phenotype through the cooperation of TGF-β1 and Ha-Ras: steps towards invasiveness. Journal of Cell Science 115, 1189–1202. https://doi.org/10.1242/jcs.115.6.1189

Govindan, R., Ding, L., Griffith, M., Subramanian, J., Dees, N.D., Kanchi, K.L., Maher, C.A., Fulton, R., Fulton, L., Wallis, J., Chen, K., Walker, J., McDonald, S., Bose, R., Ornitz, D., Xiong, D., You, M., Dooling, D.J., Watson, M., Mardis, E.R., Wilson, R.K., 2012. Genomic Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer in Smokers and Never-Smokers. Cell 150, 1121–1134. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.024

Graham, T.R., Zhau, H.E., Odero-Marah, V.A., Osunkoya, A.O., Kimbro, K.S., Tighiouart, M., Liu, T., Simons, J.W., O'Regan, R.M., 2008. Insulin-like Growth Factor-I–Dependent Up-regulation of ZEB1 Drives Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Human Prostate Cancer Cells. Cancer Research 68, 2479–2488. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2559

Grashoff, C., Hoffman, B.D., Brenner, M.D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M.T., McLean, M.A., Sligar, S.G., Chen, C.S., Ha, T., Schwartz, M.A., 2010. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. Nature 466, 263–266. https://doi.org/10.1038/nature09198

Grau, Y., Carteret, C., Simpson, P., 1984. Mutations and Chromosomal Rearrangements Affecting the Expression of Snail, a Gene Involved in Embryonic Patterning in DROSOPHILA MELANOGASTER. Genetics 108, 347–360. https://doi.org/10.1093/genetics/108.2.347

Greer, S., Honeywell, R., Geletu, M., Arulanandam, R., Raptis, L., 2010. Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells. Journal of Immunological Methods 355, 76–79. https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.02.006

Grigora, M.L., Arghirescu, T.S., Folescu, R., Talpo, I.C., Gîndac, C.M., Cornianu, R., Anghel, M.D., Levai, C.M., 2017. Expression of E-cadherin in lung carcinoma, other than those with small cells (NSCLC). RJME 4, 1317–1325.

Gubelmann, C., Schwalie, P.C., Raghav, S.K., Röder, E., Delessa, T., Kiehlmann, E., Waszak, S.M., Corsinotti, A., Udin, G., Holcombe, W., Rudofsky, G., Trono, D., Wolfrum, C., Deplancke, B., 2014. Identification of the transcription factor ZEB1 as a central component of the adipogenic gene regulatory network. eLife 3, e03346. https://doi.org/10.7554/eLife.03346

Guo, Y., Hu, C., Cai, K., Long, G., Cai, D., Yu, Z., Huang, X., Cai, Z., Hu, P., Chen, Y., Gao, F., Wu, X., 2024. KRAS inhibitors may prevent colorectal cancer metachronous metastasis by suppressing TGF-β mediated epithelial-mesenchymal transition. Mol Med Rep 31, 24. https://doi.org/10.3892/mmr.2024.13389

Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., Hu, L., 2020. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). Exp Ther Med. https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454

Hall, A., Marshall, C.J., Spurr, N.K., Weiss, R.A., 1983. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. Nature 303, 396–400. https://doi.org/10.1038/303396a0

Hao, Y., Baker, D., Ten Dijke, P., 2019. TGF-β-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. IJMS 20, 2767. https://doi.org/10.3390/ijms20112767

Harvey, J.J., 1964. An Unidentified Virus which causes the Rapid Production of Tumours in Mice. Nature 204, 1104–1105. https://doi.org/10.1038/2041104b0

Hay, E.D., 1995. An Overview of Epithelio-Mesenchymal Transformation. Cells Tissues Organs 154, 8–20. https://doi.org/10.1159/000147748

Henrich, L.S., 2025. Analyse der Rolle von onkogenem K-Ras und TGFβ1 in der EMT-assoziierten Genregulation des NSCLC. Justus-Liebig-Universität Gießen. https://doi.org/10.22029/JLUPUB-20081

Horiguchi, K., Sakamoto, K., Koinuma, D., Semba, K., Inoue, A., Inoue, S., Fujii, H., Yamaguchi, A., Miyazawa, K., Miyazono, K., Saitoh, M., 2012. TGF-β drives epithelial-mesenchymal transition through δEF1-mediated downregulation of ESRP. Oncogene 31, 3190–3201. https://doi.org/10.1038/onc.2011.493

Horiguchi, K., Shirakihara, T., Nakano, A., Imamura, T., Miyazono, K., Saitoh, M., 2009. Role of Ras Signaling in the Induction of Snail by Transforming Growth Factor-β. Journal of Biological Chemistry 284, 245–253. https://doi.org/10.1074/jbc.M804777200

Ichikawa, M.K., Endo, K., Itoh, Y., Osada, A.H., Kimura, Y., Ueki, K., Yoshizawa, K., Miyazawa, K., Saitoh, M., 2022. Ets family proteins regulate the EMT transcription factors Snail and ZEB in cancer cells. FEBS Open Bio 12, 1353–1364. https://doi.org/10.1002/2211-5463.13415

Imamichi, Y., Waidmann, O., Hein, R., Eleftheriou, P., Giehl, K., Menke, A., 2005. TGFβ-induced focal complex formation in epithelial cells is mediated by activated ERK and JNK MAP kinases and is independent of Smad4. Biological Chemistry 386. https://doi.org/10.1515/BC.2005.028

International Agency for Research on Cancer (IARC), 2024. Trachea, Bronchus and Lung Fact Sheet.

Janda, E., Lehmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H., Grünert, S., 2002. Ras and TGFβ cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis. The Journal of Cell Biology 156, 299–314. https://doi.org/10.1083/jcb.200109037

Jayaraman, L., Massagué, J., 2000. Distinct Oligomeric States of SMAD Proteins in the Transforming Growth Factor-β Pathway. Journal of Biological Chemistry 275, 40710–40717. https://doi.org/10.1074/jbc.M005799200

Johnson, D.A., Gautsch, J.W., Sportsman, J.R., Elder, J.H., 1984. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. Gene Analysis Techniques 1, 3–8. https://doi.org/10.1016/0735-0651(84)90049-9

Johnson, L., Mercer, K., Greenbaum, D., Bronson, R.T., Crowley, D., Tuveson, D.A., Jacks, T., 2001. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. Nature 410, 1111–1116. https://doi.org/10.1038/35074129

Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J. Clin. Invest. 119, 1420–1428. https://doi.org/10.1172/JCI39104

Khan, P., Manna, A., Saha, S., Mohanty, S., Mukherjee, S., Mazumdar, M., Guha, D., Das, T., 2016. 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. https://doi.org/10.1186/s12885-016-2078-7

Kim, B.N., Ahn, D.H., Kang, N., Yeo, C.D., Kim, Y.K., Lee, K.Y., Kim, T.-J., Lee, S.H., Park, M.S., Yim, H.W., Park, J.Y., Park, C.K., Kim, S.J., 2020. TGF-β induced EMT and stemness characteristics are associated with epigenetic regulation in lung cancer. Sci Rep 10, 10597. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67325-7

Kirsten, W.H., Mayer, L.A., 1967. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. J Natl Cancer Inst 39, 311–335.

Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I., Massague, J., 1999. A mechanism of repression of TGFbeta / Smad signaling by oncogenic Ras. Genes & Development 13, 804–816. https://doi.org/10.1101/gad.13.7.804

Kubiczkova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., Sevcikova, S., 2012. TGF-β – an excellent servant but a bad master. J Transl Med 10, 183. https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-183

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0

Lamouille, S., Derynck, R., 2007. Cell size and invasion in TGF-β–induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. The Journal of Cell Biology 178, 437–451. https://doi.org/10.1083/jcb.200611146

Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R., 2014. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol 15, 178–196. https://doi.org/10.1038/nrm3758

Lanman, B.A., Allen, J.R., Allen, J.G., Amegadzie, A.K., Ashton, K.S., Booker, S.K., Chen, J.J., Chen, N., Frohn, M.J., Goodman, G., Kopecky, D.J., Liu, L., Lopez, P., Low, J.D., Ma, V., Minatti, A.E., Nguyen, T.T., Nishimura, N., Pickrell, A.J., Reed, A.B., Shin, Y., Siegmund, A.C., Tamayo, N.A., Tegley, C.M., Walton, M.C., Wang, H.-L., Wurz, R.P., Xue, M., Yang, K.C., Achanta, P., Bartberger, M.D., Canon, J., Hollis, L.S., McCarter, J.D., Mohr, C., Rex, K., Saiki, A.Y., San Miguel, T., Volak, L.P., Wang, K.H., Whittington, D.A., Zech, S.G., Lipford, J.R., Cee, V.J., 2020. Discovery of a Covalent Inhibitor of KRAS ^{G12C} (AMG 510) for the Treatment of Solid Tumors. J. Med. Chem. 63, 52–65. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01180

Larsen, J.E., Nathan, V., Osborne, J.K., Farrow, R.K., Deb, D., Sullivan, J.P., Dospoy, P.D., Augustyn, A., Hight, S.K., Sato, M., Girard, L., Behrens, C., Wistuba, I.I., Gazdar, A.F., Hayward, N.K., Minna, J.D., 2016. ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. Journal of Clinical Investigation 126, 3219–3235. https://doi.org/10.1172/JCI76725

Lee, J.H., Sánchez-Rivera, F.J., He, L., Basnet, H., Chen, F.X., Spina, E., Li, L., Torner, C., Chan, J.E., Yarlagadda, D.V.K., Park, J.S., Sussman, C., Rudin, C.M., Lowe, S.W., Tammela, T., Macias, M.J., Koche,

R.P., Massagué, J., 2024. TGF-β and RAS jointly unmask primed enhancers to drive metastasis. Cell 187, 6182-6199.e29. https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.08.014

Lee, M.K., Pardoux, C., Hall, M.C., Lee, P.S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S.M., Derynck, R., 2007. TGF-β activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. EMBO J 26, 3957–3967. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601818

Lehmann, K., Janda, E., Pierreux, C.E., Rytömaa, M., Schulze, A., McMahon, M., Hill, C.S., Beug, H., Downward, J., 2000. Raf induces TGFβ production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. Genes Dev. 14, 2610–2622. https://doi.org/10.1101/gad.181700

Lewis, W.H., Lewis, M.R., 1924. Behavior of cells in tissue cultures. In General Cytology (ed. E. V. Cowdry) 63.

Lin, P., Cheng, W., Qi, X., Zhang, P., Xiong, J., Li, J., 2024. Bioinformatics and Experimental Validation for Identifying Biomarkers Associated with AMG510 (Sotorasib) Resistance in KRASG12C-Mutated Lung Adenocarcinoma. IJMS 25, 1555. https://doi.org/10.3390/ijms25031555

Liu, L.-C., Tsao, T.C.-Y., Hsu, S.-R., Wang, H.-C., Tsai, T.-C., Kao, J.-Y., Way, T.-D., 2012. EGCG Inhibits Transforming Growth Factor-β-Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition via the Inhibition of Smad2 and Erk1/2 Signaling Pathways in Nonsmall Cell Lung Cancer Cells. J. Agric. Food Chem. 60, 9863–9873. https://doi.org/10.1021/jf303690x

Liu, R.-Y., Zeng, Y., Lei, Z., Wang, L., Yang, H., Liu, Z., Zhao, J., Zhang, H.-T., 2014. JAK/STAT3 signaling is required for TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. International Journal of Oncology 44, 1643–1651. https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2310

Liu, Y., Lu, X., Huang, L., Wang, W., Jiang, G., Dean, K.C., Clem, B., Telang, S., Jenson, A.B., Cuatrecasas, M., Chesney, J., Darling, D.S., Postigo, A., Dean, D.C., 2014. Different thresholds of ZEB1 are required for Ras-mediated tumour initiation and metastasis. Nat Commun 5, 5660. https://doi.org/10.1038/ncomms6660

Mabry, A.R., Gorman, J., Delvasto, J.S., Lavik, A.R., Layer, J.H., Mayo, L.D., 2024. Activation of the Snail transcription factor induces Mdm2 gene expression. Journal of Biological Chemistry 300, 107811. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107811

Martin, C.J., Datta, A., Littlefield, C., Kalra, A., Chapron, C., Wawersik, S., Dagbay, K.B., Brueckner, C.T., Nikiforov, A., Danehy, F.T., Streich, F.C., Boston, C., Simpson, A., Jackson, J.W., Lin, S., Danek, N., Faucette, R.R., Raman, P., Capili, A.D., Buckler, A., Carven, G.J., Schürpf, T., 2020. Selective inhibition of TGFβ1 activation overcomes primary resistance to checkpoint blockade therapy by altering tumor immune landscape. Sci. Transl. Med. 12, eaay8456. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay8456

Massagué, J., 1998. TGF-β SIGNAL TRANSDUCTION. Annu. Rev. Biochem. 67, 753–791. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.753

McGrath, J.P., Capon, D.J., Smith, D.H., Chen, E.Y., Seeburg, P.H., Goeddel, D.V., Levinson, A.D., 1983. Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. Nature 304, 501–506. https://doi.org/10.1038/304501a0

Meyer, T.S., Lamberts, B.L., 1965. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 107, 144–145. https://doi.org/10.1016/0304-4165(65)90403-4

Miyazono, K., 2009. Transforming growth factor-.BETA. signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. Proc. Jpn. Acad., Ser. B 85, 314–323. https://doi.org/10.2183/pjab.85.314

Nakao, A., Afrakhte, M., Morn, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.-E., Heldin, C.-H., Dijke, P.T., 1997. Identification of Smad7, a TGFβ-inducible antagonist of TGF-β signalling. Nature 389, 631–635. https://doi.org/10.1038/39369

Nieto, M.A., Huang, R.Y.-J., Jackson, R.A., Thiery, J.P., 2016. EMT: 2016. Cell 166, 21–45. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028

Nieto, M.A., Sargent, M.G., Wilkinson, D.G., Cooke, J., 1994. Control of Cell Behavior During Vertebrate Development by *Slug* , a Zinc Finger Gene. Science 264, 835–839. https://doi.org/10.1126/science.7513443

Nurmagambetova, A., Mustyatsa, V., Saidova, A., Vorobjev, I., 2023. Morphological and cytoskeleton changes in cells after EMT. Sci Rep 13, 22164. https://doi.org/10.1038/s41598-023-48279-y

Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., Kluding, H., 1984. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in Drosophila melanogaster: I. Zygotic loci on the second chromosome. Wilhelm Roux' Archiv 193, 267–282. https://doi.org/10.1007/BF00848156

Oft, M., Akhurst, R.J., Balmain, A., 2002. Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. Nat Cell Biol 4, 487–494. https://doi.org/10.1038/ncb807

Oft, M., Heider, K.-H., Beug, H., 1998. TGFβ signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. Current Biology 8, 1243–1252. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(07)00533-7

Oft, M., Peli, J., Rudaz, C., Schwarz, H., Beug, H., Reichmann, E., 1996. TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. Genes Dev. 10, 2462–2477. https://doi.org/10.1101/gad.10.19.2462

Ogawa, Y., Imamoto, N., 2021. Methods to separate nuclear soluble fractions reflecting localizations in living cells. iScience 24, 103503. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103503

Ogawa, Y., Imamoto, N., 2018. Nuclear transport adapts to varying heat stress in a multistep mechanism. Journal of Cell Biology 217, 2341–2352. https://doi.org/10.1083/jcb.201712042

Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., Weinberg, R.A., 2008. Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways. Cancer Research 68, 3645–3654. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2938

Orr-Urtreger, A., Bedford, M.T., Burakova, T., Arman, E., Zimmer, Y., Yayon, A., Givol, D., Lonai, P., 1993. Developmental Localization of the Splicing Alternatives of Fibroblast Growth Factor Receptor-2 (FGFR2). Developmental Biology 158, 475–486. https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1205

Otake, S., Itoh, Y., Omata, C., Saitoh, M., Miyazawa, K., 2021. ZEB1 and oncogenic Ras constitute a regulatory switch for stimulus-dependent E-cadherin downregulation. Cancer Sci 112, 205–216. https://doi.org/10.1111/cas.14701

Parums, D.V., 2022. Editorial: Recent Approval of Sotorasib as the First Targeted Therapy for KRAS G12C-Mutated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). Med Sci Monit 28. https://doi.org/10.12659/MSM.938746

Pastushenko, I., Blanpain, C., 2019. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. Trends in Cell Biology 29, 212–226. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001

Peinado, H., Olmeda, D., Cano, A., 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? Nat Rev Cancer 7, 415–428. https://doi.org/10.1038/nrc2131

Peinado, H., Quintanilla, M., Cano, A., 2003. Transforming Growth Factor β-1 Induces Snail Transcription Factor in Epithelial Cell Lines. Journal of Biological Chemistry 278, 21113–21123. https://doi.org/10.1074/jbc.M211304200

Peindl, M., Göttlich, C., Crouch, S., Hoff, N., Lüttgens, T., Schmitt, F., Pereira, J.G.N., May, C., Schliermann, A., Kronenthaler, C., Cheufou, D., Reu-Hofer, S., Rosenwald, A., Weigl, E., Walles, T., Schüler, J., Dandekar, T., Nietzer, S., Dandekar, G., 2022. EMT, Stemness, and Drug Resistance in Biological Context: A 3D Tumor Tissue/In Silico Platform for Analysis of Combinatorial Treatment in NSCLC with Aggressive KRAS-Biomarker Signatures. Cancers 14, 2176. https://doi.org/10.3390/cancers14092176

Perez-Oquendo, M., Gibbons, D.L., 2022a. Regulation of ZEB1 Function and Molecular Associations in Tumor Progression and Metastasis. Cancers 14, 1864. https://doi.org/10.3390/cancers14081864

Perez-Oquendo, M., Gibbons, D.L., 2022b. Regulation of ZEB1 Function and Molecular Associations in Tumor Progression and Metastasis. Cancers 14, 1864. https://doi.org/10.3390/cancers14081864

Perez-Oquendo, M., Manshouri, R., Tian, Y., Fradette, J.J., Rodriguez, B.L., Kundu, S.T., Gibbons, D.L., 2023. ZEB1 Is Regulated by K811 Acetylation to Promote Stability, NuRD Complex Interactions, EMT, and NSCLC Metastasis. Molecular Cancer Research 21, 779–794. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-22-0503

Pillai-Kastoori, L., Schutz-Geschwender, A.R., Harford, J.A., 2020. A systematic approach to quantitative Western blot analysis. Analytical Biochemistry 593, 113608. https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113608

Plowman, S.J., Williamson, D.J., O'Sullivan, M.J., Doig, J., Ritchie, A.-M., Harrison, D.J., Melton, D.W., Arends, M.J., Hooper, M.L., Patek, C.E., 2003. While K- *ras* Is Essential for MouseDevelopment, Expression of the K- *ras* 4A Splice VariantIsDispensable. Molecular and Cellular Biology 23, 9245–9250. https://doi.org/10.1128/MCB.23.24.9245-9250.2003

Preca, B.-T., Bajdak, K., Mock, K., Lehmann, W., Sundararajan, V., Bronsert, P., Matzge-Ogi, A., Orian-Rousseau, V., Brabletz, S., Brabletz, T., Maurer, J., Stemmler, M.P., 2017. A novel ZEB1/HAS2 positive feedback loop promotes EMT in breast cancer. Oncotarget 8, 11530–11543. https://doi.org/10.18632/oncotarget.14563

Prichard, P.M., Cormier, M.J., 1968. Studies on the mechanism of the horseradish peroxidase catalyzed luminescent peroxidation of luminol. Biochemical and Biophysical Research Communications 31, 131–136. https://doi.org/10.1016/0006-291X(68)90042-9

Principe, D.R., Diaz, A.M., Torres, C., Mangan, R.J., DeCant, B., McKinney, R., Tsao, M.-S., Lowy, A., Munshi, H.G., Jung, B., Grippo, P.J., 2017. TGFβ engages MEK/ERK to differentially regulate benign and malignant pancreas cell function. Oncogene 36, 4336–4348. https://doi.org/10.1038/onc.2016.500

Rid, R., Schiefermeier, N., Grigoriev, I., Small, J.V., Kaverina, I., 2005. The last but not the least: The origin and significance of trailing adhesions in fibroblastic cells. Cell Motil. Cytoskeleton 61, 161–171. https://doi.org/10.1002/cm.20076

Robert Koch-Institut, 2023. Krebs in Deutschland für 2019/2020.

Roberts, A.B., Wakefield, L.M., 2003. The two faces of transforming growth factor β in carcinogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 8621–8623. https://doi.org/10.1073/pnas.1633291100

Safina, A.F., Varga, A.E., Bianchi, A., Zheng, Q., Kunnev, D., Liang, P., Bakin, A., 2009. Ras alters epithelial-mesenchymal transition in response to TGF-β by reducing actin fibers and cell-matrix adhesion. Cell Cycle 8, 284–298. https://doi.org/10.4161/cc.8.2.7590

Saitoh, M., 2023. Transcriptional regulation of EMT transcription factors in cancer. Seminars in Cancer Biology 97, 21–29. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2023.10.001

Saitoh, M., Endo, K., Furuya, S., Minami, M., Fukasawa, A., Imamura, T., Miyazawa, K., 2016. STAT3 integrates cooperative Ras and TGF-β signals that induce Snail expression. Oncogene 35, 1049–1057. https://doi.org/10.1038/onc.2015.161

Salinovich, O., Montelaro, R.C., 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Analytical Biochemistry 156, 341–347. https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90263-0

Sánchez-Tilló, E., Liu, Y., de Barrios, O., Siles, L., Fanlo, L., Cuatrecasas, M., Darling, D.S., Dean, D.C., Castells, A., Postigo, A., 2012. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. Cell. Mol. Life Sci. 69, 3429–3456. https://doi.org/10.1007/s00018-012-1122-2

Sánchez-Tilló, E., Pedrosa, L., Vila, I., Chen, Y., Győrffy, B., Sánchez-Moral, L., Siles, L., Lozano, J.J., Esteve-Codina, A., Darling, D.S., Cuatrecasas, M., Castells, A., Maurel, J., Postigo, A., 2023. The EMT factor ZEB1 paradoxically inhibits EMT in BRAF-mutant carcinomas. JCI Insight 8, e164629. https://doi.org/10.1172/jci.insight.164629

Sander, H., Wallace, S., Plouse, R., Tiwari, S., Gomes, A.V., 2019. Ponceau S waste: Ponceau S staining for total protein normalization. Analytical Biochemistry 575, 44–53. https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.03.010

Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., Wittinghofer, A., 1997. The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants. Science 277, 333–339. https://doi.org/10.1126/science.277.5324.333

Shapiro, A.L., Viñuela, E., V. Maizel, J., 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochemical and Biophysical Research Communications 28, 815–820. https://doi.org/10.1016/0006-291X(67)90391-9

Shih, J.-Y., Yang, P.-C., 2011. The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. Carcinogenesis 32, 1299–1304. https://doi.org/10.1093/carcin/bgr110

Shimizu, Kenji, Birnbaum, D., Ruley, M.A., Fasano, O., Suard, Y., Edlund, L., Taparowsky, E., Goldfarb, M., Wigler, M., 1983. Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. Nature 304, 497–500. https://doi.org/10.1038/304497a0

Shimizu, K, Goldfarb, M., Perucho, M., Wigler, M., 1983. Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 383–387. https://doi.org/10.1073/pnas.80.2.383

Shirakihara, T., Saitoh, M., Miyazono, K., 2007. Differential Regulation of Epithelial and Mesenchymal Markers by δEF1 Proteins in Epithelial–Mesenchymal Transition Induced by TGF-β. MBoC 18, 3533–3544. https://doi.org/10.1091/mbc.e07-03-0249

Sigma Aldrich, n.d. Sigma Aldrich ZEB 1 Antikörper HPA027524 [WWW Document]. URL https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/hpa027524 (accessed 9.29.25).

Singh, A., Greninger, P., Rhodes, D., Koopman, L., Violette, S., Bardeesy, N., Settleman, J., 2009. A Gene Expression Signature Associated with “K-Ras Addiction” Reveals Regulators of EMT and Tumor Cell Survival. Cancer Cell 15, 489–500. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.022

Sinh, N.D., Endo, K., Miyazawa, K., Saitoh, M., 2017. Ets1 and ESE1 reciprocally regulate expression of ZEB1/ZEB2, dependent on ERK1/2 activity, in breast cancer cells. Cancer Science 108, 952–960. https://doi.org/10.1111/cas.13214

Smith, B.J., 1994. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins, in: Basic Protein and Peptide Protocols. Humana Press, New Jersey, pp. 23–34. https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:23

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry 150, 76–85. https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7

Solanki, H.S., Welsh, E.A., Fang, B., Izumi, V., Darville, L., Stone, B., Franzese, R., Chavan, S., Kinose, F., Imbody, D., Koomen, J.M., Rix, U., Haura, E.B., 2021. Cell Type–specific Adaptive Signaling Responses to KRASG12C Inhibition. Clinical Cancer Research 27, 2533–2548. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-3872

Stalnecker, C.A., Der, C.J., 2020. RAS, wanted dead or alive: Advances in targeting RAS mutant cancers. Sci. Signal. 13, eaay6013. https://doi.org/10.1126/scisignal.aay6013

Stefanello, S.T., Luchtefeld, I., Liashkovich, I., Pethö, Z., Azzam, I., Bulk, E., Rosso, G., Döhlinger, L., Hesse, B., Oeckinghaus, A., Shahin, V., 2021. Impact of the Nuclear Envelope on Malignant Transformation, Motility, and Survival of Lung Cancer Cells. Advanced Science 8, 2102757. https://doi.org/10.1002/advs.202102757

Stemmler, M.P., Eccles, R.L., Brabletz, S., Brabletz, T., 2019. Non-redundant functions of EMT transcription factors. Nat Cell Biol 21, 102–112. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0196-y

Su, J., Morgani, S.M., David, C.J., Wang, Q., Er, E.E., Huang, Y.-H., Basnet, H., Zou, Y., Shu, W., Soni, R.K., Hendrickson, R.C., Hadjantonakis, A.-K., Massagué, J., 2020. TGF-β orchestrates fibrogenic and developmental EMTs via the RAS effector RREB1. Nature 577, 566–571. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1897-5

Sun, L., Yu, J., Guinney, J., Qin, B., Sinicrope, F.A., 2023. USP10 Regulates ZEB1 Ubiquitination and Protein Stability to Inhibit ZEB1-Mediated Colorectal Cancer Metastasis. Molecular Cancer Research 21, 578–590. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-22-0552

Takeichi, M., 1977. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. The Journal of cell biology 75, 464–474. https://doi.org/10.1083/jcb.75.2.464

Taylor, S.C., Posch, A., 2014. The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. BioMed Research International 2014, 1–8. https://doi.org/10.1155/2014/361590

Ten Dijke, P., Hansen, P., Iwata, K.K., Pieler, C., Foulkes, J.G., 1988. Identification of another member of the transforming growth factor type beta gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 4715–4719. https://doi.org/10.1073/pnas.85.13.4715

Thai, A.A., Solomon, B.J., Sequist, L.V., Gainor, J.F., Heist, R.S., 2021a. Lung cancer. The Lancet 398, 535–554. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00312-3

Thai, A.A., Solomon, B.J., Sequist, L.V., Gainor, J.F., Heist, R.S., 2021b. Lung cancer. The Lancet 398, 535–554. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00312-3

The Human Protein Atlas, n.d. Human Protein Atlas ZEB 1 [WWW Document]. URL https://www.proteinatlas.org/ENSG00000148516-ZEB1/summary/antibody (accessed 9.29.25).

The UniProt Consortium, 2024a. UniProtKB - O43623 (SNAI2_HUMAN) [WWW Document]. UniProt. URL https://www.uniprot.org/uniprotkb/O43623/entry#sequences (accessed 2.28.24).

The UniProt Consortium, 2024b. UniProtKB - O95863 (SNAI1_HUMAN) [WWW Document]. UniProt. URL https://www.uniprot.org/uniprotkb/O95863/entry#sequences (accessed 2.28.24).

The UniProt Consortium, 2024c. UniProtKB - P37275 (ZEB1_HUMAN) [WWW Document]. UniProt. URL https://www.uniprot.org/uniprotkb/P37275/entry#sequences (accessed 2.28.24).

The UniProt Consortium, 2024d. UniProtKB - P15336 (ATF2_HUMAN) [WWW Document]. UniProt. URL https://www.uniprot.org/uniprotkb/P15336/entry#sequences (accessed 2.28.24).

The UniProt Consortium, 2024e. UniProtKB - P40763 (STAT3_HUMAN) [WWW Document]. UniProt. URL https://www.uniprot.org/uniprotkb/P40763/entry#sequences (accessed 2.28.24).

The UniProt Consortium, 2024f. UniProtKB - Q15796 (SMAD2_HUMAN) [WWW Document]. UniProt. URL https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q15796/entry#sequences (accessed 2.28.24).

The UniProt Consortium, 2024g. UniProtKB - P84022 (SMAD3_HUMAN) [WWW Document]. UniProt. URL https://www.uniprot.org/uniprotkb/P84022/entry#sequences (accessed 2.28.24).

The UniProt Consortium, 2024h. UniProtKB - Q13485 (SMAD4_HUMAN) [WWW Document]. UniProt. URL https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q13485/entry#sequences (accessed 2.28.24).

The UniProt Consortium, 2024i. UniProtKB - Q6NXG1 (ESRP1_HUMAN) [WWW Document]. UniProt. URL https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q6NXG1/entry#sequences (accessed 2.28.24).

The UniProt Consortium, 2024j. UniProtKB - Q9H6T0 (ESRP2_HUMAN) [WWW Document]. UniProt. URL https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9H6T0/entry#sequences (accessed 2.28.24).

The UniProt Consortium, 2024k. UniProtKB - P35222 (CTNB1_HUMAN) [WWW Document]. UniProt. URL https://www.uniprot.org/uniprotkb/P35222/entry#sequences (accessed 2.28.24).

The UniProt Consortium, 2024l. UniProtKB - P14923 (PLAK_HUMAN) [WWW Document]. UniProt. URL https://www.uniprot.org/uniprotkb/P14923/entry#sequences (accessed 2.28.24).

The UniProt Consortium, 2024m. UniProtKB - P12830 (CADH1_HUMAN) [WWW Document]. UniProt. URL https://www.uniprot.org/uniprotkb/P12830/entry#sequences (accessed 2.28.24).

The UniProt Consortium, 2024n. UniProtKB - P08670 (VIME_HUMAN) [WWW Document]. UniProt. URL https://www.uniprot.org/uniprotkb/P08670/entry#sequences (accessed 2.28.24).

Thiery, J.P., 2002. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer 2, 442–454. https://doi.org/10.1038/nrc822

Thievessen, I., Thompson, P.M., Berlemont, S., Plevock, K.M., Plotnikov, S.V., Zemljic-Harpf, A., Ross, R.S., Davidson, M.W., Danuser, G., Campbell, S.L., Waterman, C.M., 2013. Vinculin–actin interaction couples actin retrograde flow to focal adhesions, but is dispensable for focal adhesion growth. Journal of Cell Biology 202, 163–177. https://doi.org/10.1083/jcb.201303129

Thisse, B., Messal, M.E., Perrin-Schmitt, F., 1987. The *twist* gene: isolation of a Drosophila zygotle gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. Nucl Acids Res 15, 3439–3453. https://doi.org/10.1093/nar/15.8.3439

Tian, X., Liu, Z., Niu, B., Zhang, J., Tan, T.K., Lee, S.R., Zhao, Y., Harris, D.C.H., Zheng, G., 2011. E-Cadherin/ β -Catenin Complex and the Epithelial Barrier. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2011, 1–6. https://doi.org/10.1155/2011/567305

To, M.D., Wong, C.E., Karnezis, A.N., Del Rosario, R., Di Lauro, R., Balmain, A., 2008. Kras regulatory elements and exon 4A determine mutation specificity in lung cancer. Nat Genet 40, 1240–1244. https://doi.org/10.1038/ng.211

Tojkander, S., Gateva, G., Lappalainen, P., 2012. Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. Journal of Cell Science jcs.098087. https://doi.org/10.1242/jcs.098087

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4350–4354. https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350

Vanderperre, B., Lucier, J.-F., Bissonnette, C., Motard, J., Tremblay, G., Vanderperre, S., Wisztorski, M., Salzet, M., Boisvert, F.-M., Roucou, X., 2013. Direct Detection of Alternative Open Reading Frames Translation Products in Human Significantly Expands the Proteome. PLoS ONE 8, e70698. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070698

Vangerow, A.S., 2026. Wirkung der K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 auf Prozesse der epithelial-mesenchymalen Transition in Lungen- und Pankreaskarzinomzellen. Justus-Liebig-Universität Gießen. https://doi.org/10.22029/JLUPUB-20875

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, D., 1999. SIP1, a Novel Zinc Finger/Homeodomain Repressor, Interacts with Smad Proteins and Binds to 5′-CACCT Sequences in Candidate Target Genes. Journal of Biological Chemistry 274, 20489–20498. https://doi.org/10.1074/jbc.274.29.20489

Virtakoivu, R., Mai, A., Mattila, E., De Franceschi, N., Imanishi, S.Y., Corthals, G., Kaukonen, R., Saari, M., Cheng, F., Torvaldson, E., Kosma, V.-M., Mannermaa, A., Muharram, G., Gilles, C., Eriksson, J., Soini, Y., Lorens, J.B., Ivaska, J., 2015. Vimentin–ERK Signaling Uncouples Slug Gene Regulatory Function. Cancer Research 75, 2349–2362. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2842

Voulgari, A., Pintzas, A., 2009. Epithelial–mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer 1796, 75–90. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.03.002

Wang, J., Lee, S., Teh, C.E.-Y., Bunting, K., Ma, L., Shannon, M.F., 2009. The transcription repressor, ZEB1, cooperates with CtBP2 and HDAC1 to suppress IL-2 gene activation in T cells. International Immunology 21, 227–235. https://doi.org/10.1093/intimm/dxn143

Wang, Y., Ngo, V.N., Marani, M., Yang, Y., Wright, G., Staudt, L.M., Downward, J., 2010. Critical role for transcriptional repressor Snail2 in transformation by oncogenic RAS in colorectal carcinoma cells. Oncogene 29, 4658–4670. https://doi.org/10.1038/onc.2010.218

Wang, Yue, You, M., Wang, Yian, 2001. ALTERNATIVE SPLICING OF THE K-RAS GENE IN MOUSE TISSUES AND CELL LINES. Experimental Lung Research 27, 255–267. https://doi.org/10.1080/019021401300054028

Warzecha, C.C., Jiang, P., Amirikian, K., Dittmar, K.A., Lu, H., Shen, S., Guo, W., Xing, Y., Carstens, R.P., 2010. An ESRP-regulated splicing programme is abrogated during the epithelial–mesenchymal transition. EMBO J 29, 3286–3300. https://doi.org/10.1038/emboj.2010.195

Warzecha, C.C., Sato, T.K., Nabet, B., Hogenesch, J.B., Carstens, R.P., 2009a. ESRP1 and ESRP2 Are Epithelial Cell-Type-Specific Regulators of FGFR2 Splicing. Molecular Cell 33, 591–601. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.025

Warzecha, C.C., Shen, S., Xing, Y., Carstens, R.P., 2009b. The epithelial splicing factors ESRP1 and ESRP2 positively and negatively regulate diverse types of alternative splicing events. RNA Biology 6, 546–562. https://doi.org/10.4161/rna.6.5.9606

Weiß, C., 2019. Basiswissen medizinische Statistik, 7., vollständige und überarbeitete Auflage. ed, Lehrbuch. Springer, Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-56588-9

Wulf, E., Deboben, A., Bautz, F.A., Faulstich, H., Wieland, T., 1979. Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4498–4502. https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4498

Xie, L., Law, B.K., Chytil, A.M., Brown, K.A., Aakre, M.E., Moses, H.L., 2004. Activation of the Erk Pathway Is Required for TGF-β1-Induced EMT In Vitro. Neoplasia 6, 603–610. https://doi.org/10.1593/neo.04241

Xu, J., Lamouille, S., Derynck, R., 2009. TGF-β-induced epithelial to mesenchymal transition. Cell Res 19, 156–172. https://doi.org/10.1038/cr.2009.5

Yoon, Y., Kim, H., Han, S., Oh, D.Y., Im, S., Bang, Y., Kim, T., 2010. KRAS mutant lung cancer cells are differentially responsive to MEK inhibitor due to AKT or STAT3 activation: Implication for combinatorial approach. Molecular Carcinogenesis 49, 353–362. https://doi.org/10.1002/mc.20607

Zhang, N., Liu, Y., Wang, Y., Zhao, M., Tu, L., Luo, F., 2017. Decitabine reverses TGF-beta 1-induced epithelial & mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer by regulating miR-200/ZEB axis. DDDT Volume11, 969–983. https://doi.org/10.2147/DDDT.S129305

Zhang, Y.E., 2017. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-β Family. Cold Spring Harb Perspect Biol 9, a022129. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022129

Zhang, Y.E., 2009. Non-Smad pathways in TGF-β signaling. Cell Res 19, 128–139. https://doi.org/10.1038/cr.2008.328

Zhong, X., Zheng, L., Shen, J., Zhang, D., Xiong, M., Zhang, Y., He, X., Tanyi, J.L., Yang, F., Montone, K.T., Chen, X., Xu, C., Xiang, A.P., Huang, Q., Xu, X., Zhang, L., 2016. Suppression of MicroRNA 200 Family Expression by Oncogenic KRAS Activation Promotes Cell Survival and Epithelial-Mesenchymal Transition in KRAS-Driven Cancer. Molecular and Cellular Biology 36, 2742–2754. https://doi.org/10.1128/MCB.00079-16

9 Anhang

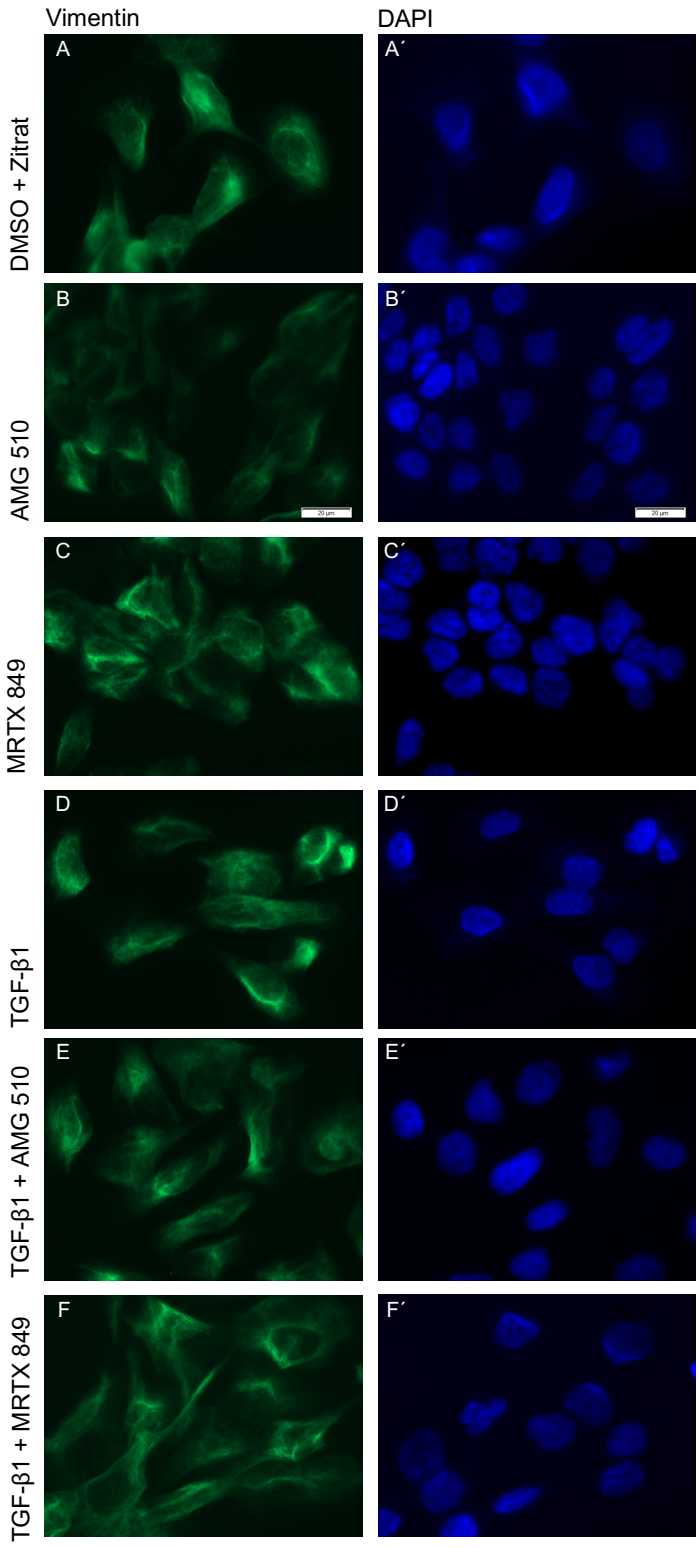


Abbildung 25: Immunzytochemische Analyse von Vimentin in H358 Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

H358 Zellen wurden mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Nach 48 h Inkubationszeit erfolgte die Fixierung mit 2 % Formaldehyd und Anfärbung der Proteine mit spezifischen Antikörpern und fluoreszierenden Zweitantikörpern (Vimentin (RB) – Alexa 488 - grün). Die Zellkerne wurde in Blau mittels DAPI angefärbt und sind in A´-F´ dargestellt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einem 60 x Objektiv. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

Maßstab ▭ : 20 µm

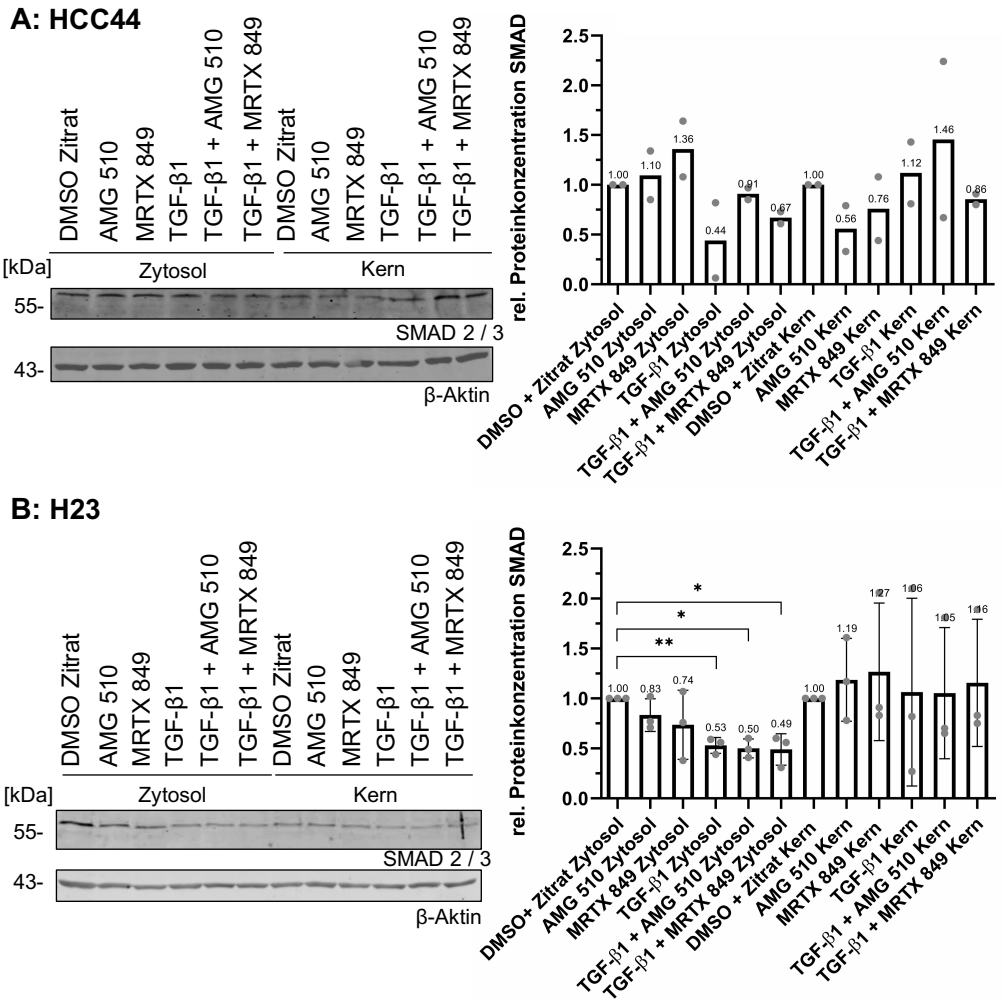


Abbildung 26: Veränderungen der SMAD 2 / 3 Proteinmenge nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

H23 und HCC44 Zellen wurden für 48 h mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Je 30 µg Protein der Kern- und Zytosolfraktion wurden in einem 10 %igen Acrylamidgel aufgetrennt. Die beiden Proteine wurden mit einem gemeinsamen spezifischen Antikörper angefärbt. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Blot aus zwei (HCC44) bzw. drei (H23) unabhängigen Versuchen. Die densitometrische Auswertung erfolgte normiert auf die Beladungskontrolle β-Aktin und ist in Relation zur Menge der Kontroll-Kern- bzw. Zytosolfraktion (DMSO + Zitrat) (≙ 1,0) angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen sowie die Einzelwerte (•). Die statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte in Bezug auf die DMSO-Zitrat Kontrolle bzw. die TGF-β1 stimulierte Fraktion (Signifikanzniveau $p < 0,05$ = *, $p < 0,01$ = **) wurde mittels eines Einstichproben sowie ungepaarten t-Tests analysiert.

Tabelle 12: Durchschnittliche Anzahl der fokalen Kontakte pro Zelle

Die durchschnittliche Anzahl der fokalen Kontakte pro Zelle wurde anhand der Immunzytochemie von Vinculin in HCC44 Zellen (s. Abb. 23 A´- F´) mittels der Software CellSens Dimension 1.6. von Olympus bestimmt. Angegeben sind die Anzahl der fokalen Kontakte pro Zelle nach 48-stündiger Behandlung mit den K-Ras^{G12C} Inhibitoren AMG 510 oder MRTX 849 und / oder TGF-β1, sowie deren Mittelwert (MW) und Standardabweichung (± SD).

HCC44	DMSO + Zitrat	AMG 510	MRTX 849	TGF-β1	TGF-β1 + AMG 510	TGF-β1 + MRTX 849
Zelle 1	48	68	103	108	129	112
Zelle 2	49	64	75	154	95	122
Zelle 3	43	64	65	79	136	
Zelle 4	73	71	39		72	
Zelle 5	43	54	39			
Zelle 6	74					
MW ± SD	**55** ± 14,55	**64,2** ± 6,42	**64,2** ± 26,89	**113,67** ± 37,82	**108** ± 29,94	**117**

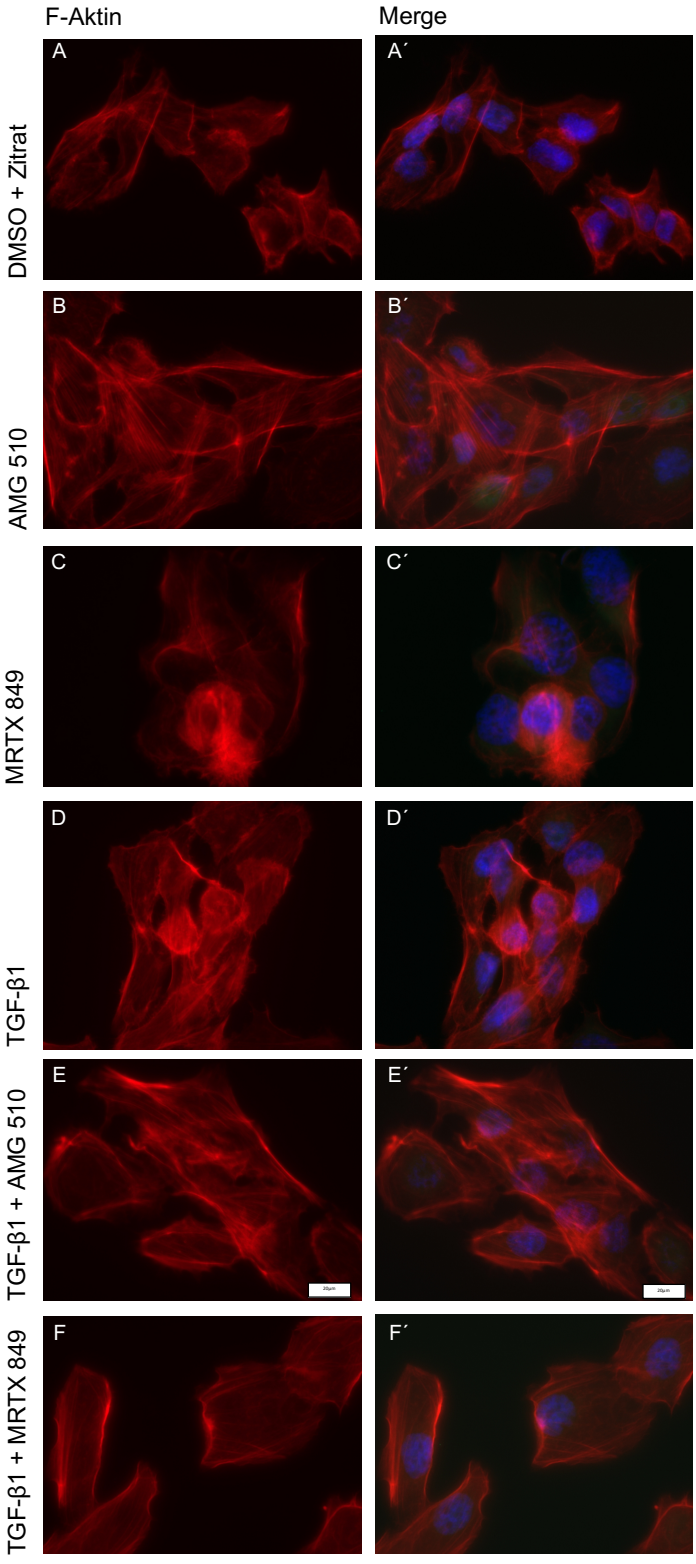


Abbildung 27: Immunzytochemische Analyse von F-Aktin in H358 Zellen nach Inhibition von K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

H358 Zellen wurden mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Nach 48 h Inkubationszeit erfolgte die Fixierung mit 2 % Formaldehyd und Anfärbung von F-Aktin mit einer fluoreszenzmarkierten Sonde (Texas Red™-X Phalloidin - rot). Die Zellkerne wurde in Blau mittels DAPI dargestellt und sind in A´-F´ in der Überlagerung (Merge) mit Phalloidin dargestellt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einem 60 x Objektiv. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

Maßstab ▭ : 20 µm

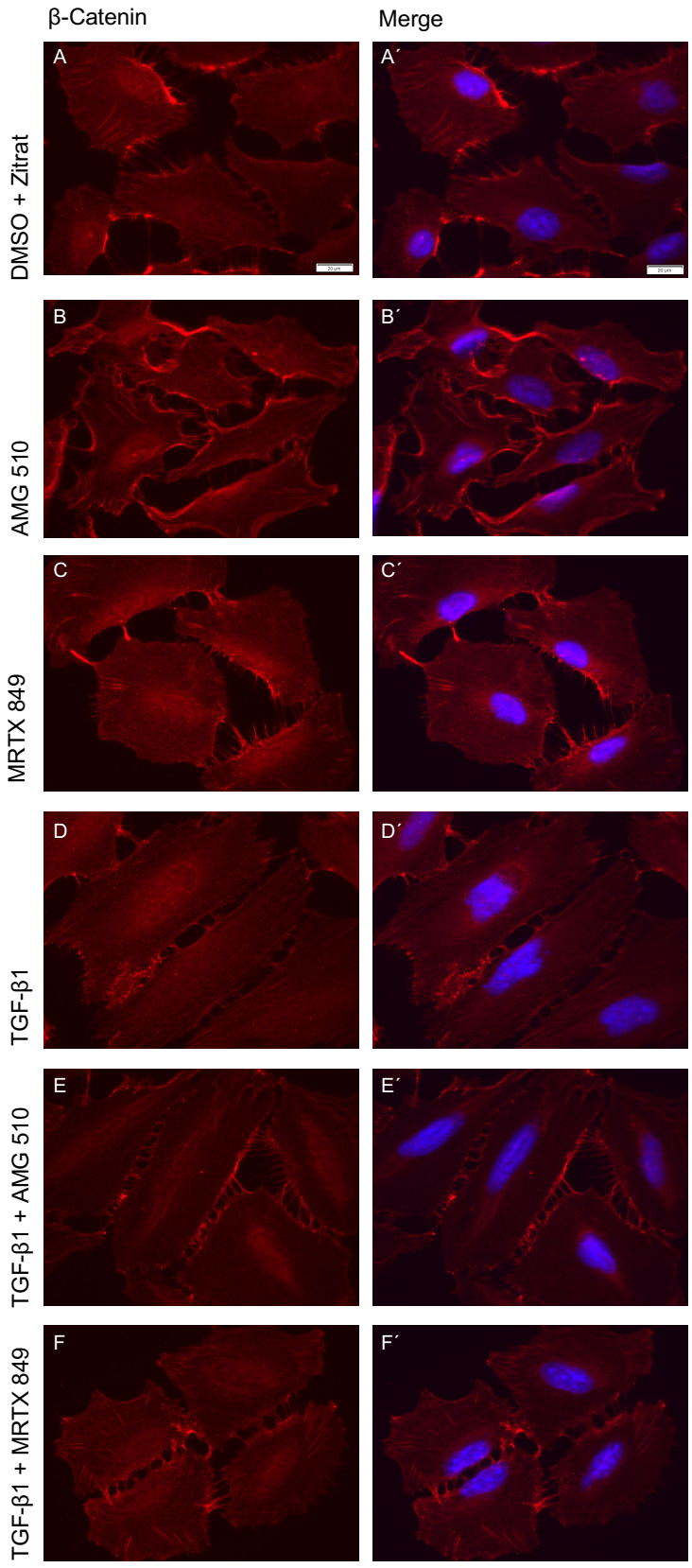


Abbildung 28: Immunzytochemische Analyse von β-Catenin in HCC44 Zellen nach Inhibition mit K-Ras^{G12C} und / oder Stimulation mit TGF-β1

HCC44 Zellen wurden mit 10 nM AMG 510 oder MRTX 849 inhibiert und / oder mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert. Nach 48 h Inkubationszeit erfolgte die Fixierung mit 1:1 Methanol - Aceton und anschließend die Anfärbung der Proteine mit spezifischen Antikörpern und fluoreszierenden Zweitantikörpern (β-Catenin (MS) – Cy 3 - rot). Die Zellkerne wurde in Blau mittels DAPI dargestellt und sind in A´-F´ in der Überlagerung (Merge) mit β-Catenin dargestellt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einem 60 x Objektiv. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

Maßstab : 20 µm

Tabelle 13: (Mögliche) Isoformen von ZEB 1 aus der Proteindatenbank *UniProt*

	Eintragsname Uni Prot Datenbank	Molekulargewicht (in kDa)	Länge (in Anzahl der Aminosäuren)
Alternatives Spleißen	P37275-1 (kanonische Isoform)	124,07	1 125
	P37275-2	124,076	1 125
	P37275-3	116,593	1 057
	P37275-4	122,003	1 104
	P37275-5	122,084	1 108
Mögliche weitere Isoformen	F6TDF5_HUMAN	32,9	298
	H0YMD3_HUMAN	29,751	274
	F6U0D0_HUMAN	5,996	53
	H0YND9_HUMAN	32,89	288

(The UniProt Consortium, 2024c)

10 Erklärung zur Dissertation

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

Ort, Datum	Unterschrift

11 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt allen, die mich bei dieser Dissertation unterstützt haben.
An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Andre Menke, für die hervorragende Betreuung im Labor und bei der Verschriftlichung der Dissertation sowie für die Überlassung des spannenden Themas bedanken.
Zudem bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl für die kompetenten Antworten zu allen aufkommenden Fragen während des Laboralltags.
Vielen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe Menke und Giehl, insbesondere an Dirk Lohfink und meinen Mitdoktoranten, für die Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit im Labor.
Besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und Moritz für die Unterstützung in den letzten Jahren.