

*Die Rolle der FGF14-Expression bei den Zelllinien
Nicht-Kleinzelliger-Lungenkarzinome*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Frederik Herzberg
aus Kiel

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

AG Savai

Lung Microenvironmental Niche in Cancerogenesis

Abteilung IV

Entwicklung und Umbau der Lunge

Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung

Gutachter: Prof. Dr. Savai

Gutachter: PD Dr. Wiesner

Tag der Disputation: 27.09.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie und klinische Manifestation des Lungenkarzinoms.....	1
1.2	Karzinogenese und Ätiologie des Lungenkarzinoms.....	3
1.3	Histologische und molekularbiologische Differenzierung des Nicht-Kleinzelligen-Lungenkarzinoms ...	5
1.4	Die zielgerichtete Therapie zur Behandlung eines Nicht-Kleinzelligen-Lungenkarzinoms	6
1.5	Die Fibroblast-Growth-Factor-Familie und ihre Rolle bei malignen Neoplasien	7
1.6	Die Physiologischen und Pathophysiologischen Funktionen des <i>FGF14</i> -Proteins	8
1.7	Zielsetzung und Fragestellungen dieser Arbeit	9
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Materialien und Geräte.....	11
2.1.1	Geräte	11
2.1.2	Software	12
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	12
2.1.4	Reagenzien	13
2.1.5	Zellkultur.....	14
2.1.6	Kits	14
2.1.7	Puffer.....	14
2.2	<i>In-Silico</i> -Methoden.....	16
2.2.1	TCGA-Kohorten	16
2.2.2	Analyse der mRNA-Expression der TCGA-Kohorten.....	16
2.2.3	Analyse des Gesamtüberlebens der TCGA-Kohorten	16
2.2.4	Gene set over-representation analysis	17
2.2.5	ORA-Visualisierung mit Cytoscape.....	17
2.3	Zellbiologische Methoden	17
2.3.1	Zellkultivierung	18
2.3.2	Auftauen von Zellen.....	18
2.3.3	Ablösen, Zählen und Passagieren von Zellen	18
2.3.4	Einfrieren von Zellen.....	18
2.3.5	Plasmid-Transfektion	19
2.3.6	siRNA-Transfektion.....	19
2.3.7	BrdU-Assay	20
2.3.8	Kolonienbildungs-Assay	21
2.3.9	Transwell-Assay.....	21
2.3.10	Wundheilungs-Assay	22
2.4	Humanes Probenmaterial	22
2.5	Molekularbiologische Methoden	22
2.5.1	RNA humaner Lungengewebsproben.....	23
2.5.2	RNA-Isolationen nach der Single-Step Methode.....	23
2.5.3	Säulenbasierte RNA-Isolation	23
2.5.4	Reverse Transkription	24
2.5.5	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion	25

2.5.6	RNA-Sequenzierung.....	26
2.6	Proteinbiochemische Methoden.....	27
2.6.1	Isolation des Gesamtproteins.....	27
2.6.2	Bicinchoninsäure-Assay	27
2.6.3	Probenvorbereitung für die SDS-PAGE.....	28
2.6.4	Herstellen eines SDS-Polyacrylamid-Gels	29
2.6.5	SDS-PAGE.....	30
2.6.6	Westernblot.....	30
2.6.7	Immundetektion	31
2.6.8	Western-Blot Quantifizierung	31
2.7	Morphologische und histologische Methoden.....	32
2.7.1	Immunfluoreszenzzytochemie.....	32
2.7.2	Lungengewebsschnitte.....	33
2.7.3	Immunhistochemische Polymerfärbung.....	33
2.8	Statistik	34
3	Ergebnisse	36
3.1	Die <i>FGF14</i> -Expression korrelierte mit dem Gesamtüberleben der TCGA-LUAD-Patientenkohorte.	36
3.2	Eine Überexpression von <i>FGF14</i> reduzierte die Proliferations- und Migrationskapazität <i>in vitro</i>	38
3.3	Eine Reduktion der <i>FGF14</i> -Expression erhöhte die Proliferations- und Migrationskapazität <i>in vitro</i> ...	40
3.4	Eine Überexpression von <i>FGF14</i> beeinflusste das Transkriptom von A549-Zellen.....	41
3.5	Die DEG <i>CCBE1</i> , <i>ADARB1</i> , <i>MUC16</i> und <i>COL11A1</i> waren bei der TCGA-LUAD-Kohorte dysreguliert ...	43
3.6	Validierung der <i>CCBE1</i> -, <i>ADARB1</i> -, <i>MUC16</i> - und <i>COL11A1</i> -Expression bei LUAD und A549-Zellen	45
4	Diskussion.....	47
4.1	Verschiedene Tumorentitäten weisen eine reduzierte <i>FGF14</i> -Expression auf.....	47
4.2	Eine Elevation der <i>FGF14</i> -Expression reduziert die Proliferations- und Migrationskapazität	47
4.3	Eine Reduktion der <i>FGF14</i> -Expression erhöht die Proliferations- und Migrationskapazität.....	48
4.4	Eine Überexpression des <i>FGF14</i> -Gens beeinflusst das Tumorzelltranskriptom	48
4.5	Die DEG <i>CCBE1</i> , <i>ADARB1</i> , <i>MUC16</i> und <i>COL11A1</i> beeinflussen das Tumorzellverhalten.....	50
4.6	Zusammenfassung der diskutierten Inhalte	52
5	Ausblick.....	52
6	Limitationen der Arbeit	53
7	Schlussfolgerungen für die Klinik.....	54
8	Zusammenfassung.....	55
9	Summary.....	56

10	Abkürzungsverzeichnis.....	57
11	Abbildungsverzeichnis.....	58
12	Tabellenverzeichnis.....	61
13	Literaturverzeichnis	62
14	Publikationsverzeichnis	68
15	Ehrenwörtliche Erklärung	69
16	Danksagung.....	70

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und klinische Manifestation des Lungenkarzinoms

Krebs ist in vielen Ländern die führende Ursache eines frühzeitigen Todes, wobei der höchste Anteil an dieser Mortalität (18,2 %) dem Lungenkrebs zugeschrieben wird (**Abb. 1, A**)^{11,68}. In absoluten Zahlen bedeutet dies, dass jährlich ca. 1,8 Millionen Menschen an den Folgen einer Lungenkrebserkrankung versterben^{11,68}.

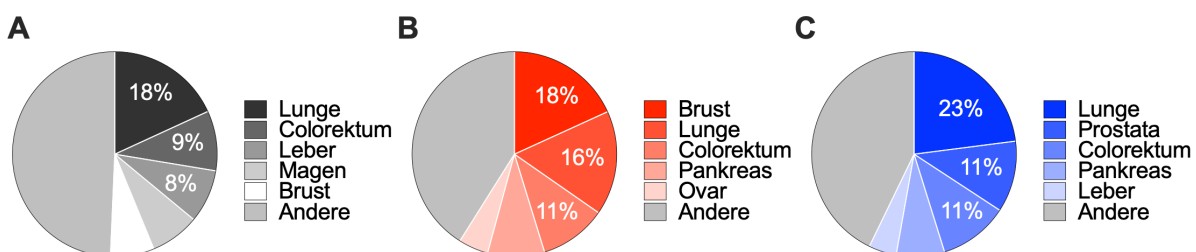


Abbildung 1 Anteil des Lungenkarzinoms an den Krebssterbefällen Deutschlands und der Welt. (A, B, C) Die Tortendiagramme zeigen den relativen Anteil der 5 Krebsentitäten mit den meisten Todesfällen an der Gesamtzahl der Krebstodesfälle in der Welt 2020 (A) und in Deutschland 2020 für weibliche (B) und männliche (C) Individuen aller Altersgruppen. Die den optisch angepassten Abbildungen zugrunde liegenden Daten wurden¹¹ (A, B, C) entnommen. Die abgebildeten Werte wurden auf- oder abgerundet.

Zu Beginn häufig asymptomatisch, präsentiert sich ein an einem Lungenkarzinom erkrankter Mensch früher oder später mit klinisch unspezifischen, respiratorischen Symptomen wie Husten, Dyspnoe, Thoraxschmerzen oder Hämoptysen²¹. Nach röntgenologischer und computertomographischer Untersuchung des Thorax sowie einer bioptischen Sicherung des Primärtumors wurde im Jahr 2018 21.930 Frauen und 35.290 Männern in Deutschland die Diagnose Lungenkrebs gestellt⁵⁷. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung weist ein Großteil aller Patienten bereits Fernmetastasen auf (**Abb. 2, A, B**). Da die kurative, chirurgische Entfernung des Primärtumors in einem solchen Krankheitsstadium nicht mehr möglich ist, ist die Prognose der meisten Erkrankten mit einer über alle Stadien gemittelten 5-Jahres-Überlebensrate von 22 % bei den Frauen und 17 % bei den Männern trotz moderner Strahlen- und Chemotherapien schlecht (**Abb.2, D**)^{42,57}. Anhand der für den Zeitraum 2016-2018 ermittelten, relativen 5-Jahres-Überlebensraten lungenkrebserkrankter Menschen in Deutschland wird der Zusammenhang zwischen dem Stadium bei Erstdiagnose und der Prognose besonders deutlich. Während Erkrankte im Stadium UICC I noch eine relative 5-Jahres-

Überlebensrate von über 60% besitzen, beträgt die Überlebensrate Erkrankter im Stadium UICC IV weniger als 10 % (**Abb. 2, C**)⁵⁷.

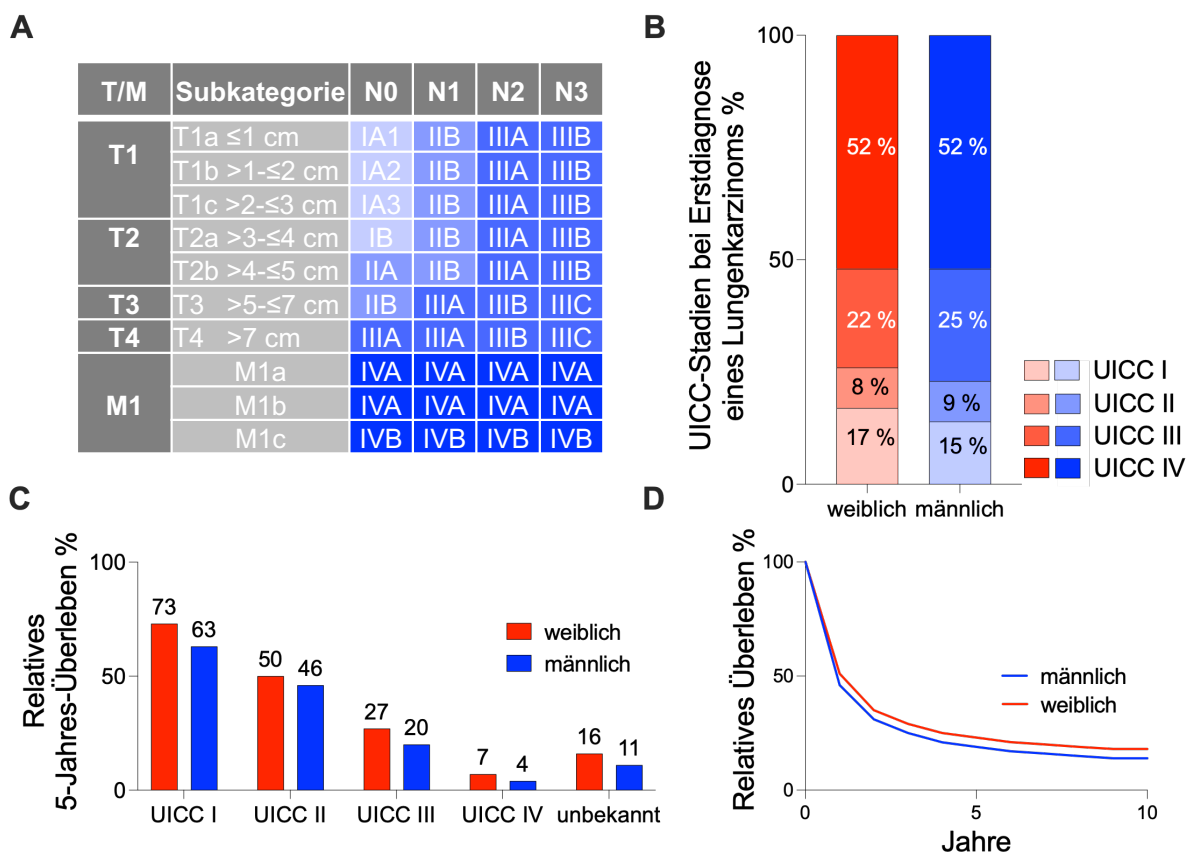


Abbildung 2 Die Überlebensrate Lungenkrebserkrankter ist vom Krankheitsstadium bei der Erstdiagnose abhängig. (A) Die Tabelle zeigt die aktuell gültige 8. Auflage der TNM-Klassifikation und die korrespondierenden UICC-Stadien für Lungenkrebs. T = Tumorgroße. N = Lymphknoten 0 = keine, 1 = ipsilateral, peribronchial, 2 = ipsilateral mediastinal/subcarinal, 3 = kontralateral oder skalenar/supraclavikulär. M = Metastase, 0 = keine, 1a = kontralateral Lunge, 1b = eine extrathorakale, 1c = mehrere extrathorakale. (B) Das Balkendiagramm zeigt die Verteilung der UICC-Stadien (8.Auflage TNM) bei Erstdiagnose eines Lungenkarzinoms (ICD-10 C33-C34) aufgeteilt nach Geschlecht in Deutschland für den Zeitraum 2017-2018. (C) Das Balkendiagramm zeigt das relative 5-Jahres-Überleben Lungenkrebserkrankter (ICD-10 C33-C34) aufgeteilt nach UICC-Stadium (7. Auflage TNM) und Geschlecht in Deutschland für den Zeitraum 2016-2018. (D) Das Kaplan-Meier-Diagramm zeigt die relativen Überlebensraten bis 10 Jahre nach Erstdiagnose eines Lungenkarzinoms (ICD-10 C33-C34) in Deutschland für den Zeitraum 2017-2018 aufgeteilt nach Geschlecht. Die den optisch angepassten Abbildungen zugrunde liegenden Daten wurden³⁴ (A) und⁵⁷ (B, C, D) entnommen. Die abgebildeten Werte wurden auf- oder abgerundet.

Die Überlebensrate Lungenkrebserkrankter zu verbessern, ist Gegenstand der aktuellen medizinischen Forschung. Neben neuen diagnostischen Verfahren zur Früherkennung eines Lungenkarzinoms bedarf es neuer Therapiestrategien zur Behandlung fortgeschrittener Lungenkarzinome. Um solche entwickeln zu können, gilt es, ein tieferes Verständnis der dieser Erkrankung zugrunde liegenden Pathophysiologie zu erlangen.

1.2 Karzinogenese und Ätiologie des Lungenkarzinoms

Damit aus einer Lungenepithelzelle ein Lungenkarzinom entstehen kann, braucht es schrittweise, teils über Jahrzehnte hinweg fortschreitende, durch genetische Instabilität und immunologische Prozesse beförderte Veränderungen des Genoms^{9,81}. Solche, für den Prozess der Krebsentstehung (Karzinogenese) essenziellen, genetischen Veränderungen werden als Driver-Mutationen bezeichnet und von allen übrigen, nichtessenziellen Mutationen eines Tumors unterschieden (Passenger-Mutationen)^{9,81}. Driver-Mutationen betreffen in der Regel Gene, die durch die Regulation bestimmter Kontrollmechanismen und Signalwege das Wachstumsverhalten einer Zelle regulieren (Driver-Gene)⁸. In Abhängigkeit von ihrer Funktion werden diese Driver-Gene entweder als Tumorsuppressorgene oder als Onkogene bezeichnet⁸. Während inaktivierende, homozygote Driver-Mutationen in Tumorsuppressorgenen zu einem Verlust von Mechanismen zur Zellzykluskontrolle und Apoptose führen, befeuern aktivierende Mutationen in Protoonkogenen das für Tumoren typische, maßlose Wachstum durch die ungehemmte Stimulation proliferativer Signalwege⁸.

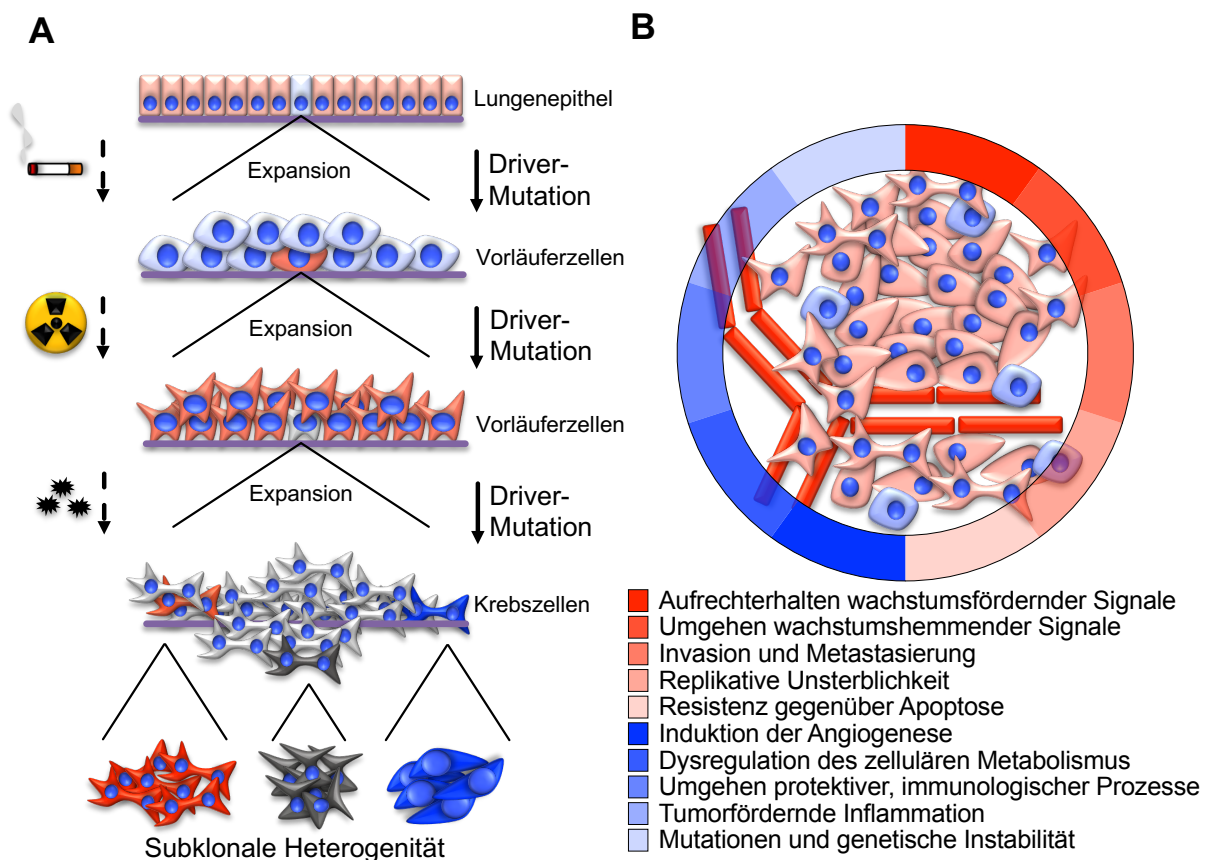


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Entstehung eines Lungenkarzinoms. (A) Eine Lungenepithelzelle (Respiratorisches Epithel oder Alveolarepithel), die über Jahre bis Jahrzehnte verschieden exogenen und endogenen Risikofaktoren ausgesetzt wird, erwirbt Driver-

Mutationen, welche ihr einen Selektionsvorteil gegenüber den anderen Zellen ihres Zellverbandes gewähren. Bereits drei Driver-Mutationen können genügen, um die Zelle in eine Krebszelle zu transformieren. **(B)** Die Charakteristika eines malignen Tumors werden unter dem Begriff „Hallmarks of Cancer“ gesammelt. Die optische Darstellung der Hallmarks of Cancer orientiert sich an der Darstellung von Weinberg et al ¹⁵.

Die Karzinogenese ist ein mehrschrittiger, über Jahre bis Jahrzehnte ablaufender, evolutionärer Prozess ⁸⁰. In diesem gewährt jede Driver-Mutation durch die Steigerung der Proliferations- und Mutationsrate einen Selektionsvorteil, welcher dazu führt, dass sich der neue Genotyp innerhalb eines Zellverbandes durchsetzt (Klonale Expansion) **(Abb. 3, A)** ⁸¹. Mit steigender Anzahl erworbener Mutationen wächst die genetische Heterogenität innerhalb eines Zellverbandes (Subklonale Diversität) **(Abb. 3, A)** ⁸¹. Lungenkarzinome besitzen verglichen mit anderen Krebsentitäten sehr hohe Mutationslasten und sind deshalb genetisch als sehr heterogen zu beschreiben ^{9,70,71}. Es wird angenommen, dass bereits drei Driver-Mutationen genügen, um eine phänotypisch gesunde Zelle in eine invasive, die Basallamina überschreitende Tumorzelle zu transformieren ^{74,80}. Neben der Invasivität präsentieren Tumorzellen noch weitere von Hannahan und Weinberg als “Hallmarks of Cancer” beschriebene Eigenschaften **(Abb. 3, B)** ¹⁵. Zu diesen gehört das Aufrechterhalten wachstumsfördernder bzw. das Umgehen wachstumshemmender Signale, eine replikative Unsterblichkeit und Resistenz gegenüber Apoptose, sowie die Induktion der Angiogenese, die Dysregulation des zellulären Metabolismus, das Aussetzen protektiver, immunologischer Prozesse und die Fähigkeit zur Metastasierung ¹⁵.

Die Akkumulation der für die Karzinogenese einer Lungenepithelzelle kritischen Driver-Mutationen kann durch endogene und exogene Faktoren befördert werden. Den größten endogenen Risikofaktor für das Erkranken an einem Lungenkarzinom stellt eine genetische Prädisposition dar ³⁹. Abseits von seltenen, genetischen Syndromen wird von einer solchen gesprochen, sofern mindestens ein Verwandter ersten Grades an einem Lungenkarzinom erkrankt ist ³⁹. Darüber hinaus können auch strukturelle Lungenpathologien, z.B. eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung, die Entstehung eines Lungenkarzinoms begünstigen ⁷⁷. Bei den exogenen Risikofaktoren handelt es sich neben einer durch Radon bedingten Strahlenbelastung vor allem um inhalative Noxen ⁷⁸. So wurde das Auftreten eines Lungenkarzinoms mit der Inhalation von Asbest, kristallinem Siliziumdioxid, Nickel-Chrom-Legierungen und Feinstaub assoziiert ^{8,38,49,50}. Den wohl größten Risikofaktor für das Erkranken an einem Lungenkarzinom stellt das Rauchen (Inhalation von Nikotinprodukten) bzw. Passivrauchen dar ^{2,73,79}. Es wird angenommen, dass das Rauchen für einen Großteil aller Lungenkrebsfälle verantwortlich ist ².

1.3 Histologische und molekularbiologische Differenzierung des Nicht-Kleinzelligen-Lungenkarzinoms

Historisch werden Lungenkarzinome in Kleinzellige-Lungenkarzinome und Nicht-Kleinzellige-Lungenkarzinome (NSCLC) unterteilt ⁷⁵. In Deutschland und den USA machen die NSCLC ca. 85 % aller Lungenkarzinome aus ^{26,68}. Nach der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation und der internationalen Agentur für Krebsforschung bilden die NSCLC eine heterogene Gruppe verschiedener histologischer Subtypen ⁷⁵. Als häufigste Subtypen treten in Deutschland die Lungenadenokarzinome (LUAD), die Lungenplattenepithelkarzinome (LUSC) und die großzelligen Lungenkarzinome auf (Abb. 4 A, B) ²⁶.

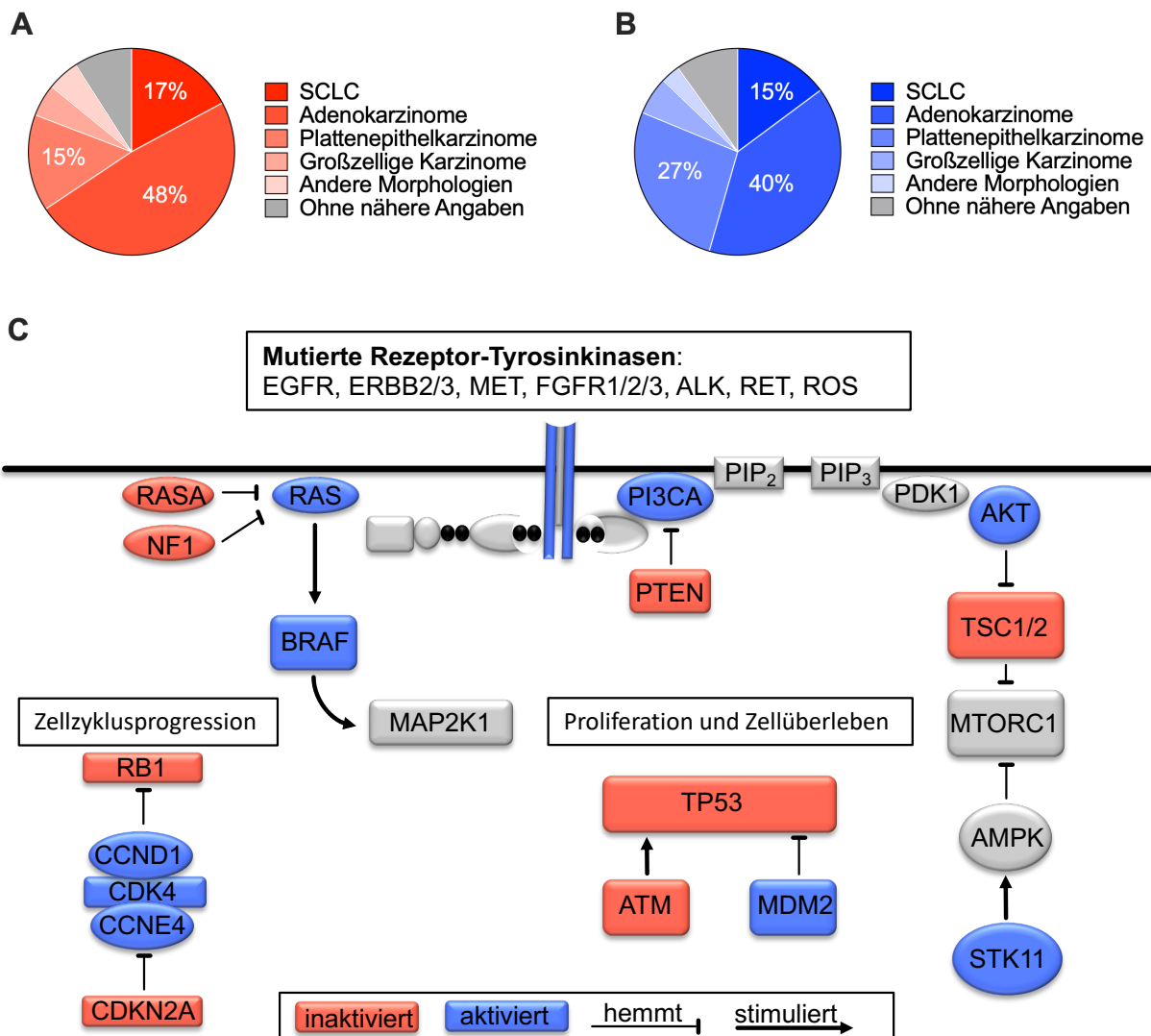


Abbildung 4 Histologische und molekularbiologische Differenzierung des Lungenkarzinoms. Die Tortendiagramme zeigen die Verteilung bösartiger Neubildungen der Lunge nach histologischem Typ für weibliche (A) und männliche (B) Individuen in Deutschland 2017-2018. (C) Das Diagramm zeigt vereinfacht die häufigsten Driver-Mutationen bei NSCLC und ihre Signalkaskaden. Rot = inaktivierende Mutation (Tumorsuppressorgene), blau = aktivierende

Mutation (Onkogene). Die Daten der optisch angepassten Abbildungen wurden ⁵⁷ entnommen (**A**, **B**). Die Abbildung (**C**) wurde nach ¹⁶ konzipiert. Die abgebildeten Werte wurden auf- oder abgerundet.

Um Aufschluss über die Prognose und die Behandlungsoptionen eines Lungenkarzinoms bzw. der verschiedenen Subtypen zu erhalten, gewinnt die genauere Differenzierung der Tumore auf Grundlage molekularbiologischer Marker zunehmend an klinischer Relevanz. Mit der Hilfe moderner molekularbiologischer Methoden ist es möglich, die Driver-Mutationen eines Karzinoms zu detektieren und deren Auswirkungen auf die Signalwege und das Transkriptom der Tumorzellen zu charakterisieren ^{48,70,71,75}. Bei NSCLC sind die meisten relevanten Mutationen mit den Signalwegen der MAP-Kinasen, dem PI3K/AKT/mTor-Signalweg, sowie mit dem Zellüberleben (*TP53*) und der Zellzyklusprogression (*CDKN2A*) assoziiert (**Abb. 4 C**) ^{70–72}. Vergleicht man das Mutationsprofil der beiden häufigsten NSCLC-Subtypen LUSC und LUAD, dann fällt auf, dass LUAD eine geringere Mutationslast besitzen und dass ihre Progression häufiger durch Onkogene vorangetrieben wird ^{16,70–72}. Die häufigsten Driver-Mutationen sind bei LUAD in den Genen des Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGFR) und des Kirsten-Rat-Sarcoma-Proteins (KRAS) sowie dem Tumorsuppressorgen *TP53* zu finden. Demgegenüber wird die Progression von LUSC vor allem durch Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *TP53* und *CDKN2A* befördert ¹⁶.

1.4 Die zielgerichtete Therapie zur Behandlung eines Nicht-Kleinzelligen-Lungenkarzinoms

Auf Grundlage der den Tumorzellen inhärenten molekularbiologischen Charakteristika wurde die zielgerichtete Therapie als Ergänzung zu den herkömmlichen onkologischen Therapieverfahren entwickelt. Das Ziel dieser Therapie ist, die Progression eines Tumors durch die gezielte Inhibition fehlfunktionierender, onkogener Proteine zu stoppen ^{16,54}. In Anbetracht ihres Mutationsprofils eignen sich unter den NSCLC besonders LUAD für die zielgerichtete Therapie ^{16,54}. Bei Patienten mit fortgeschrittenen LUAD war die zielgerichtete Therapie bisher jedoch nur bedingt erfolgreich. Zwar sprachen LUAD-Patienten mit *EGFR*-Mutationen initial sehr gut auf die Behandlung mit einem EGFR-Inhibitor an, doch wurde ihr Gesamtüberleben durch die Therapie im Vergleich zu einer mit herkömmlichen Chemotherapeutika behandelten Kontrollgruppe nur wenig verlängert ^{46,54}. Begründet wird diese Beobachtung mit der subklonalen Diversität innerhalb einer Tumorzellpopulation ⁸². Man geht davon aus, dass mit wachsender Tumormasse die subklonale Diversität und damit auch die Wahrscheinlichkeit für die Existenz therapieresistenter Zellklone ansteigt ⁸². Die

therapieresistenten Zellklone werden durch die zielgerichtete Therapie gezielt selektiert, da es nur ihnen möglich ist, der durch die Inhibition geschaffene Blockade zu entgehen und so den abberant stimulierten Signalweg weiterhin in dem für sie nötigen, hohen Maße zu aktivieren⁸². Neben den Treibern der Karzinogenese selbst könnten auch die von ihnen in ihrer Ausprägung beeinflussten Gene und Signalwege zu einem solchen Resistenzmechanismus beitragen⁵⁸. Um die zielgerichtete Therapie bei NSCLC weiterzuentwickeln und dadurch das Überleben und die Prognose Erkrankter zu verbessern, erscheint es notwendig, auch solche Gene zu erforschen und ihre Funktion genauer zu verstehen.

1.5 Die Fibroblast-Growth-Factor-Familie und ihre Rolle bei malignen Neoplasien

Als eine Gruppe von Proteinen, deren Expression in einer Vielzahl von Tumorentitäten verändert ist, sind die Proteine der Fibroblast-Growth-Factor-Familie (FGF-Familie) und die durch ihre Rezeptoren (FGFR) ausgelösten Signalkaskaden mit dem Zellwachstum, der Zellmigration, dem Zellüberleben sowie mit Prozessen der Angiogenese und Wundheilung assoziiert⁴⁴. Zur FGF-Familie gehören 23 gleichnamige Proteine, die phylogenetisch in 3 Hauptgruppen eingeteilt werden. Die Faktoren der kanonischen (FGF1-2, FGF 4-6, FGF3, FGF7, FGF10, FGF22, FGF9, FGF16, FGF20, FGF8, FGF17, FGF18) und der endokrinen (FGF23, FGF21, FGF15/19) Hauptgruppe sind im sezernierten Zustand durch die Interaktion mit gruppenspezifischen Substanzen in der Lage, eine der 5 korrespondierenden Rezeptor-Tyrosinkinasen zu aktivieren⁴⁴. Physiologisch werden die endokrinen und kanonischen FGF und ihre Rezeptoren in beinahe allen Geweben exprimiert⁴⁴. Durch die Aktivierung der FGFR sind die FGF beider Hauptgruppen sowohl für die Embryogenese als auch die Homöostase adulter Zellen von großer Bedeutung⁴⁴. Da die durch die FGF/FGFR-Interaktionen ausgelösten Signalkaskaden Prozesse wie Proliferation, Migration und Angiogenese anstoßen, ist eine Dysregulation der *FGF*- und *FGFR*-Gene auch bei Krebserkrankungen von pathophysiologischem und therapeutischem Interesse^{44,61}. Bei NSCLC könnten mutierte *FGFR*-Gene und dysregulierte *FGF*-Gene die Malignität und die Therapieresistenz eines Tumors steigern⁶¹. Daher werden Ansätze zur gezielten Inhibition der FGF/FGFR-Interaktion für Patienten mit NSCLC untersucht⁶¹.

Während das Grundlagenwissen um die physiologischen und pathophysiologischen Funktionen der endokrinen und kanonischen FGF und ihrer Rezeptoren bereits zur Entwicklung zielgerichteter Therapieverfahren verwendet wird, existiert über die

Faktoren der dritten Hauptgruppe (FGF11-14) wenig Literatur. Da die Faktoren dieser Hauptgruppe im Gegensatz zu den FGF der anderen beiden Hauptgruppen auf Grund fehlender N-terminaler Sekretionssequenzen nicht sezerniert werden und nicht in der Lage sind, FGFR zu aktivieren, werden sie auch als intrazelluläre FGF oder Fibroblast-Growth-Factors-Homologous-Factors (FHF) bezeichnet ⁴³. Die *FHF*-Gene werden physiologisch hauptsächlich im Gehirn exprimiert ⁶⁴. Dort fungieren sie als intrazelluläre Signalmoleküle und sind durch die Interaktion mit verschiedenen Ionenkanälen an der Reizweiterleitung beteiligt ^{12,59,60}. Ob die FHF wie FGF der anderen Hauptgruppen an der Karzinogenese beteiligt sind, ist Gegenstand aktueller Forschung. Tatsächlich sind die FHF *FGF12*, *FGF13* und *FGF14* bei verschiedenen Tumorentitäten dysreguliert ^{4,6,19,24,67,93}. Insbesondere im Zusammenhang mit einem etwaigen krebstherapeutischen Eingriff in das System aus FGF und FGFR und der Rolle, die FHF als potenziell in Krebserkrankungen verändert exprimierten Signalmolekülen zukommen könnte, erscheint es sinnvoll, auch diese im Kontext von Krebserkrankungen zu erforschen und ihre Funktion zu verstehen.

1.6 Die Physiologischen und Pathophysiologischen Funktionen des *FGF14*-Proteins

Die genaue Funktion des FGF14-Proteins ist sowohl im physiologischen als auch im pathophysiologischen Kontext bisher nicht abschließend geklärt. Weil *FGF14* als ein für die Neurogenese und die Plastizität von Synapsen benötigtes Gen in die embryologische Entwicklung des Gehirns involviert zu sein scheint und eine Mutation des *FGF14*-Gens im Gehirn mit der humanen Erbkrankheit Autosomale-Dominante-Spinozerebelläre-Ataxie-27 assoziiert ist, behandelt ein Großteil der wenigen Literatur zu *FGF14* neuropsychiatrische Fragestellungen ^{69,84,94}. Primär im Gehirn exprimiert, kodiert das *FGF14*-Gen für die zwei sich anhand ihres zellulären Verteilungsmusters unterscheidenden Proteinisoformen FGF14-a und FGF14-b ⁸⁵. Während das im Zytoplasma lokalisierte FGF14-b die Öffnungswahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Natriumkanäle reguliert und verschiedenen Proteinkinasen als Gerüstprotein dient, reichert sich FGF14-a durch den Besitz einer nukleären Lokalisationssequenz im Zellkern an (**Abb. 5**) ⁸⁵. Es wird vermutet, dass das FGF14-Protein dort in der Lage ist, mit seinem N-terminalen Ende DNA zu binden ⁴⁷. Diese Eigenschaft zusammen mit der Tatsache, dass die *FGF14*-Expression der Gewebe verschiedener Tumorentitäten verändert ist, könnte das FGF14-Protein auch bei Tumoren zu einem interessanten Signalmolekül machen ^{6,24,36,67,93}. Tatsächlich deuten *In-vitro*-Studien darauf hin, dass

eine Veränderung der *FGF14*-Expression die Tumoreigenschaften Proliferation und Migration beeinflusst ^{6,24,67,93}. Ob und wie *FGF14* die Tumoreigenschaften bzw. das Tumorzellverhalten von NSCLC-Zellen beeinflusst, wurde bisher nicht erforscht. Aus diesem Grund setzt sich diese Arbeit als Erste das Ziel, die Rolle des *FGF14*-Gens bei NSCLC-Zellen zu ergründen.

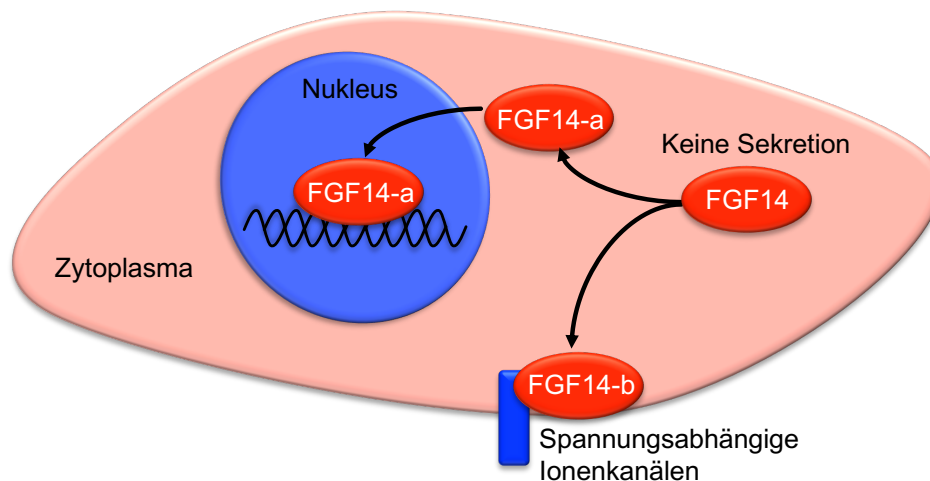


Abbildung 5 Mögliche Funktionen des FGF14-Proteins. Von FGF14 wird angenommen, dass es als intrazelluläres Signalmolekül fungiert und nicht sezerniert wird. Es existieren zwei Isoformen. FGF14-a reicht sich im Zellkern an und könnte in der Lage sein, DNA zu binden. FGF14-b ist im Zytoplasma lokalisiert und interagiert mit spannungsabhängigen Ionenkanälen. Eigene Darstellung der Informationen aus ⁸⁵, ²⁹ und ⁴⁷.

1.7 Zielsetzung und Fragestellungen dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von Patientenproben, der Durchführung verschiedener *In-vitro*-Experimente und einer mRNA-Sequenzierung zu untersuchen, ob eine Veränderung der *FGF14*-Expression das Zellwachstum und die Migrationsfähigkeit von NSCLC-Zellen beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde die folgende Hypothese untersucht:

Eine Dysregulation der *FGF14*-Expression beeinflusst das Proliferationsverhalten und das Migrationsverhalten von NSCLC-Zellen.

Das Vorgehen bei der Untersuchung der Hypothese ließ sich in vier Abschnitte untergliedern. In dem ersten Versuchsteil wurde ermittelt, ob die *FGF14*-Expression bei NSCLCs verändert ist. Dazu wurden die Datensätze des The Cancer Genome Atlas (TCGA) TCGA-LUNG, TCGA-LUSC und TCGA-LUAD mit Hilfe des Xena-Browsers der University of California, Santa Cruz (UCSC) sowie humane Tumorproben und NSCLC-

Zelllinien unter Verwendung der Quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) hinsichtlich der *FGF14*-Expression analysiert. Die zwei daran anschließenden Versuchsteile untersuchten den Einfluss sowohl einer plasmidinduzierten Erhöhung als auch einer durch eine small interfering RNA (siRNA) vermittelten Reduktion der *FGF14*-Expression auf die Proliferations- und Migrationseigenschaften verschiedener NSCLC-Zelllinien. Um dabei eine valide Aussage über die Tumorzelleigenschaften zu erhalten, wurde das Zellwachstum und -überleben mit Hilfe eines Bromdesoxyuridin-Assay (BrdU-Assay) und eines Kolonienbildungs-Assay und die Zellmigration anhand eines Transwell-Assay und eines Wundheilungs-Assay ermittelt. Da FGF14 teils im Nukleus lokalisiert ist und in der Literatur Hinweise existieren, dass FGF14 an die DNA binden könnte, wurde in einem vierten Schritt untersucht, ob die *FGF14*-Expression selbst einen Einfluss auf das Tumorzelltranskriptom ausübt^{47,85}. Zu diesem Zweck wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Geräte

Tabelle 1 Geräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Real-Time PCR System	StepOnePlus™	Applied Biosystems
PCR-Plattenzentrifuge	Mini Plate Spinner Centrifuge	Axygen®
Zellzähler	TC20™	Bio-Rad Laboratories
Spannungsquelle	PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories
Elektrophoresekammer (Protein)	Mini-PROTEAN® Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories
Nassblotzelle	Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories
Thermocycler	T300	Biometra
Elektrophoresekammer (DNA)	EasyPhor Mini	Biozym
Spannungsquelle	nanoPAC-300P	Cleaver Scientific
Zentrifuge (Labor)	Centrifuge 5417R	Eppendorf AG
Pipetten	Research® plus (1000 µl, 100µl, 10µl)	Eppendorf AG
Multipipette	Multipette® Xstream	Eppendorf AG
Zentrifuge (Zellkultur)	Centrifuge 5424	Eppendorf AG
Detektionskammer	ImageQuant™ LAS 4000	GE Healthcare
Nano Zoomer	NanoZoomer 2.0-HT	Hamamatsu Photonics
Tischzentrifuge	Sprout® Mini Centrifuge	Heathrow Scientific
Rührer	MR 3001 K	Heidolph Instruments
Schüttelplatte	Polymax 1040	Heidolph Instruments
Zentrifuge (Zellkultur)	ROTINA 420 R	Hettich
Schüttelplatte	Schüttelgerät SG20	IDL
Vortex-Mischer	Lab Dancer	IKA™
UV-Kammer	INTAS GEL IX IMAGER	Intas Science Imaging
Absaugsystem	Vacusaft™	Integra Biosciences™
Präzisionswaage	Präzisionswaage 572	KERN & Sohn
Blockthermostat	BT100	Kleinfeld Labortechnik
Mikroskop	DMI 3000 B	Leica Camera AG
Floureszenzmikroskop	DMI 6000 B	Leica Camera AG
Mikroskop	Labovort FS	Leitz
Kühlschrank (-20 °C)	GSL 3201	Robert Bosch
Mikrowelle	R-93ST-AA	Sharp
Mikroplaterereader	Infinite® M200 PRO	Tecan
Kühlschrank (-80 °C)	HERAfreeze™	Thermo Scientific™
Sterile Werkbank	Safe 2020	Thermo Scientific™
Inkubator (Zellkultur)	HERAcell™ 240i	Thermo Scientific™
Spektralphotometer	NanoDrop™ 2000	Thermo Scientific™

2.1.2 Software

Tabelle 2 Software

Programm	Version	Entwickler
Image Quant LAS 4000	Version 1.3 Build 1.3.0.134	GE Healthcare
GraphPad Prism	Version 9.0	GraphPad Software
Digital Pathology	NDP.view 2.5.19	Hamamatsu
Leica Application Suite	Version 3.5.0	Leica Microsystems
StepOne Software	Version 2.3	Life Technologies
i-control	Version 3.3.10.0	Tecan
Magellan	Version 7.2	Tecan
NanoDrop2000	/	Thermo Fisher
Image J	ImageJ 1.53b	Wayne Rasband, NIH
GSEA	Version 4.2.3	BROAD Institute und UCSD
Cytoscape	Version 3.9.1	The Cytoscape Consortium

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Beschreibung	Hersteller
PVDF-Membranen	Immun-Blot® 0,2 µm	Bio-Rad Laboratories
Glassplatten	Mini-PROTEAN® Shortplates	Bio-Rad Laboratories
Spacer-Platten	Mini-PROTEAN® Spacerplates 1,5mm	Bio-Rad Laboratories
15-Well-Kamm	Mini-PROTEAN® 15-Well-Comb	Bio-Rad Laboratories
Pipettenspitzen	SurPhob SafeSeal®	Biozym Scientific
PCR-Reagiergefäße	PCR TW 8-Tube Strip	Biozym Scientific
Tücher	ROTIZELL® Tissue-Tücher	Carl Roth
Multipipettenspitzen	Combitips® advanced	Eppendorf AG
Companion Plate	24-Well Companion Plate	Falcon®
Transwell-Einsätze	24-Well, Porengröße 8,0 µm	Falcon®
Filterpapier	Whatman® 3MM CHR	GE Healthcare
6-Well-Platte	CELLSTAR®	Greiner
24-Well-Platte	CELLSTAR®	Greiner
Wattestächen	Raucutpff®	Lohmann und Rauscher
Objektträger	76 x 26mm HistoBond®+S	P. Marienfeldt
Deckgläser	24 x 55mm 0,13- 0,16	R. Langenbrick
96-Well-Platte	96-Well Microtest Plate	Sarstedt
T-75-Faschen	TC Flasche T 75 Stand. Vent. Cap.	Sarstedt
Serologische Pipetten	5 ml, 10ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt
Chamber Slide	8-Well auf Glas ablösbar	Sarstedt
Zellschaber	25 cm, 2-Positionblade	Sarstedt
Reagiergefäße	SafeSeal 1,5ml	Sarstedt
Pipettenspitzen	10 µl, 100µl, 1000µl	Sarstedt
PCR-Platten	96 PCR Platte Halbbrand	Sarstedt
PCR-Folien	Ahäsive qPCR-Folie	Sarstedt
Skalpell	Feather® Disposable Scapels No. 11	Socorex ISBA

2.1.4 Reagenzien

Tabelle 4 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
WesternBright® Sirius® Chemilumineszens HRP Substrate	Advansta
TRIzol® Reagent	Ambion
Nukleasefreies H ₂ O	Ambion
Quick Start™ BSA	Bio-Rad Laboratories
Stacking Gel Buffer TRIS 6,8	Bio-Rad Laboratories
Resolving Gel Buffer TRIS 8,8	Bio-Rad Laboratories
Methanol ROTHISOLV®	Carl Roth
Acrylamid Rotiphorese®	Carl Roth
SDS (20%) Roti®-Stock	Carl Roth
TEMED	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth
TRIS PUFFERAN®	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth
Ethanol (96%)	Carl Roth
Ethanol (70%)	Carl Roth
Xylol	Carl Roth
ROTI®Fair 0,5 M EDTA	Carl Roth
Salzsäure	Carl Roth
Ethidium-Bromid 1%	Carl Roth
Essigsäure 100%	Carl Roth
Agarose NEEO Ultra-Qualität (Roti®garose)	Carl Roth
ImmunoSelect® DAPI Mounting Medium	Dianova
DPBS 1x	Gibco®
PERTEX®	Meditate
Ethanol (100%) EMSURE®	Merck
CutSmart® Buffer	New England BioLabs®
BamHI-HF®	New England BioLabs®
XhoI	New England BioLabs®
RIPA Lysis Buffer	Santa Cruz Biotechnology
Sodium Orthovanadate	Santa Cruz Biotechnology
Proteinase Inhibitor	Santa Cruz Biotechnology
PMSF	Santa Cruz Biotechnology
Chloroform	Sigma Aldrich
BSA	Sigma Aldrich
Panceau S	Sigma Aldrich
TWEEN® 20	SIGMA Aldrich
Bromphenol	Sigma Aldrich
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
TRITON™ X 100	Sigma Aldrich

Hämatoxylin	Sigma Aldrich
DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Scientific™
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific™
FastRuler™ High Range DNA Ladder	Thermo Scientific™
PowerUP™ SYBR™ Green Master Mix	Thermo Scientific™
Proteinase K	Thermo Scientific™
Citrat-Puffer 20x	Zymed Laboratories

2.1.5 Zellkultur

Tabelle 5 Zellkultur

Zellmedium/-zusatz	Beschreibung	Hersteller
DharmaFECT™ 1		Dharmacon™
5X siRNA Puffer		Dharmacon™
RPMI Medium 1642	L-Glutamine, 2,383 g/l HEPES, 4,5 g/l D-Glucose, 1,5 g/l Sodium Bicarbonate, 110 mg/l Sodium Pyruvate	Gibco®
DMEM/F12	L-Glutamine, 15mM HEPES	Gibco®
FCS		Gibco®
Trypsin-EDTA	0,05%, phenolrot	Gibco®
G418 Sulfate	50mg/ml	Gibco®
Penicillin-Streptomycin	10.000 U/ml	Gibco®
Opti-MEM™		Gibco®
FuGENE® HD		Promega

2.1.6 Kits

Tabelle 6 Kits

Anwendung	Bezeichnung	Hersteller
BCA	DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories
RNA-Isolation	miRNeasy® Mini Kit	Qiagen
BrdU-Assay	Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche
Reverse Transkription	High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Scientific™
Polymerfärbung	ZytoChem Plus AP Polymer Kit	Zytomed
Polymerfärbung	AP Red Kit	Zytomed

2.1.7 Puffer

Tabelle 7 TBST 20x

Substanz	Menge
TRIS	96,8 g
NaCL	320 g
dH ₂ O	Auf 2 l auffüllen und auf 7,6 pH einstellen

Tabelle 8 TBST 1x

Substanz	Menge
20x TBST	250 ml
TWEEN 20	5 ml
dH ₂ O	Auf 5 l auffüllen

Tabelle 9 Ladepuffer

Substanz	Menge
20% SDS	3 ml
Stacking Gel Buffer TRIS 6,8	3,75 ml
Bromphenol	9 mg
β-Mercaptoethanol	2,4 ml
Glycerin	4,5 ml
dH ₂ O	Auf 15 ml auffüllen

Tabelle 10 Laufpuffer

Substanz	Menge
Tris Base	15 g
Glycin	72 g
SDS 20%	25 ml
dH ₂ O	Auf 5 l auffüllen

Tabelle 11 Blottingpuffer

Substanz	Menge
TRIS	30 g
Glycin	15 g
Methanol	1000 ml
dH ₂ O	Auf 5 l auffüllen

2.2 In-Silico-Methoden

2.2.1 TCGA-Kohorten

Die in dieser Arbeit dargestellten Patientendaten (Gesamtüberleben und mRNA-Expression) basieren auf Daten der TCGA-LUNG-, -LUSC- und -LUAD-Kohorte, welche von dem TCGA-Forschungs-Netzwerk (<https://www.cancer.gov/tcga>) erhoben wurden^{5,35,70,71}. Zur Exploration der TCGA-Kohorten wurde der UCSC-Xena-Browser verwendet¹³. Die Genexpressionsdaten der TCGA-Kohorten entstammen dem „gene expression RNAseq IlluminaHiSeq“-Datensatz und wurden mit Hilfe der „HiSeq 2000 RNA“-Sequenzierungsplattform des TCGA-Genome-Characterization-Center der University-of-North-Carolina-at-Chapel-Hill generiert. Die mRNA-Expression wird in $\log_2(x+1)$ angegeben. X steht dabei für durch RNA-Seq by Expectation Maximization (RSEM) normalisierte Werte (norm_count)³¹.

2.2.2 Analyse der mRNA-Expression der TCGA-Kohorten

Bei den Daten der TCGA-Kohorten wurde die genomische Variable „*FGF14*“ mit der phänotypischen Variable „sample_type“ verglichen. Null-Werte wurden entfernt. Die Proben wurden nach ihrer Probennummer sortiert. Primärtumor- und Nichttumorproben, die nicht paarweise von demselben Patienten vorlagen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Die verbleibenden Daten gingen in die Auswertung ein (n=57).

2.2.3 Analyse des Gesamtüberlebens der TCGA-Kohorten

Bei den Daten der TCGA-Studien wurde die genomische Variable „*FGF14*“ mit den phänotypischen Variablen „sample_type“, „OS“ und „OS.time“ verglichen. Null-Werte wurden entfernt. Um lediglich Primärtumore in die Auswertung miteinzubeziehen, wurde nach „primary“ gefiltert. Primärtumorproben mit einer OS.time von 0 wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Anhand der medianen mRNA-Expression wurden die verbleibenden Daten (n=501) in 2 Gruppen eingeteilt, wobei der Median selbst in die Gruppe mit den höheren mRNA-Expressionswerten miteinbezogen wurde. Wenn zwei oder mehr Proben denselben Expressionswert hatten, wurden sie in dieselbe Gruppe sortiert, auch wenn die beiden Gruppen danach nicht mehr genau gleich groß waren.

2.2.4 Gene set over-representation analysis

Die „Gene set over-representation analysis“ (ORA) ist eine statistische Methode, mit welcher errechnet werden kann, ob Gene bestimmter, vordefinierter Gen-Listen oder Signalwege in einer Liste von Genen häufiger vertreten sind, als per Zufall zu erwarten wäre. Zur ORA wurde der Analysealgorithmus der gProfiler-Plattform von der Website <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost> (Aufrufdatum: 02.08.2022) verwendet⁵³. Als Datenbank diente die Reactom-Datenbank (Reactom Version 80, 05.04.2022)²³. Die signifikant regulierten Gene der RNA-Sequenzierung wurden gemäß ihres Regulationszustandes in zwei Gruppen aufgeteilt und nach dem $\log_2\text{FoldChange}(\text{FGF14oe/LV})$ ($\log_2(\text{FC})$) auf- (herunterreguliert) bzw. absteigend (hochreguliert) sortiert. Mit jeder der beiden Gruppen wurde eine separate Analyse durchgeführt. Dazu wurden die einer Gruppe zugehörigen, sortierten Gene mit ihrem Gen-Symbol in den Algorithmus eingespeist. Die Analyse wurde als „ordered query“ durchgeführt. Zur Statistik diente der exakte Test nach Fischer. Zur Beherrschung des Problems des multiplen Testens wurde zusätzlich die Benjamini-Hochberg-Prozedur angewendet²². Die Rohdaten wurden aufsteigend nach dem adjustierten P-Wert (padj) sortiert. Den Empfehlungen von Reimand et al. folgend wurden Signalwege, die weniger als 15 und mehr als 350 Gene enthielten, von der Analyse ausgeschlossen⁵⁵. Signalwege mit einem padj < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

2.2.5 ORA-Visualisierung mit Cytoscape

Zur Visualisierung der ORA diente die Cytoscape-Software (v3.9.1) mit den Applikationen EnrichmentMap (v3.3.4) und Autoannotate (v1.3.5)^{27,40,62}. Die Ergebnisse der ORA, eine Liste aller signifikant regulierten Gene und die durchsuchte Datenbank wurden als Textdatei in die EnrichmentMap-App geladen. Bei beibehaltenen Standardeinstellungen errechnete EnrichmentMap ein Netzwerk aus allen signifikant überrepräsentierten Signalwegen (padj > 0,05). Die Knoten stellen Signalwege dar. Eine Verbindungslinie zwischen zwei Knoten weist auf Gene hin, welche beiden Signalwegen zugeordnet werden.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkultivierung

Alle Arbeiten mit viablen Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellen wurden käuflich bei ATCC® erworben. Während A549-Zellen mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium kultiviert wurden, bekamen die H460- und H838-Zellen Roswell Park Memorial Institute-1640 Medium. 500 ml beider Medien wurden 50 ml Fetal Calf Serum (FCS) (10%) und 5 ml Penicillin-Streptomycin (1%) zugesetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂ in einem Inkubator.

2.3.2 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen wurden der noch gefrorenen Zellsuspension 1000 µl warmes Zellmedium beigelegt. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in ein 50-ml-Falcon überführt und 8 Minuten bei Raumtemperatur und 1600 RPM zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 1000 µl Zellmedium gelöst und die Zellsuspension zusammen mit 10 ml frischem Medium in eine T-75-Flasche überführt.

2.3.3 Ablösen, Zählen und Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden passagiert, sobald sie eine Konfluenz von > 80% erreichten. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 3 ml Phosphatgepufferten Salzlösung (DPBS 1x) gewaschen. Anschließend wurden 3 ml 0,05% Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben. Zum Ablösen inkubierten die Zellen ca. 10 min bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank. Nachdem unter dem Mikroskop überprüft worden war, ob sich alle Zellen abgelöst hatten, wurden 7 ml Zellmedium zu den Zellen gegeben, um die Trypsinreaktion zu terminieren. Um die Zellen zu zählen, wurden 10 µl der Zellsuspension in einen Zellzählobjektträger pipettiert und dieser in den automatischen Zellzähler TC-20 eingeführt. Zur Passage der Zellen wurden 10 ml frisches Zellmedium und ca. eine Million Zellen aus der Zellsuspension in eine neue T-75-Flasche gegeben.

2.3.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen abgelöst und 8 Minuten bei 1600 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1000 µl eines Einfriermediums

bestehend aus 90% FCS und 10% Dimethylsulfoxid gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Gefriergefäß überführt und bei -80 °C eingefroren.

2.3.5 Plasmid-Transfektion

Für die Überexpression des *FGF14*-Gens wurde Plasmid-DNA in die Zellen eingebracht (Plasmid-Transfektion). A549 und H838-Zellen wurden für die Transfektion zu je 5000 Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die ausgesäten Zellen inkubierten 24 bis 48 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂.

Tabelle 12 Transfektion mit FugeneHD

Substanz	Menge
Plasmid DNA	1 µg
Fugene® HD	6 µl
Opti-MEM™	193 µl

Zur Transfektion wurden Opti-MEM™ und Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß gegeben. Beide Substanzen wurden durch vorsichtiges Pipettieren vermischt. Der Ansatz inkubierte 5 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde FuGENE® HD direkt in die Lösung pipettiert und der Inhalt des Reaktionsgefäßes durch Pipettieren erneut vermischt. Je 50 µl der Lösung wurden pro Well tropfenweise zu den Medien der Zellen gegeben. Nach 24 h wurde das Medium durch 100 µl des entsprechenden kompletten Zellmediums ersetzt. Um von nun an nach den erfolgreich transfizierten Zellen zu selektieren, wurde dem Zellmedium dieser Zellen stets 500 µg/ml G418 (Genitacin) beigelegt.

Tabelle 13 Verwendete Plasmide von ORIGENE

Plasmid	Katalognummer	Gen
FGF14 (NM_004115) Human Tagged ORF Clone	RC219002	<i>FGF14</i>
pCMV6-Entry Mammalian Expression Vector	PS100001	-

2.3.6 siRNA-Transfektion

Um das *FGF14*-Gen posttranskriptionell stillzulegen, wurde eine FGF14-siRNA in die Zellen eingebracht (siRNA-Transfektion). Für die siRNA-Transfektion wurden die Zellen zu je 100.000 Zellen/Well in eine 6-Well-Platte ausgesät und 24 bis 48 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ bis zu einer Konfluenz von ca. 80% inkubiert. Die nach Angaben des

Herstellers erzeugte 20 µM Stocklösung der siRNA wurde mit 1x siRNA-Puffer auf eine Konzentration von 5 µM verdünnt. In separaten Reaktionsgefäßen wurden sowohl für die Kontroll-siRNA als auch für die FGF14-siRNA die folgenden Ansätze hergestellt, die Komponenten durch Pipettieren vermischt und je 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert:

Tabelle 14 siRNA-Transfektion für 6-Well

Substanz (1)	Volumen (1)	Substanz (2)	Volumen (2)
siRNA	10 µL	DharmaFECT	4 µl
Opti-MEM™	190 µL	Opti-MEM™	194 µl

Anschließend wurden die Inhalte von Gefäß 1 und Gefäß 2 in einem neuen Reaktionsgefäß vereinigt. Der Ansatz inkubierte 20 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Ansatz auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Zellmedium ersetzt. Bevor mit den behandelten Zellen Versuche durchgeführt wurden, inkubierten sie 48 Stunden (mRNA-Analyse) bzw. 72 Stunden (Proteinanalyse) im Brutschrank.

Tabelle 15 siRNAs

siRNA	Hersteller
SMARTPOOL Human FGF14 siRNA 5nM	Horizon Discovery
Control Pool NONTARGETING CONTROL POOL 5nM	Horizon Discovery

2.3.7 BrdU-Assay

Die Proliferationsfähigkeit der Zellen wurde mit Hilfe des Thymidin-Analogons BrdU immunchemisch nachgewiesen und quantifiziert. Hierfür wurden 5000 Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht mit 0% FCS enthaltenem Zellmedium (W/O) ausgehungert. Am nächsten Tag wurde das W/O-Medium entfernt, durch antibiotikafreies Zellmedium (Medium + 10% FCS) ersetzt und das „Cell Proliferation ELISA-BrdU“ nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. 10 µl der im Verhältnis 1:100 in W/O-Medium verdünnten „BrdU-labeling-solution“ wurden zu jedem Well gegeben. Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit je 200 µl „FixDenat“ 30 Minuten fixiert. Folgend wurde die „Anti-BrdU-POD-working-solution“ nach Angaben des Herstellers hergestellt und je 100 µl dieser zu den Zellen gegeben. Unter Lichtausschluss inkubierten die Ansätze 90 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Wells dreimal mit der

Waschlösung behandelt. Zum Detektieren der Immunkomplexe wurden 100 µl der Substratlösung zu jedem Well pipettiert. Setzte der Farbumschlag ein, wurde die Absorption im Microplate-Reader bei 370 nm (Referenz 492 nm) viermal im Fünfminutentakt gemessen. Zur Auswertung wurde das arithmetische Mittel (MW) der Kontrollgruppe gebildet und alle Werte zu diesem ins Verhältnis gesetzt:

$$BrdU \text{ Inkorporation (\% von LV)} = Absorption(Well) * \frac{100}{MW_{Absorption(LV)}}$$

2.3.8 Kolonienbildungs-Assay

Das Zellüberleben wurde mit Hilfe des Kolonienbildungs-Assay untersucht. Ungefähr 300 Zellen/Well wurden in Triplikaten in eine 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellen inkubierten 7 Tage bei 37 °C und 5% CO₂. Nach Ablauf der 7 Tage wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit einer 10% Kristallviolett-Lösung angefärbt. Waren die 6-Well-Platten getrocknet, wurde jede Rückseite mit einer Kamera fotografiert und die angefärbten Zellkolonien mit der Zellzähler-Funktion von ImageJ gezählt.

2.3.9 Transwell-Assay

Die Kapazität der Zellen entlang eines chemischen Gradienten durch eine permeable Membran zu migrieren, wurde mit Hilfe des Transwell-Assay untersucht. Für das Transwell-Assay wurden je 50.000 Zellen in W/O-Medium in eine Transwell-Kammer ausgesät. 700 µl antibiotikafreies Zellmedium mit 10% FCS wurden neben die Transwellkammer in jedes Well pipettiert. Im Anschluss inkubierten die Zellen bei 37 °C 6 Stunden (A549), 16 Stunden (H838) oder 24 Stunden (H460) im Brutschrank. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Innenseiten der Transwellkammern gründlich mit Wattestäbchen von Zellen gesäubert. Die auf den Außenseiten der Membran der Transwellkammern verbliebenden Zellen wurden für 3 Minuten mit je 700µl Methanol fixiert und im Anschluss 10 Minuten lang mit einer 10% Kristallviolettlösung gefärbt. Danach wurden die Membranen mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Pertex auf einem Objektträger eingedeckt. Die Objektträger wurden mit Hilfe des Nanozoomers eingescannt. Zur Auswertung wurden die angefärbten Zellen mit dem ImageJ-Plugin ITCN gezählt und die Zellzahlen zu dem arithmetischen Mittel der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt:

$$\text{Migrierte Zellen (\% von LV)} = \text{Zellzahl} * \frac{100}{\text{MW}(\text{Zellzahl}_{LV})}$$

2.3.10 Wundheilungs-Assay

Die Migrationskapazität eines Zellverbandes wurde mit Hilfe des Wundheilungs-Assay untersucht. Auf der Rückseite einer 24-Well-Platte wurden mit einem Filzstift gleichmäßige Markierungen angebracht. Jeweils 100.000 Zellen wurden in die Wells der Platte gegeben. Die Zellen inkubierten bei 37 °C und 5% CO₂ bis zu einer Konfluenz von >90%. Anschließend wurde der Zellrasen mit einer weißen Pipettenspitze gleichmäßig so abgeschabt, dass eine zellfreie Furche auf dem Zellrasen (Scratch) entstand. Zu den Zellen wurde antibiotikafreies Medium mit 1% FCS gegeben. Unter dem Mikroskop wurde jeder Scratch in fünffacher Vergrößerung (Brightfield) fotografiert. Die Zellen inkubierten bei 37 °C und 5% CO₂ 18 h. Danach wurden von denselben Stellen erneut Fotografien angefertigt. Die Auswertung erfolgte mit der Flächenberechnungsfunktion von ImageJ. Der prozentual geschlossene Anteil der Scratch-Fläche berechnete sich wie folgt:

$$\% \text{ Scratch geschlossen} = 100\% - \text{Fläche}(18h) * \frac{100}{\text{Fläche}(0h)}$$

2.4 Humanes Probenmaterial

Das Studienprotokoll für die Gewebespende wurde von der Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität-Gießen im Einklang mit dem Gesetz und der „Good Clinical Practice/International Conference on Harmonisation“-Richtlinie genehmigt. Jeder Patient bzw. der entsprechende Vorsorgebevollmächtigte gab seine informierte Einwilligung. Der Antrag ist unter dem Aktenzeichen AZ 58/15 von der Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin unter dem Vorsitz von Prof. Dr. H. Tillmanns registriert und am 20.11.2019 genehmigt worden.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA humaner Lungengewebsproben

Die RNA humaner Lungengewebsproben wurden von der Lungenbiobank Heidelberg (Biomaterialbank Heidelberg, Thoraxklinik der Universität Heidelberg, Leiter Dr. T. Muley) und der Biobank des Deutschen Zentrums für Lungenforschung (DZL) zur Verfügung gestellt.

2.5.2 RNA-Isolationen nach der Single-Step Methode

Bei der Single-Step-Methode nach Chomczynski und Sacchi werden die Zellen zur RNA-Gewinnung mittels Trizol lysiert. Das im Trizol enthaltene Guanidiniumthiocyanat dient der Inhibition von RNAsen. Die zu isolierenden Zellen wurden in 700 µl Trizol gelöst. Die Zellen inkubierten 3 Minuten bei Raumtemperatur. Um Kontamination mit DNA zu vermeiden, wurden die Proben 30 Minuten bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Danach wurden 140 µl Chloroform zu jeder Probe hinzugefügt und der Inhalt durch Invertieren gut vermischt. Die Proben inkubierten 10 Minuten bei Raumtemperatur. Erneut wurde 15 Minuten bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert, so dass sich bei jeder Probe drei Phasen bildeten. Die obere wässrige, RNA beinhaltene Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Ausfällung der RNA wurden der wässrigen Lösung 350 µl Isopropanol hinzugefügt und die Komponenten durch invertieren gemischt. Die Proben inkubierten 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nochmals wurde 10 Minuten bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen. Zweimal wurde das entstandene Pellet mit 1 ml einer 75% EthanolLösung gewaschen und 5 Minuten bei 7500 g und 4 °C zentrifugiert. Überstände wurden mit einer Pipette entfernt. Dann trocknete das RNA-Pellet bei geöffnetem Reaktionsgefäß unter einem Abzug, bis es durchsichtig wurde. Abhängig von der erwarteten RNA-Konzentration wurde das RNA-Pellet in 30 bis 50 µl nukleasefreiem H₂O gelöst. Die Konzentration der RNA wurde bei 260 nm mit dem Spektralphotometer (Nanodrop®) bestimmt. Danach wurde die RNA bei -80 °C eingefroren oder weiterverarbeitet.

2.5.3 Säulenbasierte RNA-Isolation

Bei der säulenbasierten RNA-Isolation wird die RNA nach der trizolvermittelten Zelllyse durch RNA-spezifische Säulen gebunden und nach verschiedenen Waschschritten ausgelöst. Hierfür wurde das miRNeasy® Mini Kit verwendet. 700 µl „QIAzol-Lyse-

Reagenz“ wurden zu jeder Probe gegeben. Die Suspension inkubierte 5 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden jedem Ansatz 140 µl Chloroform hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten wurden die Proben 15 Minuten bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase einer jeden Probe wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 525 µl Ethanol (99%) versetzt. Anschließend wurden die Lösungen vorsichtig auf die Isolationssäulen gegeben und bei 8000 g und Raumtemperatur 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nachdem mehrere Waschritte mit den dem Kit beiliegenden Waschpuffern erfolgt waren, wurden die Isolationssäulen in neue Reaktionsgefäße umgesetzt. 50 µl nukleasefreies Wasser wurden auf die Membran jeder Isolationssäule pipettiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße mit den Isolationssäulen eine Minute bei 8000 g zentrifugiert. Die RNA-Konzentration der Durchflüsse, die in den Reaktionsgefäßen verblieben waren, wurde mit dem Spektralphotometer bestimmt und die Proben anschließend bei -80 °C eingefroren oder weiterverarbeitet.

2.5.4 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription dient der Synthese von DNA ausgehen von der zuvor isolierten RNA. Zur Vorbereitung der Reversen Transkription wurde das für 1 µg RNA benötigte Volumen mit nukleasefreiem Wasser auf 10 µl in einem PCR-Reaktionsgefäß aufgefüllt. Es wurden pro Reaktion folgende Komponenten des „High Capacity cDNA Reverse“-Kits zu einem Mastermix zusammengegeben:

Tabelle 16 Mastermix Reverse Transkription

Komponenten	V Mit Rnase-Inhibitor	V Ohne Rnase-Inhibitor
10X RT Buffer	2 ml	2,0 ml
25X dNPT Mix	0,8 ml	0,8 ml
10X RT Random Primers	2 ml	2 ml
Multi Scribe Rev. Transkr.	1 ml	1 ml
Nukleasefreies Wasser	3,2 ml	4,2 ml

10 µl des Mastermixes wurden in jedes Reaktionsgefäß pipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden kurz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. In dem Thermocycler T300 wurden folgende Einstellungen vorgenommen und das Programm gestartet:

Tabelle 17 Thermocycler-Programm Reverse Transkription

Programm	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4°C
Zeit	10 min	120 min	5 min	Hold

2.5.5 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

Die qPCR ermöglicht eine fluoreszenzvermittelte Quantifizierung der vervielfältigten DNA-Fragmente. Der Cycle Threshold-Wert (CT) gibt dabei den Elongationszyklus an, bei welchem die Fluoreszenz der DNA-Fragmente erstmalig die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Die mit Hilfe der Reversen Transkription hergestellte komplementäre DNA (cDNA) wurde aufgetaut und im Verhältnis 1:20 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Für jedes untersuchte Gen wurden probenweise Triplikate pipettiert. Als Housekeeping-Gen wurde *18S-rRNA* verwendet. Aus dem PowerUP™ SYBR™ GREEN-Mastermix und den Primerpaaren jedes untersuchten Gens wurde ein Mastermix hergestellt und dieser gut durchmischt.

Tabelle 18 Mastermix qPCR

Substanz	Volumen/Well
PowerUP™ SYBR™ GREEN	5 µl
Vorwärts-Primer	0,5 µl
Rückwärts-Primer	0,5 µl

6 µl des Mastermix wurden auf den Grund eines jeden Wells einer 96-Well-PCR-Platte pipettiert. Anschließend wurden jeweils 4 µl der 1:20-cDNA-Verdünnung an die Wand eines jeden Wells pipettiert. Die 96-Well-PCR-Platte wurde mit einer PCR-Folie versehen. Die Platte wurde kurz zentrifugiert und in das STEPONEPLUS-Real-Time PCR-System eingesetzt. Die qPCR wurde mit der Software STEP-ONE-PLUS gestartet. Zur Auswertung wurde der ΔCT -Wert aus den arithmetischen Mitteln der CT-Werte des Haushältergens und des Gens des Interesses (GOI) berechnet:

$$\Delta CT = MW_{CT}(18S) - MW_{CT}(GOI)$$

Tabelle 19 qPCR Primersequenzen

Gen		Primersequenz 5' - 3'	Acession Number
MUC16	Vorwärts	CCAGTCCTACATCTTCGGTTGT	NM_024690.2
	Rückwärts	AGGGTAGTTCCTAGAGGGAGTT	
COL11A1	Vorwärts	ACCCTCGCATTGACCTTCC	NM_001190709.1

	Rückwärts	TTTGTGCAAAATCCCGTTGTTT	
ADARB1	Vorwärts	GTGAAGGAAAACCGCAATCTGG	NR_027672.2
	Rückwärts	CAGGAGTGTGTACTGCAAACC	
CCBE1	Vorwärts	CGACTAAATACCCGTGTCTGAAG	NM_133459.4
	Rückwärts	TCGGCACAAACGTCGTAATCT	
FGF14	Vorwärts	GGAAGGGCAAGCTATGAAAGG	NM_001321931.1
	Rückwärts	TGGTTCTCGGTACATGGCAAC	
18S-rRNA	Vorwärts	CCAAGATCCAACCTACGAGCTT	X03205.1
	Rückwärts	GGCCCTGTAATTGGAATGAGTC	

2.5.6 RNA-Sequenzierung

Bei der RNA-Sequenzierung wird die Basenabfolge der in cDNA übersetzten RNA (Reads) mittels "Next Generation Sequencing" bestimmt. Die gewonnenen Daten geben nach bioinformatischer Aufbereitung Aufschluss über die Genexpression. Zur Sequenzierung der RNA wurde mit Hilfe des miRNeasy-Kits die RNA von A549-FGF14oe- und A549-LV-Zellen (n=4) isoliert. Die RNA-Sequenzierung wurde von der Servicegruppe „Deep Sequencing Platform“ des Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung unter der Leitung von Dr. Stefan Günther durchgeführt. Dort wurde zuerst die Qualität der RNA mit Hilfe eines BioAnalyzer 2100 (Agilent) oder eines LabChip GX Touch 24 (Perkin Elmer) überprüft. Anschließend wurde die RNA mit dem TruSeq Stranded mRNA-Kit (Illumina) in cDNA übersetzt und für die Sequenzierung vorbereitet (Library Preparation). Die RNA-Sequenzierung selbst wurde mit 4 µg cDNA, einem NextSeq500-Instrument und dem v2 chemistry-Kit mit 1-x75-bp single-end Setup durchgeführt. Die Expressionsunterschiede zwischen den A549-FGF14oe- und A549-LV-Zellen wurden mit Hilfe der Software DESeq2 (Version 1.14.1) identifiziert und mit Daten der „Universal Protein Resource“ auf Grundlage der Gen-Identifikationsnummer angereichert. Expressionsunterschiede wurden als signifikant betrachtet, sofern folgende Parameter erfüllt waren: $basemean \geq 5$; $-0,585 \leq \log_2(FC) \leq 0,585$; $p_{adj} \leq 0,05$. Während der Basemean die absolute Expression in Form von Reads beschreibt, gibt der $\log_2(FC)$ die Divergenz in der Expression zwischen den beiden Versuchsgruppen an. Der $\log_2(FC)$ berechnete sich aus $\log_2 MW[A549_LV] - \log_2 MW[A549_FGF14oe]$. Der p_{adj} beschreibt einen für multiples Testen durch die Benjamini-Hochberg-Korrektur korrigierten p-Wert²². Dieser wurde auf 0,05 festgelegt. Die signifikanten Expressionsunterschiede wurden folgend nach dem p_{adj} sortiert. Für die signifikant regulierten Gene wurden z-Werte berechnet. Ein z-Wert beschreibt die Zahl der

Standardabweichungen, die der Expressionswert eines Gens über oder unter dem Mittelwert der Expressionswerte beider Versuchsgruppen liegt.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Isolation des Gesamtproteins

Zur Isolation des Gesamtproteins werden die membranären Komponenten der Zellen durch einen als Detergenz fungierenden, Proteinase-Inhibitoren enthaltenen Lysepuffer zersetzt. Die folgenden Reagenzien wurden zu einem Lysepuffer zusammengegeben:

Tabelle 20 Lysierpuffer zur Proteinisolation

Reagenzien	Volumen
Radioimmunoprecipitations-Assay-Puffer (RIPA)	1000 µl
Natriumorthovanadat	20 µl
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	20 µl
Proteinase-Inhibitor	40 µl

Das Zellmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden auf Eis mit gekühltem DPBS 1x gewaschen. Anschließend wurden die Zellen pro Probe in 70 µl des Lysepuffers gelöst. Nachdem alle Proben gesammelt worden waren, wurden diese 30 Minuten bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Eis in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt.

2.6.2 Bicinchoninsäure-Assay

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde ein Bicinchoninsäure–Assay (BCA) durchgeführt. Bei diesem Assay reagiert ein durch ein Protein reduziertes, einwertiges Kupfer-Molekül mit 2 BCA-Molekülen zu einem blau-violetten Farbstoff. Die Intensität des Farbumschlages gibt indirekt Aufschluss über die Proteinkonzentration. Zuerst wurden in einer Verdünnungsreihe Standards mit Hilfe einer 2 mg/ml Rinderalbumin-Lösung (BSA) hergestellt. Ein gründliches Vortexen nach jedem Verdünnungsschritt sollte eine zufriedenstellende Durchmischung sicherstellen.

Tabelle 21 BCA-Assay Standards

Konzentration (c)	V(BSA)	V(H ₂ O)
Standard 1 (2 mg/ml)	200 µl	-
Standard 2 (1 mg/ml)	100 µl Standard 1	100 µl
Standard 3 (0,5 mg/ml)	100 µl Standard 2	100 µl
Standard 4 (0,25 mg/ml)	100 µl Standard 3	100 µl

Als Leerwert diente eine 1:5-Verdünnung des Lysierpuffers in dH₂O. Abhängig vom erwarteten Proteingehalt wurden von den Proben 1:10- oder 1:5-Verdünnungen in dH₂O angesetzt. Außerdem wurde für das BCA eine Lösung A bestehend aus 1000 µl Reagenz A und 20 µl Reagenz S angefertigt. Eine Lösung B wurde kurz vor dem Beginn des BCAs in ein Falcon abgefüllt. Um das BCA durchzuführen, wurden 5 µl der Standards, des Leerwertes und anschließend der Verdünnungen in Duplikaten in eine 96-Well-Platte pipettiert. Danach wurden 25 µl der angesetzten Reagenz A zu jedem Well gegeben. Es folgten 200 µl Reagenz B pro Well. Die Ansätze inkubierten ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgte die Bestimmung der Proteinkonzentrationen mit Hilfe des Microplate-Readers (Tecan®) und der Magellan-Software. Aus den Konzentrationen der Duplikate wurde der Mittelwert gebildet und Proben für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) hergestellt.

2.6.3 Probenvorbereitung für die SDS-PAGE

Um die isolierten Proteine analysieren zu können, wurden diese mit Hilfe einer SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt. Bei der SDS-PAGE ist die Wanderungsgeschwindigkeit eines mit Natriumdodecylsulfat (SDS) behandelten Proteins in einem SDS-Polyacrylamid-Gel bei angelegter Spannung proportional zu seiner Größe. Für die SDS-PAGE wurden Proteinproben mit einer Proteinkonzentration von 1 µg/µl hergestellt. Das im Ladepuffer enthaltene SDS diente dem Aufspalten der Wasserstoffbrücken und der Überdeckung der Proteineigenladung. β-Mercaptoethanol diente dem Aufspalten der Disulfidbrücken.

Tabelle 22 Herstellung der SDS-PAGE-Proben

Volumen (V)	c(Protein)	V(Protein)	V(H ₂ O)	V(Ladepuffer)
200 µl	X	200/X	160 – (200/X)	40
100 µl	X	100/X	80 – (100/X)	20

Die Proben wurden 3 Minuten in einem Blockthermostat bei 95 °C gekocht und danach bei -20 °C gelagert.

2.6.4 Herstellen eines SDS-Polyacrylamid-Gels

Bei der Herstellung eines SDS-Polyacrylamid-Gels handelt es sich um eine radikalische Polymerisation. Während Acrylamid als Gelbildner fungiert, wirkt Ammoniumperoxysulfat (APS) als Radikalstarter und Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator. Zuerst wurden 1,5 mm Spacerscheiben und Deckplatten gründlich mit Alkohol gereinigt und mit einem Gussrahmen in einen Gussstand eingespannt. Jedes Gel bestand aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Zuerst wurden die für 40 ml eines 12%-SDS-Trenngels benötigten Substanzen zusammengegeben:

Tabelle 23 Komponenten eines 12%-SDS-Trenngels

Substanz	Volumen
dH ₂ O	13,2 ml
Acrylamid	16 ml
Resolving Gel Buffer TRIS 8,8	10 ml
10% SDS	400 µl
20% APS	400 µl
TEMED	16 µl

Nachdem das TEMED hinzugegeben worden war, wurden die Komponenten gut vermischt und schnell in den jeweils durch die beiden Glasscheiben gebildeten Zwischenraum pipettiert (ca. 8 ml pro Gel). Die Trenngele härteten für 30 bis 60 Minuten aus. Anschließend wurden 10 ml einer Sammelgel-Lösung angesetzt:

Tabelle 24 Komponenten eines Sammelgels

Substanz	Volumen
dH ₂ O	6,8 ml
Acrylamid	1,8 ml
Stacking Gel Buffer TRIS 6,8	1,25 ml
10% SDS	100 µl
20% APS	100 µl
TEMED	8 µl

2 ml der Lösung wurden auf jedes Trenngel pipettiert. In jeden Zwischenraum wurde ein passender 1,5 mm breiter Kamm mit 15 Kammern eingesetzt. Nach ca. 30 Minuten war das Sammelgel ausgehärtet. Die 12%-SDS-Polyacrylamid-Gele wurden mit Laufpuffer befeuchtet für ca. 2 Wochen im Kühlschrank gelagert.

2.6.5 SDS-PAGE

Ein 12%-SDS-Polyacrylamid-Gel wurde in eine SDS-PAGE-Kammer gespannt und diese anschließend mit Laufpuffer befüllt. Der Kamm des SDS-Polyacrylamid-Gels wurde entfernt und je 20 µg Protein in eine der durch den Kamm erzeugten Vertiefungen pipettiert. Zur Größenreferenz wurde die erste Vertiefung mit 6 µl eines Proteingrößenmarkers versehen. Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Spannung von 100 V gestartet. Nachdem die Proben von dem Sammelgel in das Trenngel gelangt waren, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese wurde gestoppt, sobald die Proben auf der Unterseite aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel austraten.

2.6.6 Westernblot

Die aufgetrennten Proteine wurden per Elektrotransfer von dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen (Western-Blot). Der Elektrotransfer erfolgte mittels eines Tank-Blot-Systems. Das SDS-Polyacrylamid-Gel wurde aus seiner Vorrichtung gelöst. Nachdem das Sammelgel vorsichtig abgetrennt worden war, inkubierte das SDS-Polyacrylamid-Gel zusammen mit Whatman®-Filterpapier und einer in Methanol aktivierten PVDF-Membran einige Minuten in Blottingpuffer. Folgend wurden nacheinander ein Blottingschwamm, vier Filterpapierzuschnitte, das SDS-Polyacrylamid-Gel, die PVDF-Membran, 4 Filterpapierzuschnitte und ein Blottingschwamm auf die schwarze Seite einer Blottingkassette gestapelt und diese geschlossen. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass sich zwischen dem SDS-Polyacrylamid-Gel und der PVDF-Membran keine Luftblasen bildeten. Die geschlossene Blottingkassette wurde in eine mit einer Kühleinheit, einem Magnetrührstäbchen und Blottingpuffer gefüllten Nassblotzelle eingesetzt. Für den Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde eine konstante Spannung von 100 V eingestellt. Nach 90 Minuten wurde der Transfer angehalten und die PVDF-Membran aus der Blottingkassette entfernt. Zur Visualisierung der

transferierten Proteine wurde die PVDF-Membran mit Ponceau-S-Färbelösung behandelt. Die reversible Färbung der Membranen wurde durch mehrmaliges Waschen mit TRIS-gepufferter Saline mit Tween (TBST) entfernt.

2.6.7 Immundetektion

Die Immundetektion erfolgt mittels einer immunkonjugierten Chemolumineszenzreaktion. Dabei werden (1) ein proteinspezifischer Primärantikörper, (2) ein reporterenzymgekoppelter, an die Fc-Region des Primärantikörpers bindender Sekundärantikörper und (3) ein Substrat auf die Membran gegeben. Um vor der Zugabe des Primärantikörpers freigebliebene Proteinbindungsstellen auf der PVDF-Membran zu blockieren, inkubierte diese eine Stunde in einer 5% Magermilch/TBST-Lösung. Anschließend wurde der Primärantikörper in 5 ml 5% Magermilch/TBST-Lösung verdünnt. Die Membran wurde in die Primärantikörperlösung gegeben und inkubierte in dieser über Nacht unter konstanter Bewegung bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal je 10 Minuten mit TBST gewaschen. Ein passender Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper (HRP) wurde ebenfalls in einer 5% Magermilch/TBST-Lösung verdünnt und auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten wurde die Membran erneut dreimal 10 Minuten mit TBST gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran in die Detektionskammer „ImageQuant“ gelegt und mit der Entwicklungslösung „Western Bright® Sirius®“ benetzt. Das Chemolumineszenzsignal wurde als Bild im 8bit-Format gesichert.

Tabelle 25 Antikörper Western-Blot

Epitop	Organismus	Verdünnung	Hersteller
<i>Primärantikörper</i>			
FGF14	Kaninchen	1:2500	Abcam
β-Actin	Maus	1:5000	Abcam
<i>Sekundärantikörper</i>			
Anti-Kaninchen-IgG-HRP	Kaninchen	1:3000	Promega
<i>Conjugate</i>			
Anti-Maus-IgG-HRP Conjugate	Maus	1:3000	Promega

2.6.8 Western-Blot Quantifizierung

Die Quantifizierung eines Western-Blot erfolgte mit ImageJ. Dafür wurden die grauskalierten 8bit-Bilder der detektierten Chemilumineszenz-Banden in ImageJ

geladen. Anschließend wurde mit Hilfe des Rechteck-Auswahlwerkzeugs ein Rechteck um die größte Bande gezeichnet. Durch das klicken der "1" wurde die Auswahl fixiert. Mit Hilfe der linken Maustaste wurde das Rechteck auf die nächste Bande kopiert und durch das Klicken der "2" fixiert. Nachdem die letzte Bande ausgewählt worden war, wurde durch Klicken der "3" eine Intensitätsmessung gestartet. Als Bandenintensität wurde die Fläche unter der Intensitätskurve definiert. Die Fläche wurde durch die Verwendung des Linien- und des Zauberstab-Werkzeugs bestimmt. Abschließend wurde die Intensität des zu untersuchenden Proteins (FGF14) und der Ladekontrolle (ACTB) einer Probe miteinander in Relation gesetzt und auf den Mittelwert der Proben der Kontrollgruppe normalisiert:

$$\text{Bandendichte FGF14/ACTB} = \frac{\text{Intensität(FGF14/ACTB)}}{\text{MW(Intensität}_{LV}(\text{FGF14/ACTB}))} * 100$$

2.7 Morphologische und histologische Methoden

2.7.1 Immunfluoreszenzzytochemie

Durch Bindung eines Primärantikörpers und eines fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpers werden bei der Immunfluoreszenzzytochemie (ICC) spezifische Proteine unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Für eine ICC wurden ~10.000 Zellen in jedes Well eines 8-Well-Kammer-Objektträger ausgesät. Die Zellen inkubierten bei 37 °C und 5% CO₂ solange, bis eine für die jeweilige Färbung ausreichende Konfluenz erreicht worden war. Anschließend wurden die Zellen mit DPBS 1x gewaschen und 15 Minuten mit einer 4% Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen 10 Minuten mit 300 µl 0,1% TRITON und 30 Minuten mit einer 0,5% BSA/DPBS-Lösung behandelt. Der Primärantikörper wurde mit der 0,5% BSA/DPBS-Lösung im gewünschten Verhältnis verdünnt und je 150 µl der Antikörperlösung zu den Zellen gegeben. Die Zellen inkubierten 2 Stunden mit der Primärantikörperlösung. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit der 0,5% BSA/DPBS-Lösung gewaschen. Folgend wurde der Sekundärantikörper verdünnt (1:200) und je 150 µl der Verdünnung auf die Zellen gegeben. Die Zellen inkubierten 90 Minuten unter Lichtausschluss mit dem Sekundärantikörper. Danach wurde der Kammeraufsatz des Objektträgers entfernt, überflüssige Flüssigkeit durch vorsichtiges Schütteln entfernt und ein Tropfen 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) auf die Zellen gegeben. Der Objektträger wurde mit einem Deckgläschen versehen und die Ränder mit

Nagellack versiegelt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden repräsentative Bilder in 20-facher und 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

Tabelle 26 Antikörper ICC

Epitop-Flouorchrom	Organismus	Verdünnung	Hersteller
<i>Primärantikörper</i>			
FGF14	Kaninchen	1:300	Abcam
<i>Sekundärantikörper</i>			
Anti-Kaninchen IgG-Alexa Flour 488	Ziege	1:300	Invitrogen
Anti-Maus IgG-Alexa Flour 488	Ziege	1:300	Invitrogen

2.7.2 Lungengewebschnitte

Das in Paraffin eingebettete Lungengewebe entstammte dem Pathologischen Institut der Universitätsklinik Gießen-Marburg (Universities of Giessen and Marburg Lung Center (UGMLC) Biobank Gießen).

2.7.3 Immunhistochemische Polymerfärbung

Durch Bindung eines Primärantikörpers und eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers werden bei der Immunhistochemie spezifische Proteine nach Ablauf einer Färbereaktion unter dem Lichtmikroskop sichtbar. Zur Färbung der Paraffinschnitte wurde das „ZytoChem Plus AP Polymer Kit“ verwendet. 3 µm Paraffinschnitte wurden auf ihren Objektträgern 60 Minuten bei 60 °C erwärmt. Anschließend folgte eine absteigende Alkoholreihe. Dafür wurden die Paraffinschnitte mit Xylol (dreimal 10 Minuten), 99,9% Ethanol (zweimal 5 Minuten), 96% Ethanol (5 Minuten) und 70% Ethanol (5 Minuten) behandelt. Nachdem die Paraffinschnitte zweimal 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen worden waren, wurden sie 20 Minuten in einem Reiskocher gekocht und danach 30 Minuten zum Abkühlen bei Raumtemperatur belassen. Es folgten zwei Waschschrte mit DPBS 1x. Danach wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet und mit einem Tropfen einer Proteinase-K-Lösung versehen. Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurde die Proteinase-K-Lösung durch Klopfen entfernt, und für 60 Minuten durch eine 10% BSA/DPBS-Lösung ersetzt. Nach dreimaligem Waschen wurde die Reagenz 1 des „ZytoChem Plus AP Polymer Kit“ für 5 Minuten auf die Schnitte gegeben. Anschließend wurde der Primärantikörper in einem Verhältnis von 1:100 in 10% BSA/DPBS verdünnt auf die Gewebeschnitte pipettiert. Die

Gewebeschnitte inkubierten mit der Antikörperlösung über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS wurden die Gewebsschnitte 20 Minuten mit der Reagenz 2 und 30 Minuten mit Reagenz 3 behandelt. Zwischen den Behandlungen wurde je dreimal mit TBST gewaschen. Zum Entwickeln wurde ein Tropfen einer AP-Red-Lösung auf den ersten Schnitt gegeben und die Zeit bis zum Eintreten der Rotfärbung notiert. Alle nachfolgenden Schnitte wurden genau dieselbe Zeit mit der AP-Red-Lösung behandelt. Die Entwicklungsreaktion wurde mit Leitungswasser terminiert. Nachdem alle Schnitte entwickelt wurden, folgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin und eine aufsteigende Alkoholreihe. Zuletzt wurden die Schnitte mit Pertex und einem Deckgläschen versehen und am nächsten Tag mit Hilfe des Nanozoomer® eingescannt.

Tabelle 27 Antikörper Polymerfärbung

Epitop	Organismus	Verdünnung	Hersteller
FGF14	Kaninchen	1:100	Abcam

2.8 Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Pro Experiment wurden mindestens zwei Replikate angefertigt. Experimente wurden von der Auswertung ausgeschlossen, sofern methodische oder technische Fehler vorlagen. Als methodische Fehler wurde das Abweichen vom Versuchsprotokoll definiert. Zum Ausschluss führte beispielsweise das Nichteinhalten einer Inkubationszeit (Abweichung > 15%), von Inkubationsbedingungen (Temperatur, Lichtausschluss) oder das Auslassen einer Protokollanweisung. Technische Fehler lagen vor, sofern ein Experiment beispielsweise durch ungenaues Pipettieren, falsch zusammengesetzte Lösungen, ungleiche Zellzahlen oder die fehlerhafte Bedienung eines technischen Gerätes nicht auswertbar war. Replikate, die zu mehr als 75% von dem Mittelwert der jeweiligen Versuchsgruppe eines Experimentes abwichen, wurden als technisch fehlerhaft deklariert und von der Versuchsauswertung ausgeschlossen. Die graphische Aufbereitung sowie die statistische Testung wurden mit Hilfe der Software „Prism 9“ durchgeführt und orientierte sich an den Empfehlungen von Ho et al., 2019¹⁷. Die gewerteten Ergebnisse aller unabhängig voneinander durchgeführten Experimente wurden in Säulendiagrammen zusammengefasst dargestellt. In den als Scatter-Plots dargestellten Säulendiagrammen beschrieb jeder Datenpunkt einen gemessenen Wert. Zusätzlich wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung ($\pm$ stdev) für jede Versuchsgruppe abgebildet. Die Daten der Überlebensanalysen wurden in Staircase-Plots dargestellt. Als Datenpunkte wurden nur die zensierten Werte

abgebildet. Zur statistischen Testung der Genexpression der gepaarten TCGA-Daten wurde ein abhängiger T-Test verwendet. Die statistische Testung der übrigen Tumorgenexpressionsdaten erfolgte mit einem Welch-Test. Der Test wurde ausgewählt, da die Daten der beiden Versuchsgruppen unabhängig voneinander waren und angenommen wurde, dass sich die Standardabweichungen der Grundgesamtheiten des Nichttumorgewebes und des Tumorgewebes unterscheiden. Für die statistische Testung der Zellkulturexperimente mit einer Kontroll- und einer Experimentalgruppe wurde ein Zweistichproben-t-Test verwendet. Es wurde angenommen, dass sich die Zellen der Kontroll- und der Experimentalgruppe mit Ausnahme der in der Experimentalgruppe durchgeführten Intervention und damit auch in den Standardabweichungen ihrer Grundgesamtheiten gleichen. Zur statistischen Untersuchung einer Kontrollgruppe und mehr als einer Experimentalgruppe wurde eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Für die statistische Testung einer Überlebensanalyse wurde ein Log-Rank-Test verwendet. Bei einem p -Wert $< 0,05$ wurde ein Ergebnis als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Die *FGF14*-Expression korrelierte mit dem Gesamtüberleben der TCGA-LUAD-Patientenkohorte.

Der erste Versuchsteil untersuchte die *FGF14*-Expression bei NSCLC sowie deren Einfluss auf das Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten. Dazu wurden die Datensätze TCGA-LUNG, TCGA-LUSC, TCGA-LUAD sowie humane Tumorproben und NSCLC-Zelllinien analysiert. Die TCGA-Kohorten LUNG, LUSC und LUAD wurden auf Grund ihrer großen Patientenzahl ausgewählt. Mit Hilfe des UCSC-Xena-Browsers wurde die *FGF14*-Expression der NSCLC, LUSC und LUAD mit der *FGF14*-Expression des korrespondierenden Nichttumorgewebes verglichen. Die *In-Silico*-Analyse der Sequenzierungsdaten ergab, dass die *FGF14*-Expression aller drei Entitäten signifikant gegenüber Nichttumorgewebe reduziert war (**Abb. 6 A, D, G**). Um zu klären, ob die in den Daten beobachtete Reduktion der *FGF14*-Expression einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Patienten hatte, wurde in einem zweiten Schritt das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit von der *FGF14*-Expression untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Patienten einer Kohorte anhand der medianen *FGF14*-Expression in zwei Gruppen geteilt. Bei der Überlebensanalyse der NSCLC- und LUSC-Patienten konnte jeweils kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. LUAD-Patienten mit einer unter dem Median liegenden *FGF14*-Expression besaßen ein signifikant reduziertes Gesamtüberleben (**Abb. 6 B, E, H**). Da eine reduzierte *FGF14*-Expression bei den TCGA-LUAD-Patienten *in silico* mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert war, wurde die *FGF14*-Expression dieses histologischen Subtyps im Labor anhand von Proben der UGMLC- und DZL-Biobank auf mRNA- und Proteinebene validiert. Die Analyse der *FGF14*-Expression von 18 LUAD-Tumoren und 18 Nichttumorgeweben der Lungenbiomaterialbank Heidelberg mit Hilfe der qPCR ergab, dass der $\Delta\text{CT}(18\text{S}-\text{FGF14})$ -Wert der LUAD-Tumorproben signifikant reduziert war (**Abb. 6 C**). Zur Untersuchung der *FGF14*-Proteinexpression wurden Polymerfärbungen des Tumor- und Nichttumorgewebes dreier Patienten der UGMLC-Biobank Gießen angefertigt. Optisch beurteilt war die Färbung des FGF14-Proteins auf dem Tumorgewebe schwächer als auf dem Nichttumorgewebe (**Abb. 6 F**). Für die geplanten *In-Vitro*-Experimente sollten geeignete Tumorzelllinien ausgewählt werden. Deshalb wurde die *FGF14*-Expression verschiedener NSCLC-Zelllinien mit Hilfe der qPCR ermittelt. Als Untersuchungsobjekte dienten die LUAD-Zelllinien A549, H838,

H1299 und H1650, die LUSC-Zelllinien H226 und H520, die Lungenkarzinomzelllinie A427 und die Großzellkarzinomzelllinie H460. Als Nichttumorkontrolle wurden humane Bronchialepithelzellen (HBEC) verwendet. Die $\Delta\text{CT}(18\text{S-FGF14})$ -Werte der Zelllinien A549, H838 und H226 waren gegenüber den HBEC signifikant vermindert. Bei den Zelllinien H1299, H520, A427 und H460 ergaben sich signifikant erhöhte $\Delta\text{CT}(18\text{S-FGF14})$ -Werte. Der $\Delta\text{CT}(18\text{S-FGF14})$ -Wert der LUAD-Zelllinie H1650 unterschied sich nicht signifikant von dem der HBEC (**Abb. 6 I**).

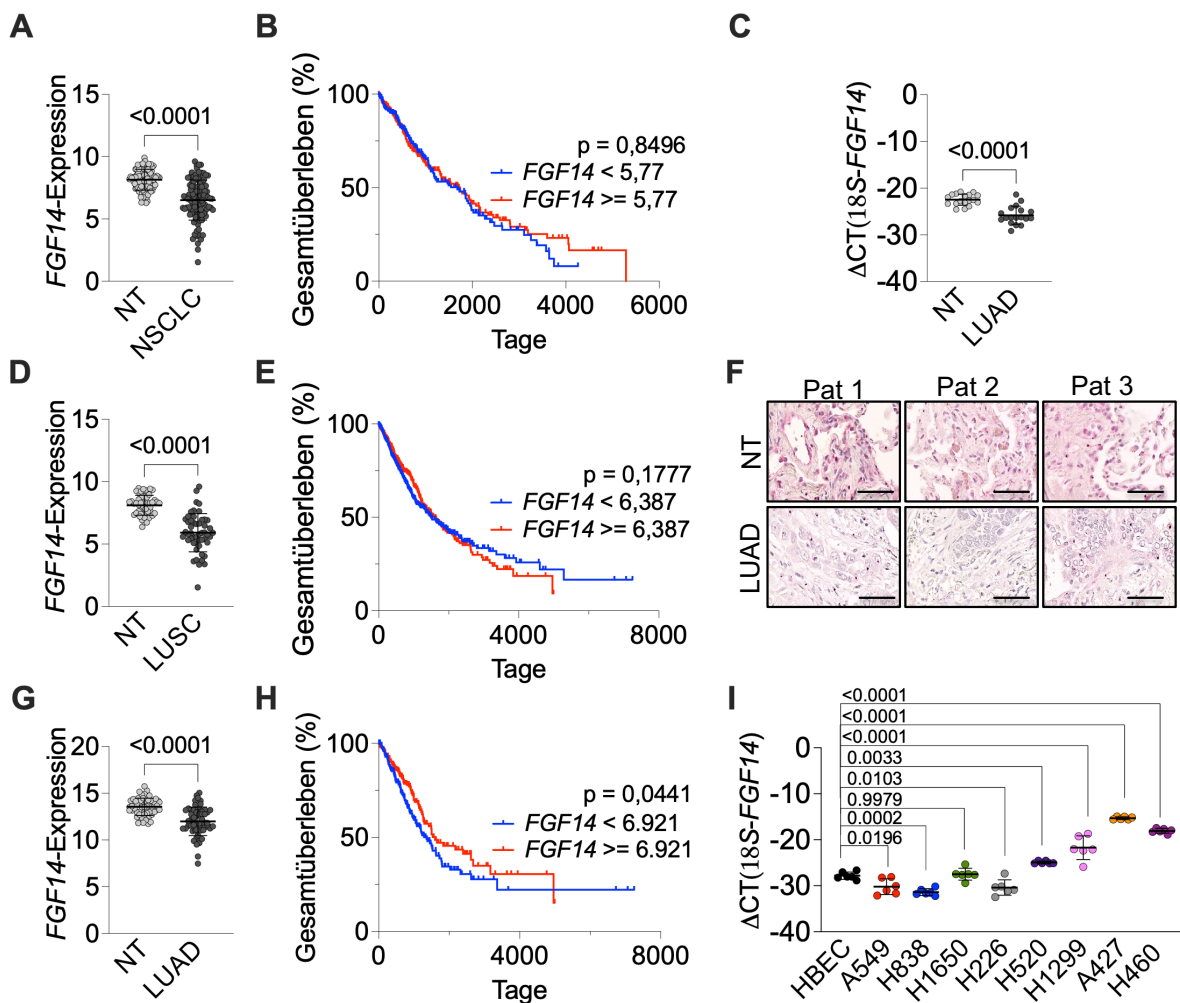


Abbildung 6 Die FGF14-Expression korrelierte mit dem Gesamtüberleben der TCGA-LUAD-Patientenkohorte. (A, D, G) Vergleich der FGF14-mRNA-Expression ($\log_2(\text{norm_count}+1)$) zwischen gesundem Nichttumorgewebe (NT) und Tumorgewebe (NSCLC, LUSC, LUAD) eines Patienten ($n=57$). **(B, E, H)** Überlebensanalyse in einer Kaplan-Meier-Kurve. Die Patienten wurden anhand des Medians der FGF14-Expression in zwei gleichgroße Gruppen eingeteilt ($n=501$). **(C)** Vergleich der FGF14-mRNA-Expression (ΔCT) zwischen 18 Tumormustern von LUAD-Patienten (LUAD) und 18 Mustern von Nichttumorgewebe (NT). **(F)** Repräsentative immunhistochemische Färbungen des FGF14-Proteins auf Tumor- und Nichttumorgewebe von 3 LUAD-Patienten. Maßstableiste 50 μm . **(I)** Vergleich der FGF14-mRNA-Expression (ΔCT) von HBEC-Zellen mit LUAD-Zelllinien (A549, H1299, H838 und H1650), LUSC-Zelllinien (H226 und H520), der Lungenkarzinomzelllinie A427 und der Groß-Zell-Karzinomzelllinie H460 ($n=6$). Die Daten in **A, C, D, G, I** werden mit ihrem Mittelwert und ihrer $\pm$ Standardabweichung abgebildet. In **B, E, H** werden die zensierten Datenpunkte abgebildet. Zur Statistik dienen in **A, D, G**

abhängige T-Tests und in **B, E, H** Logrank-Tests. Zur Statistik in **C** diente ein Welch-Test und zur Statistik in **I** bei mehr als einer Versuchsgruppe eine One-way ANOVA. Bei einem p -Wert $< 0,05$ wurde die Differenz der Mittelwerte der Stichproben bzw. der Hazard-Funktionen als statistisch signifikant betrachtet.

3.2 Eine Überexpression von *FGF14* reduzierte die Proliferations- und Migrationskapazität *in vitro*

Um zu untersuchen, ob eine Veränderung der *FGF14*-Expression das Proliferations- und Migrationsverhalten humaner NSCLC-Zelllinien beeinflusst, wurde das *FGF14*-Gen mit Hilfe eines Plasmids in den LUAD-Zelllinien A549 und H838 überexprimiert. Die Auswahl der Zelllinien erfolgte auf Grundlage der Beobachtungen aus 3.1. Beide Zelllinien wurden jeweils mit einem *FGF14*-Plasmid (*FGF14oe*) und einem Kontrollplasmid (*LV*) transfiziert. Nachdem die Transfektion erfolgt war, wurde die Expression des *FGF14*-Gens auf mRNA- und auf Proteinebene validiert. Mit Hilfe der qPCR wurden sowohl für A549- und als auch für H838-*FGF14oe*-Zellen signifikant erhöhte $\Delta\text{CT}(18\text{S-FGF14})$ -Werte gemessen (**Abb. 7 A**). Die *FGF14*-Proteinexpression wurde anhand immunfluoreszenzzytochemischer Färbungen und Westernblots untersucht. Für die *FGF14oe*-Zellen beider Zelllinien konnten optisch beurteilt stärkere Fluoreszenzsignale und *FGF14*-Banden detektiert werden (**Abb. 7 B, C, D**). Durch die Quantifizierung der relativen Bandendichte *FGF14/ACTB* wurde auf den Westernblots zusätzlich nachgewiesen, dass die detektierten *FGF14*-Banden beider *FGF14oe*-Zelllinien signifikant kräftiger waren als die der Leervektorkontrollen (**Abb. 7 C**). Anschließend wurde das Proliferations- und Migrationsverhalten der Tumorzellen anhand verschiedener Assays untersucht. Zur Analyse des Proliferationsverhaltens und Zellüberlebens wurden BrdU-Assays und Kolonienbildungs-Assays durchgeführt. Im Vergleich zu den *LV*-Zellen wiesen die *FGF14oe*-Zellen beider Zelllinien eine signifikant geringere BrdU-Inkorporation auf (**Abb. 7 E**). Die Auswertung der Kolonienbildungs-Assays brachte weniger eindeutige Ergebnisse. Während die A549-*FGF14oe*-Zellen signifikant weniger Kolonien bildeten, fand sich beim Vergleich der H838-*LV*- und H838-*FGF14oe*-Zellen kein signifikanter Unterschied (**Abb. 7 F**). Der Beurteilung des Migrationsverhaltens dienten Wundheilungs-Assays und Transwell-Assays. Nach 18 Stunden waren die Scratches zu einem signifikant geringeren Anteil geschlossen (**Abb. 7 G, H, I**) und auf den Transwell-Membranen der *FGF14oe*-Zellen beider Zelllinien befanden sich signifikant weniger Zellen (**Abb. 7 J, K, L**).

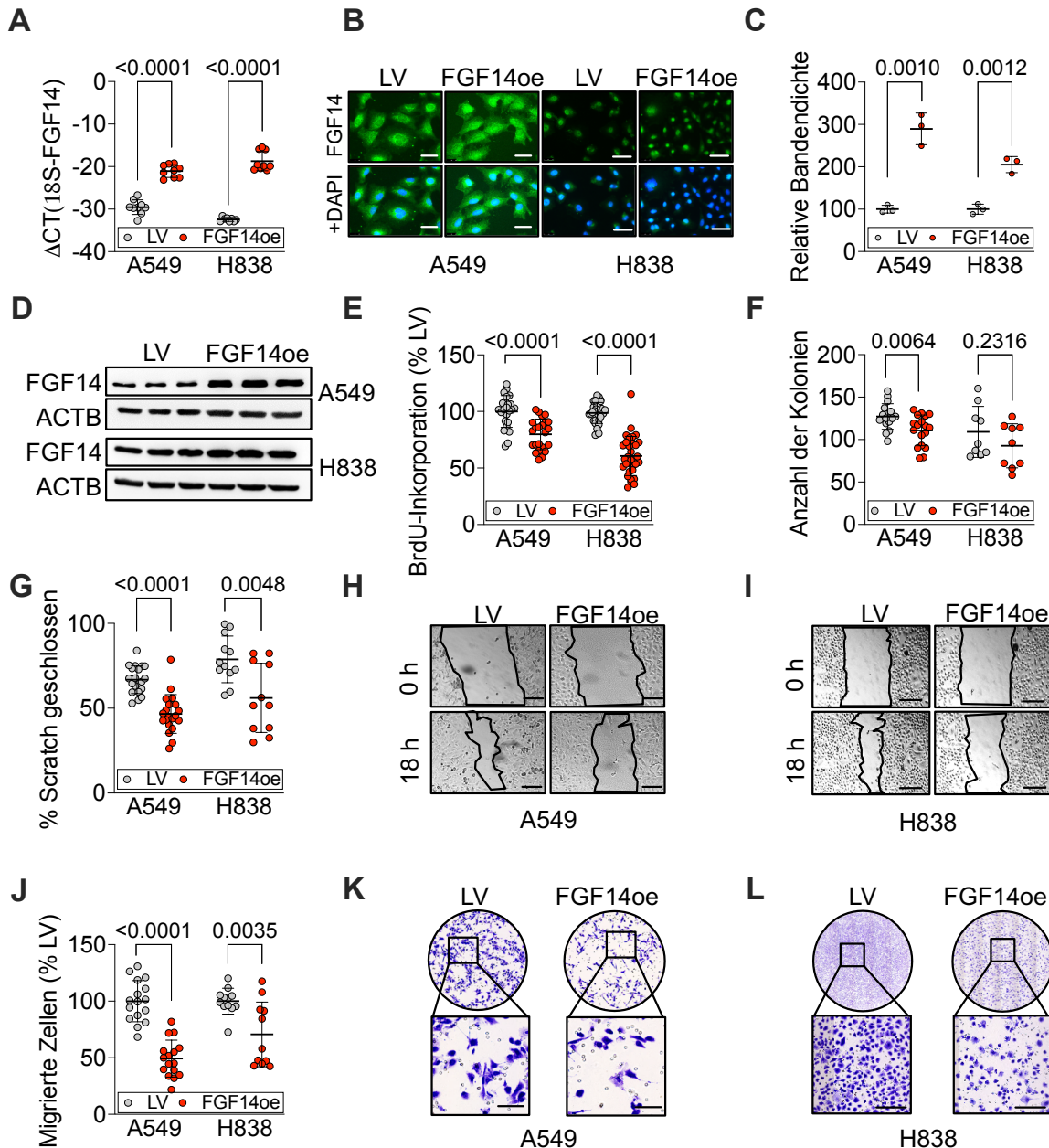


Abbildung 7 Eine Überexpression von *FGF14* reduzierte die Proliferations- und Migrationskapazität in vitro. (A) Vergleich der *FGF14*-mRNA-Expression (ΔCT) zwischen LV-Zellen und FGF14oe-Zellen ($n=9$) für A549 und H838. (B) ICC der LV-Zellen und FGF14oe-Zellen für A549 und H838. FGF14 wurde durch den Sekundärantikörper AlexaFluor 488 in Grün sichtbar gemacht. Die DNA erscheint durch eine DAPI-Färbung blau. Maßstableiste 50 μm (A549) 100 μm (H838). (C) Quantifizierung der relativen Bandendichte FGF14/ACTB der Western-Blots für A549 und H838-Zellen ($n=3$). (D) Vergleich der FGF14-Proteinexpression zwischen LV-Zellen und FGF14oe-Zellen ($n=3$) für A549 und H838 mittels Western-Blot. Als Ladekontrolle diente ACTB. (E) Vergleich der relativ zur LV-Kontrollgruppe gemessenen BrdU-Inkorporation zwischen LV-Zellen und FGF14oe-Zellen für A549 ($n=3$) und H838 ($n=3$). (F) Vergleich der Anzahl der Kolonien zwischen LV-Zellen und FGF14oe-Zellen für A549 ($n=6$) und H838 ($n=3$). (G) Vergleich des nach 18 h geschlossenen Flächenanteils im Wundheilungs-Assay zwischen LV-Zellen und FGF14oe-Zellen für A549 ($n=5$) und H838 ($n=3$) und repräsentative Bilder nach 0 h und 18 h für A549 (H) und H838 (I). Maßstableiste 100 μm . (J) Vergleich der relativ zur LV-Kontrollgruppe migrierten Zellen zwischen LV-Zellen und FGF14oe-Zellen für A549 ($n=4$) und H838 ($n=3$) und repräsentative Bilder für A549 nach 6 h (K) und H838 nach 16 h (L). Maßstableiste 100 μm . Die Daten werden mit ihrem Mittelwert und ihrer $\pm$ Standardabweichung abgebildet. Zur Statistik

diente ein Zweistichproben-T-Test. Bei einem p -Wert $< 0,05$ wurde die Differenz der Mittelwerte der Stichproben als statistisch signifikant betrachtet.

3.3 Eine Reduktion der *FGF14*-Expression erhöhte die Proliferations- und Migrationskapazität *in vitro*

Weiter sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob sich eine siRNA vermittelte Reduktion der *FGF14*-Expression auf das Proliferations- und Migrationsverhalten verschiedener NSCLC-Zellen auswirkt. Unter Berücksichtigung der Beobachtungen aus Abschnitt 1 und 2 wurden die *FGF14* hoch exprimierenden Zelllinien A549-FGF14oe und H460 ausgewählt und jeweils mit einer gegen *FGF14* gerichteten siRNA (+siFGF14) und einer Kontrollsequenz (+siNT) behandelt.

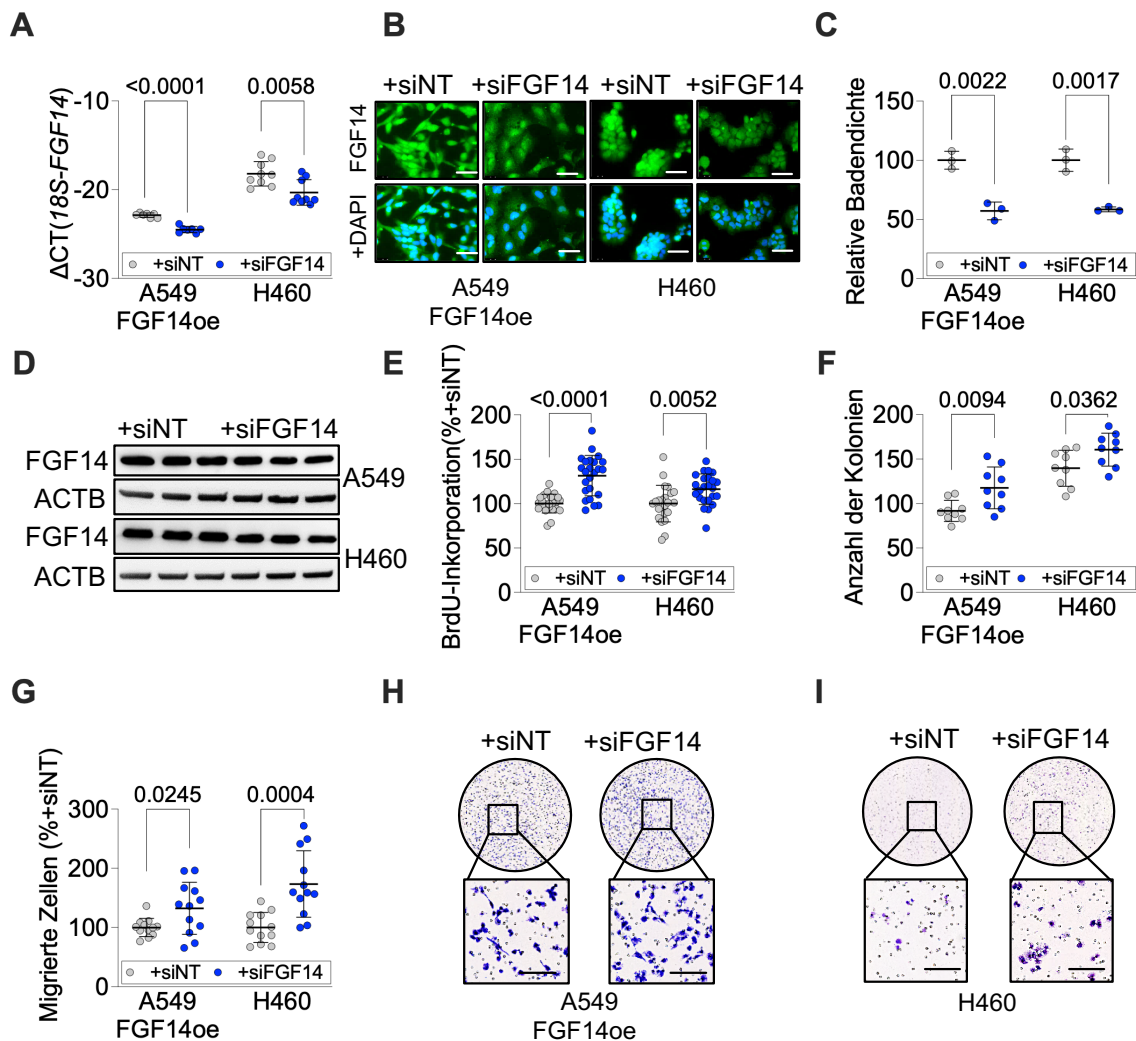


Abbildung 8 Eine Reduktion der *FGF14*-Expression erhöhte die Proliferations- und Migrationskapazität *in vitro*. (A) Vergleich der *FGF14*-mRNA-Expression (ΔCT) zwischen Zellen mit +siNT-Transfektion und +siFGF14-Transfektion für A549-FGF14oe- ($n=7$) und H460

(n=9). **(B)** ICC der Zellen mit +siNT-Transfektion und +siFGF14-Transfektion für A549-FGF14oe und H460. FGF14 wurde durch den Sekundärantikörper AlexaFlour 488 in Grün sichtbar gemacht. Die DNA erscheint durch eine DAPI-Färbung blau. Maßstableiste 50 μ m. **(C)** Quantifizierung der relativen Bandendichte FGF14/ACTB der Western-Blots für A549 FGF14oe- und H460-Zellen (n=3). **(D)** Vergleich der FGF14-Proteinexpression zwischen Zellen mit +siNT-Transfektion und +siFGF14-Transfektion (n=3) für A549-FGF14oe und H460 mittels Western-Blot. Als Ladekontrolle diente ACTB. **(E)** Vergleich der relativ zur +siNT-Kontrollgruppe gemessenen BrdU-Inkorporation zwischen Zellen mit +siNT-Transfektion und +siFGF14-Transfektion für A549-FGF14oe und H460-Zellen (n=3). **(F)** Vergleich der Anzahl der Kolonien zwischen Zellen mit +siNT-Transfektion und +siFGF14-Transfektion für A549-FGF14oe und H460 (n=3). **(G)** Vergleich der relativ zur +siNT-Kontrollgruppe migrierten Zellen zwischen Zellen mit +siNT-Transfektion und +siFGF14-Transfektion für A549-FGF14oe und H460-Zellen (n=3) und repräsentative Bilder für A549-FGF14oe nach 6 h **(H)** und H460 nach 24 h **(I)**. Maßstableiste 100 μ m. Die Daten werden mit ihrem Mittelwert und ihrer $\pm$ Standardabweichung abgebildet. Zur Statistik diente ein Zweistichproben-T-Test. Bei einem p -Wert < 0,05 wurde die Differenz der Mittelwerte der Stichproben als statistisch signifikant betrachtet.

Bevor die Zellversuche durchgeführt wurden, war wie in Abschnitt 2 die Wirksamkeit der genetischen Intervention auf mRNA- und Proteinebene überprüft worden. Die Analyse der *FGF14*-mRNA-Expression ergab, dass der Δ CT(18S-*FGF14*)-Wert der +siFGF14-Zellen signifikant verringert war. (**Abb. 8 A**). Die FGF14-Proteinexpression wurde mittels ICC und Westernblot validiert. Das Fluoreszenzsignal der +siFGF14-Zellen war nach immunfluoreszenzzytochemischer Färbung optisch beurteilt gegenüber den +siNT-Zellen abgeschwächt (**Abb. 8 B**). Ähnliches ergab die Detektion der FGF14-Banden auf den Westernblots. Durch Quantifizierung der relativen Bandendichte (FGF14/ACTB) wurde nachgewiesen, dass die Banden der +siFGF14-Zellen signifikant schwächer waren. (**Abb. 8 C, D**). Folgend wurden wie in Abschnitt 3.2 BrdU-Assays und Kolonienbildungs-Assays zur Analyse des Proliferationsverhaltens und Zellüberlebens durchgeführt. *In Vitro* wurden bei den +siFGF14-Zellen signifikant erhöhte relative BrdU-Inkorporationen und Kolonienzahlen ermittelt (**Abb. 8 E, F**). Das Migrationsverhalten wurde anhand von Transwell-Assays untersucht. Da die siFGF14 induzierte Reduktion der *FGF14*-Expression transient war, wurde protokollbedingt auf das Wundheilungs-Assay verzichtet. Auf den Membranen der +siFGF14-Zellen beider Zelllinien befanden sich verglichen mit den +siNT-Zellen signifikant weniger Zellen. (**Abb. 8 G, H, I**).

3.4 Eine Überexpression von *FGF14* beeinflusste das Transkriptom von A549-Zellen

Weil in der Literatur Hinweise darauf existieren, dass FGF14 in nukleäre Prozesse involviert ist, wurde mit Hilfe einer RNA-Sequenzierung untersucht, ob sich das Transkriptom der A549-FGF14oe-Zellen von dem der A549-LV-Zellen unterscheidet^{47,85}. Pro Versuchsgruppe wurde das Transkriptom vier unabhängiger Zellklone

sequenziert. Im Zuge der RNA-Sequenzierung wurden insgesamt 20382 Gene untersucht. Bei einer Signifikanzschwelle des padj von 0,05 waren 1070 Gene differenziell reguliert (DEG) (**Abb. 9 A, B, C**).

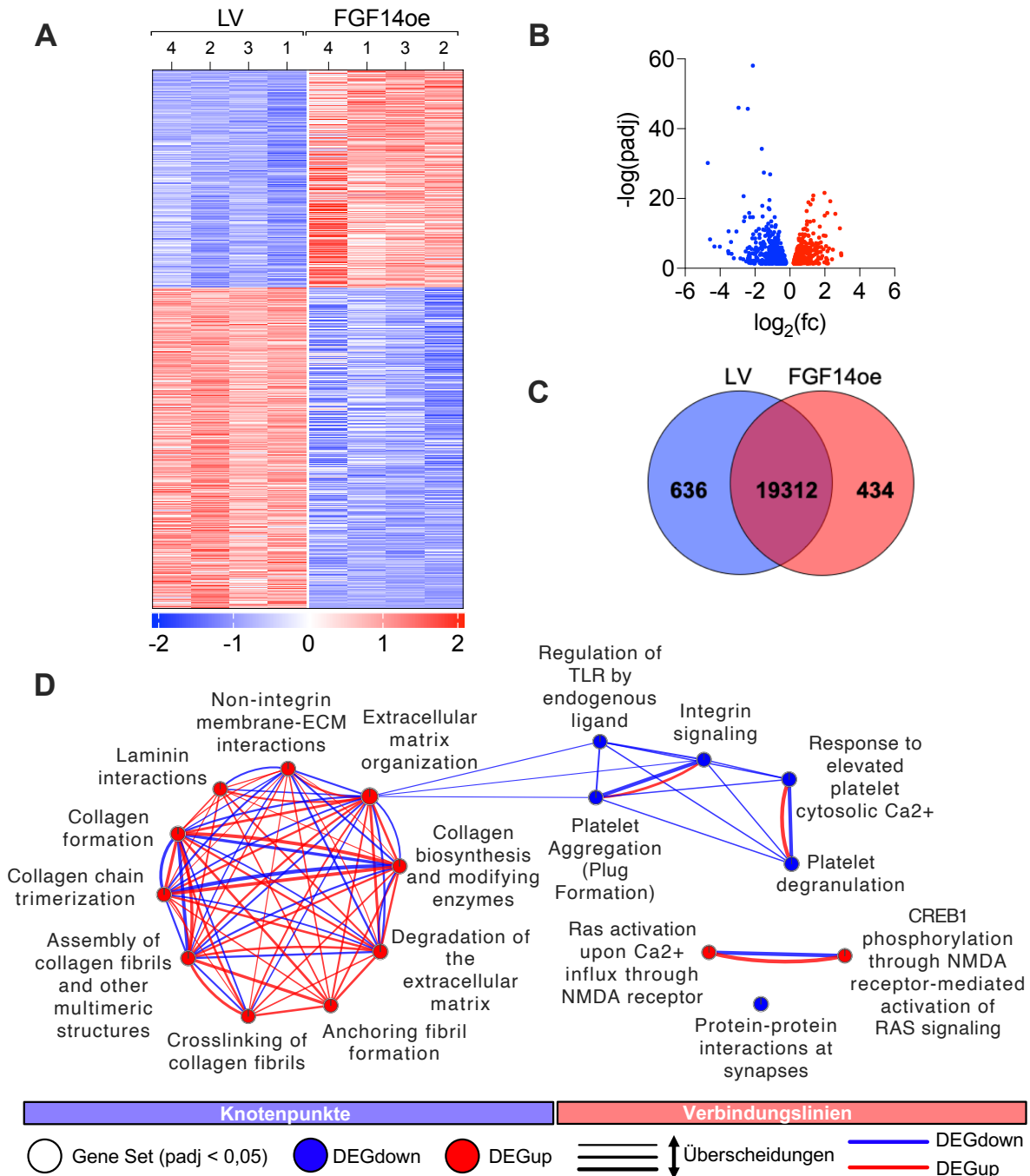


Abbildung 9 Die Überexpression von *FGF14* beeinflusste das Transkriptom von A549-Zellen. (A) Die Heatmap zeigt die 1070 DEG. Eine blaue Kontrastierung gibt einen negativen z-Wert, eine rote Kontrastierung einen positiven z-Wert an. (B) Der Volcano-Plot bildet die DEG anhand ihres logarithmisch transformierten relativen Regulationsunterschieds und ihres negativen dekadischen Logarithmus des adjustierten p-Wertes ($-\log(\text{padj})$) ab. Rot = hochreguliert, blau = herunterreguliert. (C) Das Venn-Diagramm zeigt die Anzahl der DEG. (D) Cytoscape-Netzwerk generiert mit Hilfe der EnrichmentMap. Das Netzwerk zeigt die von der ORA unter den DEG als signifikant überrepräsentiert befundenen Signalwege. Die Farbe der Knoten gibt Auskunft über den Regulationszustand der hauptsächlich enthaltenen DEG. Rot =

hochreguliert, blau = herunterreguliert. Die Verbindungslinien zeigen Überlappungen zwischen den Knoten an. Die Stärke der Verbindungslinie gibt Auskunft über die Anzahl sich überlappenden Gene. Rot = hochreguliert, blau = herunterreguliert. Zur Statistik dient der exakte Test nach Fischer. Zur Beherrschung des Problems des multiplen Testens wurde zusätzlich die Benjamini-Hochberg-Prozedur angewendet. Bei einem $\text{padj-Wert} < 0,05$ wird die Differenz der beobachteten Häufigkeit von der erwarteten Häufigkeit als statistisch signifikant betrachtet.

Im Vergleich exprimierten die A549-FGF14oe-Zellen 636 Gene schwächer und 434 Gene stärker als die A549-LV-Zellen. Nachdem festgestellt worden war, dass sich die Transkriptome beider Zellklone voneinander unterschieden, sollte ermittelt werden, ob Gene bestimmter Signalwege im besonderen Maße qualitativ oder quantitativ verändert waren (Gene Enrichment). Zu diesem Zweck wurden die Sequenzierungsdaten der LV- und FGF14oe-Zellen unter Zuhilfenahme des ORA-Analyse-Algorithmus mit den Signalwegen der Reactome-Datenbank abgeglichen. Zwei separat mit den hochregulierten und herunterregulierten DEG durchgeführte ORA errechneten 18 signifikant überrepräsentierte Signalwege (**Abb. 9 D**). Grob ließen sich die Signalwege der extrazellulären Matrix (EZM), der Blutgerinnung und dem neuronalen System zuordnen. Die Visualisierung dieser Signalwege mit Hilfe der EnrichmentMap-App der Cytoscape-Software offenbarte, dass eine Vielzahl der überrepräsentierten Signalwege miteinander zusammenhingen (**Abb. 9 D**).

3.5 Die DEG CCBE1, ADARB1, MUC16 und COL11A1 waren bei der TCGA-LUAD-Kohorte dysreguliert

Basierend auf den Ergebnissen der Signalweg-Analysen wurde mit Hilfe des UCSC-Xena-Browsers und des TCGA-LUAD-Datensatzes unter den Top50-DEG nach weiteren interessanten, bei LUAD verändert exprimierten Genen gesucht. Zur weiteren Analyse wurden die Gene *CCBE1*, *ADARB1*, *MUC16* und *COL11A1* ausgewählt (**Abb. 10 A**). Bei *CCBE1* und *ADARB1* handelte es sich um von den FGF14oe-Zellen hoch exprimierte Gene (**Abb. 10 A**). Die *In-Silico*-Analyse des TCGA-LUAD-Datensatzes ergab, dass die Expression der Gene *CCBE1* und *ADARB1* bei den LUAD signifikant verringert war. Patienten mit einer unter dem Median liegenden *CCBE1*- oder *ADARB1*-Expression besaßen geringere, jedoch nicht signifikant veränderte Überlebenszeiten (**Abb. 10 B, C, D, E**). *MUC16* und *COL11A1* wurden von den FGF14oe-Zellen reduziert exprimiert (**Abb. 10 A**). Die mRNA-Expression der Gene *MUC16* und *COL11A1* war in den LUAD der TCGA-LUAD-Kohorte erhöht (**Abb. 10 F, H**). Bei beiden Genen korrelierte eine unter dem Median liegende mRNA-Expression mit einem signifikant längeren Gesamtüberleben (**Abb. 10 G, I**).

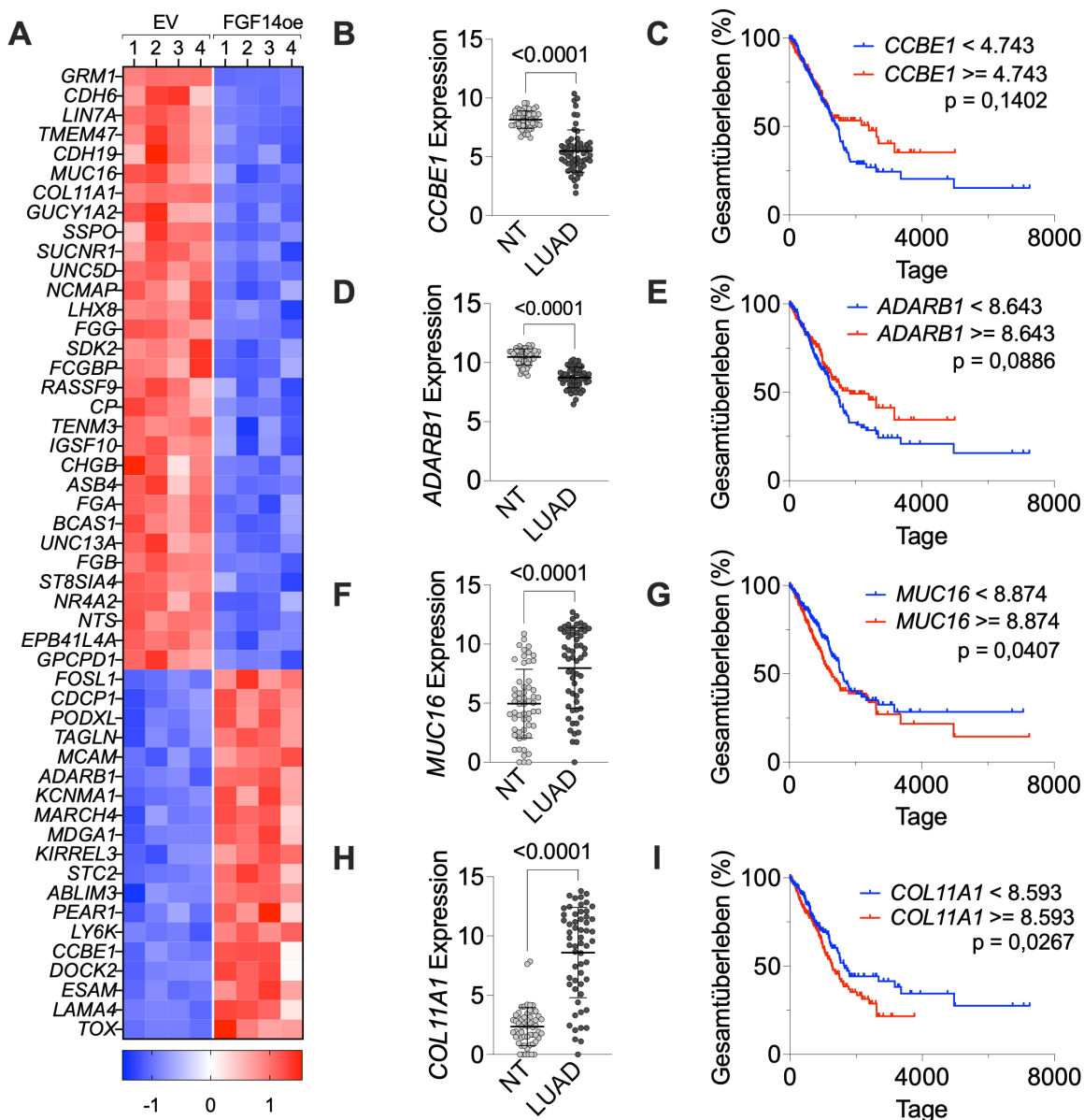


Abbildung 10 Die DEG CCBE1, ADARB1, MUC16 und COL11A1 waren bei der TCGA-LUAD-Kohorte dysreguliert. (A) Die Heatmap zeigt sortiert nach dem negativen dekadischen Logarithmus des adjustierten p-Wertes ($-\log(\text{padj})$) die 50 DEG mit dem größten Wert. Eine blaue Kontrastierung gibt einen negativen z-Wert, eine rote Kontrastierung einen positiven z-Wert an. (B-I) Untersuchung des TCGA-LUAD-Datensatzes auf die Expression von CCBE1, ADARB1, MUC16 und COL11A1. (B, D, F, H) Vergleich der mRNA-Expression ($\log_2(\text{norm_count}+1)$) zwischen gesundem Nichttumorgewebe (NT) und Tumorgewebe (LUAD) eines Patienten ($n=57$) für CCBE1 (B), ADARB1 (D), MUC16 (F), COL11A1 (H). (C, E, G, I) Überlebensanalyse in einer Kaplan-Meier-Kurve. Die Patienten werden anhand des Medians der Expression von CCBE1 (C), ADARB1 (E), MUC16 (G), COL11A1 (I) in zwei gleichgroße Gruppen eingeteilt ($n=501$). Die Daten in B, D, F, H werden mit ihrem Mittelwert und ihrer $\pm$ Standardabweichung abgebildet. In C, E, G, I werden die zensierten Datenpunkte abgebildet. Zur Statistik dient in B, D, F, H ein abhängiger T-Test und in C, E, G, I ein Logrank-Test. Bei einem p -Wert $< 0,05$ wird die Differenz der Mittelwerte der Stichproben bzw. der Hazard-Funktionen als statistisch signifikant betrachtet.

3.6 Validierung der *CCBE1*-, *ADARB1*-, *MUC16*- und *COL11A1*-Expression bei LUAD und A549-Zellen

Die Ergebnisse der *In-Silico*-Analyse wurden anhand von RNA-Proben der Lungenbiomaterialbank Heidelberg validiert. Genauer wurde die mRNA-Expressionen der Gene *CCBE1*, *ADARB1*, *MUC16* und *COL11A1* bei 18 LUAD und 18 Nichttumorgeweben untersucht. Während die Δ CT-Werte von *CCBE1* und *ADARB1* bei den LUAD-Proben signifikant reduziert waren, wiesen die LUAD bei Untersuchung der Gene *MUC16*, *COL11A1* signifikant erhöhte Δ CT-Werte auf (**Abb. 11 A, B, C, D**). Um die Abhängigkeit der Gene von der *FGF14*-Expression weiterführend zu untersuchen und um zu überprüfen, ob eine Reduktion der *FGF14*-Expression auch eine Veränderung der Expression der potenziellen Zielgene zur Folge hat, wurde die *ADARB1*-, *CCBE1*-, *COL11A1*- und *MUC16*-Expression mit *FGF14*-siRNA behandelte A549-*FGF14*oe-Zellen analysiert. Die Analyse ergab signifikant verringerte *CCBE1*- Δ CT-Werte und signifikant erhöhte *MUC16*- Δ CT-Werte bei den +si*FGF14*-A549-*FGF14*oe-Zellen (**Abb. 11 E, G**). Anders verhielt es sich bei den Genen *ADARB1* und *COL11A1*. Hier unterschieden sich die Δ CT-Werte der mit *FGF14*-siRNA behandelten Zellen nicht signifikant von den Werten ihrer +siNT-Kontrollen (**Abb. 11 F, H**).

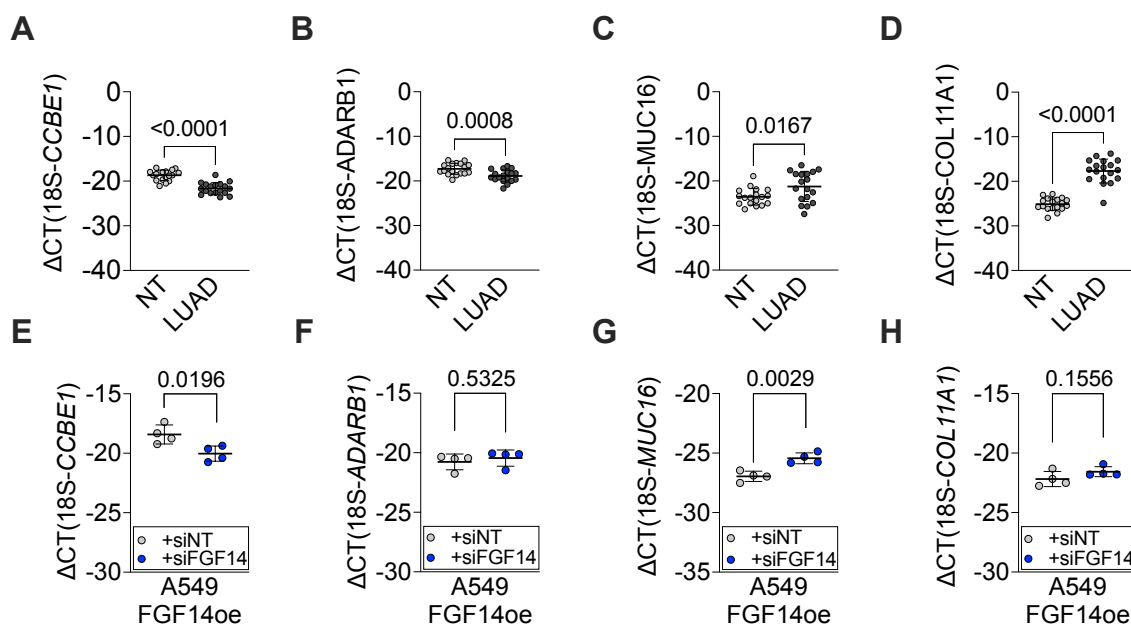


Abbildung 11 Validierung der *CCBE1*-, *ADARB1*-, *MUC16*- und *COL11A1*-Expression bei LUAD und A549-Zellen. (A, B, C, D) Vergleich der mRNA-Expression (Δ CT) zwischen 18 Tumورproben von LUAD-Patienten (LUAD) und 18 Proben von Nichttumorgewebe (NT) für *CCBE1* (A), *ADARB1* (B), *MUC16* (C), *COL11A1* (D). (E, F, G, H) Vergleich der mRNA-Expression (Δ CT) zwischen Zellen mit +siNT-Transfektion und +si*FGF14*-Transfektion für *CCBE1* (E), *ADARB1* (F), *MUC16* (G), *COL11A1* (H). Die Daten werden mit ihrem Mittelwert und ihrer $\pm$ Standardabweichung abgebildet. Zur Statistik dient in A, B, C, D ein Welch-Test und in E, F, G,

H ein Zweistichproben-T-Test. Bei einem p -Wert $< 0,05$ wird die Differenz der Mittelwerte der Stichproben als statistisch signifikant betrachtet.

4 Diskussion

4.1 Verschiedene Tumorentitäten weisen eine reduzierte *FGF14*-Expression auf

Gegenüber gesundem Gewebe war die *FGF14*-Expression sowohl bei den Tumoren der TCGA-Datensätze (LUNG/LUSC/LUAD) als auch bei den LUAD-Gewebeproben der Biobanken (UGMLC/DZL) und einigen NSCLC-Zelllinien verringert. Für die TCGA-LUAD-Patienten korrelierte eine solche Verringerung mit einem schlechteren Gesamtüberleben (**Abb. 6**). Eine Reduktion der *FGF14*-Expression lässt sich ebenfalls bei zervikalen Karzinomen, kolorektalen Karzinomen, Pankreaskarzinomen, nasopharyngealen Karzinomen, Osteosarkomen und Brustkarzinomen nachweisen^{6,24,36,52,67,93}. Bei Patienten mit Pankreaskarzinomen scheint eine Reduktion der *FGF14*-Expression wie bei den TCGA-LUAD-Patienten mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein⁵². Für die Dysregulation des *FGF14*-Gens könnten verschiedene Mechanismen ursächlich sein. Während eine Hypermethylierung des *FGF14*-Gens bei zervikalen und kolorektalen zur Reduktion der *FGF14*-Expression führte, war die *FGF14*-Expression bei nasopharyngealen Karzinomen von der Expression des Transkriptionsfaktors ZNF750 abhängig^{36,67,93}. Bei Osteosarkomzellen wurde die *FGF14*-Expression durch die RNA bindenden Ubiquitinligase MEX3C reduziert⁶. Ein ähnlichen Regulationsmechanismus entdeckten Jin *et al.* bei Brustkarzinomzelllinien. Hier wurde die *FGF14*-Expression durch die Mikro-RNA miR-370-3p reduziert²⁴.

4.2 Eine Elevation der *FGF14*-Expression reduziert die Proliferations- und Migrationskapazität

Ein ungehemmtes Zellwachstum sowie die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung sind nach Hannahan und Weinberg Kennzeichen eines malignen Tumors¹⁵. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass eine Erhöhung der *FGF14*-Expression sowohl die Proliferations- als auch die Migrationskapazität verschiedener NSCLC-Zelllinien *in vitro* reduziert (**Abb. 7**). Die Beobachtungen zur reduzierten Proliferationskapazität bestätigten sich weiterführend auch im Mausmodell⁷⁶. So wuchsen subkutan injizierte A549-FGF14oe-Zellen langsamer zu kleineren und leichteren Tumoren heran⁷⁶. Bei nasopharyngealen und kolorektalen Tumorzelllinien ist eine erhöhte *FGF14*-Expression

ebenfalls mit einer verminderten Proliferationskapazität assoziiert ^{67,93}. Während die Untersucher der nasopharyngealen Tumorzellen diesen Effekt nur *in vitro* beobachteten, fanden die Untersucher der kolorektalen Tumorzellen diesen Effekt auch im Mausmodell ^{67,76}. Eine Veränderung der Migrationskapazität konnte bei beiden Tumorzellentitäten nicht beobachtet werden ^{67,93}. Dem gegenüber deuten die Ergebnisse zweier sich mit Osteosarkom- bzw. Brustkarzinomzelllinien beschäftigender Arbeiten darauf hin, dass eine Erhöhung der *FGF14*-Expression zu einer verminderten Migrationskapazität führt ^{6,24}. Letztere könnte darauf hinweisen, dass *FGF14* den Prozess der „Epithelial To Mesenchymal Transition“ (EMT) beeinflusst. Unter der EMT versteht man ein zelluläres, nicht-binäres Programm, dessen Ausführung im Kontext von Krebserkrankungen mit der Invasion und Metastasierung von Tumoren in Verbindung gebracht wird ¹⁰. Im Zuge der EMT geben Tumorzellen ihre epitheliale Polarisierung auf und exprimieren vermehrt mesenchymale Proteine, die es ihnen in der Interaktion mit den sie umgebenden Stromazellen ermöglichen, ihren Zellverband zu verlassen ¹⁰. Eine Erhöhung der *FGF14*-Expression könnte diesen Vorgang umkehren oder verlangsamen. Welcher Mechanismus dieser Beobachtung ursächlich ist, obliegt weiteren Untersuchungen.

4.3 Eine Reduktion der *FGF14*-Expression erhöht die Proliferations- und Migrationskapazität

Nachdem eine Erhöhung der *FGF14*-Expression eine Reduktion der Proliferations- und Migrationskapazität zur Folge hatte, wurde untersucht, wie NSCLC-Zellen auf eine Reduktion der *FGF14*-Expression reagieren. Die siRNA induzierte Reduktion der *FGF14*-Expression führte bei A549-*FGF14*oe- und H460-Zellen zu einer Steigerung der Proliferations- und Migrationskapazität (**Abb. 8**). Brustkarzinom- und Osteosarkomzellen untersuchend kamen Jin et al. und Cao et al. zu vergleichbaren Ergebnissen ^{6,24}. Bei beiden Tumorzellentitäten war eine Reduktion der *FGF14*-Expression durch Transfektion einer *FGF14*-siRNA mit einer erhöhten Migrationskapazität assoziiert ^{6,24}.

4.4 Eine Überexpression des *FGF14*-Gens beeinflusst das Tumorzelltranskriptom

Da über *FGF14* bekannt ist, dass es sich zum Teil nukleär anreichert und in der Lage ist, DNA zu binden, wurde untersucht, ob die *FGF14*-Expression das Tumorzelltranskriptom beeinflusst ^{47,85}. Die RNA-Sequenzierung der A549-LV- und

A549-FGF14oe-Zellen ergab 1070 DEG (**Abb. 9**). Überproportional viele dieser DEG ließen sich mit Hilfe der ORA Signalwegen der EZM zuordnen. Der EZM wird neben strukturgebenden Funktionen zugeschrieben, über verschiedene, durch Integrine vermittelte Signalprozesse in der Lage zu sein, das Zellverhalten zu beeinflussen³⁷. Auch im Kontext von Krebserkrankungen scheint der EZM deshalb als Teil der Tumormikroumgebung eine Bedeutung zuzukommen^{15,37}. Einer in einem Tumor veränderten EZM wird u.a. die Förderung des ungehemmten Zellwachstums und einer EMT-induzierten Zellmigration zugeschrieben^{15,37}. Zwar kann die Ausbildung einer EZM in der Zellkultur ohne Hämostase und Stromazellen nicht in klassischer Weise stattfinden, doch ist bekannt, dass Tumorzellen auch *in vitro* eine EZM ausbilden⁸⁷. Die EZM durchläuft dabei verschiedene Reifestufen (**Abb. 12**)⁹⁰. Es werden eine früh-provisorische-, eine spät-provisorische- und eine ausgereifte Phase unterschieden⁹⁰. Die früh-provisorische EZM besteht zum Großteil aus Fibrinketten, wohingegen sich die spät-provisorische Matrix aus Fibronectin- und die reife Matrix aus Kollagenfasern zusammensetzt⁹⁰.

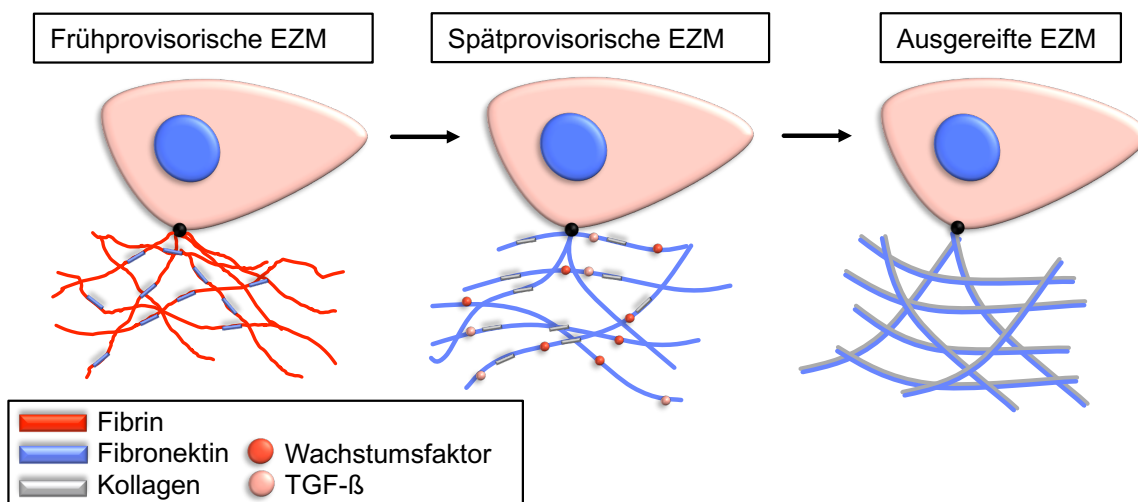


Abbildung 12 Reifephase der EZM. Die Ausbildung einer EZM kann in drei Phasen unterteilt werden. Zuerst wird eine frühprovisorische Matrix aus Fibrinogen gebildet. Diese reift zur spätprovisorischen Matrix. Dabei wird das Fibrinogen durch Fibronectin ersetzt. Eine Fibronectinmatrix bildet ein Netzwerk, in welchem sich Wachstumsfaktoren und TGF- β anreichern können. Die ausgereifte Matrix setzt sich schließlich aus Kollagen- und Fibronectinfasern zusammen. Alle EZM-Komponenten sind über Integrine mit den sie umgebenden Zellen gekoppelt. Die Abbildung wurde einer Abbildung aus⁹⁰ nachempfunden.

Auf mRNA-Ebene scheint sich der EZM-Aufbau der LV-Zellen von dem der FGF14oe-Zellen zu unterscheiden. Konkret waren die für das Ausbilden einer provisorischen EZM benötigten Gene *FGA*, *FGB*, *FGG* und *FN1* (Fibrin und Fibronectin) sowie die für das Ausbilden einer reifen Matrix benötigten Gene *COL11A1*, *COL13A1*, *COL16A1*,

COL18A1, *COL1A1*, *COL21A1*, *COL3A1*, *COL4A1*, *COL4A2*, *COL5A1*, *COL5A2* und *COL7A1* (Kollagen) signifikant in ihrer Expression verändert⁹⁰. Tatsächlich deutet eine malignomunabhängige Untersuchung zur Bandscheibendegeneration darauf hin, dass eine Überexpression des *FGF14*-Gens die Zusammensetzung der EZM verändern könnte⁸³. Ob die bei den Tumorzellen beobachteten transkriptionischen Veränderungen ebenfalls mit der *FGF14*-Expression und dem beobachteten Zellverhalten zusammenhängen, lässt sich nicht definitiv beantworten. Die Beobachtung bietet jedoch einen interessanten Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen.

4.5 Die DEG *CCBE1*, *ADARB1*, *MUC16* und *COL11A1* beeinflussen das Tumorzellverhalten

Basierend auf den Ergebnissen der RNA-Sequenzierung wurden vier Top50-DEG im Speziellen hinsichtlich ihres Regulationszustandes bei LUAD untersucht (**Abb. 10 und Abb. 11**). *CCBE1* war bei den A549-FGF14oe-Zellen hochreguliert und bei LUAD herunterreguliert (**Abb. 10 und Abb. 11**). Bei *CCBE1* handelt es sich um ein für die Lymphangiogenese essenzielles Gen^{1,18}. Welchen Einfluss die *CCBE1*-Expression auf das Gesamtüberleben von Tumorpatienten ausübt, könnte von der Tumorentität abhängen. So war eine reduzierte *CCBE1*-Expression bei kolorektalen Karzinomen mit einer besseren Prognose verbunden, wohingegen sie bei lymphatisch metastasierten Lungenkarzinomen mit einem schlechteren Gesamtüberleben korrelierte^{66,95}. Verglichen mit gesundem Gewebe war die *CCBE1*-Expression bei kolorektalen Karzinomen erhöht und bei Lungen-, Mamma- und Ovarialkarzinomen erniedrigt^{3,32,41}. Die funktionelle Untersuchung verschiedener Ovarialkarzinomzelllinien deutet darauf hin, dass eine Veränderung der *CCBE1*-Expression das Tumorzellverhalten beeinflusst. Während eine Reduktion der *CCBE1*-Expression die Migrations- und Proliferationskapazität steigerte, bewirkte eine Überexpression des *CCBE1*-Gens eine Reduktion dieser Eigenschaften³.

Ein weiteres Gen, welches bei den A549-FGF14oe-Zellen signifikant hochreguliert und bei LUAD herunterreguliert wurde, war *ADARB1* (**Abb. 10 und Abb. 11**). Das Produkt des *ADARB1*-Gens gehört der Gruppe der RNA-editierenden Enzyme an⁴⁵. Bei LUAD-Patienten, war eine reduzierte *ADARB1*-Expression mit einer schlechteren Krankheitsprognose assoziiert⁸⁶. Eine Reduktion der *ADARB1*-Expression gegenüber gesundem Gewebe wurde bei Glioblastomen, Ösophaguskarzinomen und LUAD beobachtet^{7,45,86}. Arbeiten, die das Zellverhalten von *ADARB1* überexprimierenden

Glioblastom-, Astrozytom-, und LUAD-Zelllinien untersuchten, berichten übereinstimmend von einem reduzierten Migrations- und Proliferationsverhalten ^{7,24,45}. Funktionelle Untersuchungen an den LUAD-Zelllinien A549- und H835-Zellen ergaben im Speziellen, dass eine Reduktion der *ADARB1*-Expression die Migrationskapazität steigerte, wohingegen eine Erhöhung der *ADARB1*-Expression die Migrationskapazität beider Zelllinien reduzierte ⁸⁶.

Im Kontrast zu *CCBE1* und *ADARB1* war die Expression des Gens *MUC16* bei den A549-FGF14oe-Zellen signifikant reduziert und bei LUAD erhöht (**Abb. 10 und Abb. 11**). In der TCGA-LUAD-Kohorte korrelierte eine erhöhte *MUC16*-Expression mit einem reduzierten Gesamtüberleben. Das *MUC16*-Gen kodiert für das Glykoprotein Mucin-16 ^{28,92}. Eine Dysregulation der *MUC16*-Expression ist bei einigen Tumorentitäten dokumentiert ²⁰. Bei Patientinnen, denen ein Ovarialkarzinom diagnostiziert wurde, findet *MUC16* in gespaltener Form als CA125 bereits eine klinische Anwendung als Serumentumormarker ^{65,92}. Die *MUC16*-Expression ist unter anderem bei Ovarialkarzinomen, Brustkarzinomen, dukalen Pankreaskarzinomen und NSCLC erhöht ^{25,33,56}. Eine Veränderung der *MUC16*-Expression scheint das Verhalten verschiedener Tumorzelllinien zu beeinflussen. Während die Überexpression des *MUC16*-Gens bei LUAD-Zelllinien die Proliferations- und Migrationskapazität steigerte, bewirkte eine Reduktion der *MUC16*-Expression bei Ovarialkarzinomzellen, Brustkrebszellen, und dukalen Pankreaskarzinomzellen das Gegenteil ^{25,33,56}.

Als viertes Gen wurde *COL11A1* untersucht. Die RNA-Sequenzierung ergab, dass die *COL11A1*-Expression bei den A549-FGF14oe-Zellen vermindert war (**Abb. 10 und Abb. 11**). Von LUAD scheint *COL11A1* mit einem schlechteren Gesamtüberleben in der TCGA-LUAD-Kohorte korrelierend überexprimiert zu werden. *COL11A1* kodiert für die Alphakette des Kollagen Typ XI und ist damit ein integraler Teil der reifen EZM ⁵¹. Das *COL11A1*-Gen wird unter anderem von Ovarialkarzinomen, Magenkarzinomen, kolorektalen Karzinomen, Brustkarzinomen und NSCLC überexprimiert ^{14,30,63,89,91}. Bei NSCLC scheint die *COL11A1*-Expression besonders in fortgeschrittenen Krankheitsstadien erhöht zu sein ⁶³. Funktionelle Untersuchungen an Ovarialkarzinom-, Brustkarzinom-, Magenkarzinom- und NSCLC-Zelllinien ergaben übereinstimmend, dass eine erhöhte *COL11A1*-Expression mit einer erhöhten Migrations- und Proliferationskapazität assoziiert war ^{14,30,63,88,89}. Eine Reduktion der *COL11A1*-Expression führte bei der LUAD-Zelllinie H23 zu einer Umkehr dieser Eigenschaften. ⁶³

4.6 Zusammenfassung der diskutierten Inhalte

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die *FGF14*-Expression verschiedener Tumorentitäten reduziert ist. Bei Pankreaskarzinom- und LUAD-Patienten scheint die verminderte *FGF14*-Expression einen prognostischen Einfluss zu haben. Es konnten bereits epigenetische Mechanismen identifiziert werden, die die *FGF14*-Expression auf prätranskriptioneller und posttranskriptioneller Ebene reduzierten. Durch welche Mechanismen die *FGF14*-Expression speziell bei LUAD supprimiert wird, bleibt in dieser Arbeit unbeantwortet. Bezogen auf das Zellverhalten lässt sich unter Berücksichtigung der diskutierten Literatur folgern, dass ein Anheben der *FGF14*-Expression mit einer verringerten Proliferations- und Migrationskapazität assoziiert ist, wohingegen ein Absenken der *FGF14*-Expression mit einer erhöhten Proliferations- und Migrationskapazität korreliert. Auf der Suche nach einem diesen Beobachtungen zugrunde liegenden Mechanismus, könnte die mit Hilfe der RNA-Sequenzierung identifizierte Veränderung des Tumorzelltranskriptoms richtungsweisen sein. Besonders die Beobachtung, dass viele der DEG an der Formierung der EZM beteiligt sind, könnte als Ansatz für weitere Untersuchungen dienen. Weitergehend konnten unter den Top50-DEG die Gene *CCBE1*, *ADARB1*, *MUC16* und *COL11A1* als in LUAD dysreguliert identifiziert werden. Es zeigte sich bei der Literaturrecherche, dass die Gene in dem bei den A549-FGF14oe-Zellen beobachteten Expressionszustand ein ähnliches Zellverhalten erzeugten. Die Frage, ob die differente Expression dieser Gene in den FGF14oe- und LV-Zellen kausal auf FGF14 zurückzuführen ist, oder ob es sich dabei lediglich um eine Korrelation handelt, bedarf weiterer Untersuchungen. Dadurch, dass das Absenken der *FGF14*-Expression eine Umkehr der *MUC16*- und *CCBE1*-Expression bewirkte, könnte sich der Verdacht jedoch zumindest für diese Gene erhärten (**Abb. 11**).

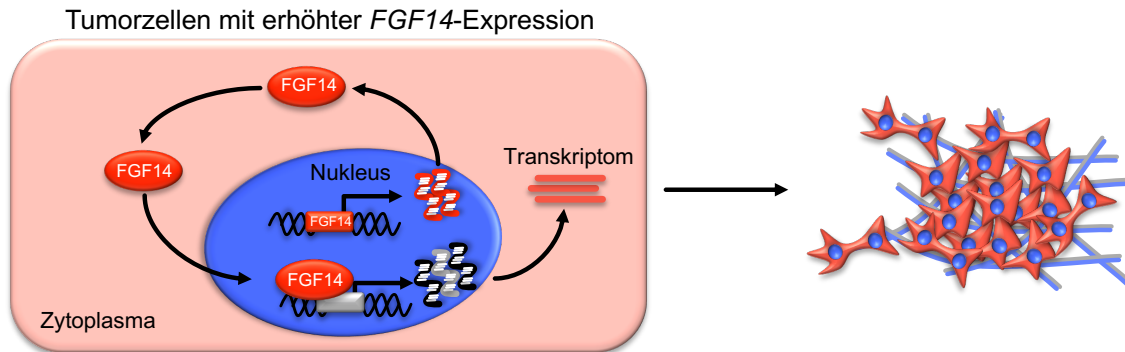
5 Ausblick

Schlussendlich ist es unter der Berücksichtigung der diskutierten Ergebnisse möglich, die dieser Arbeit zugrunde liegende Arbeitshypothese weiterzuentwickeln und eine neue Hypothese über einen mechanistischen Zusammenhang zwischen der *FGF14*-Expression und dem beobachteten Tumorzellverhalten aufzustellen (**Abb. 13**).

(1) Eine Reduktion der *FGF14*-Expression führt zu einem geringeren genregulativen Einfluss des im Nukleus befindlichen, DNA-bindenden *FGF14*-Proteins. (2) Die daraus resultierende Dysregulation der von *FGF14* regulierten

Gene steigert die Proliferations- und Migrationskapazität der Tumorzellen und (3) beeinflusst die Prognose von LUAD-Patienten.

A



B

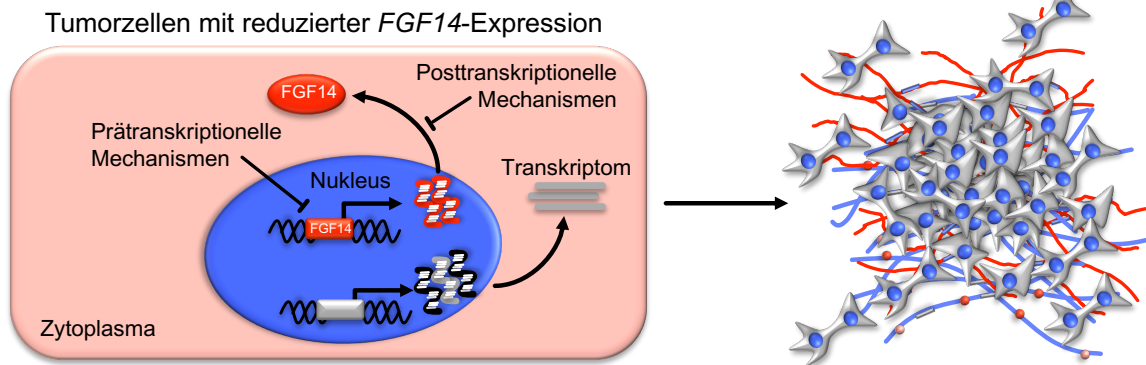


Abbildung 13 Hypothese über die Rolle der *FGF14*-Expression bei NSCLC-Zelllinien. (A) Eine Überexpression des *FGF14*-Gens führt zu einem stärkeren genregulativen Einfluss des *FGF14*-Proteins. Das dadurch veränderte Tumorzelltranskriptom reduziert die Proliferations- und Migrationskapazität der Tumorzellen. **(B)** Eine durch prä- oder posttranskriptionelle Prozesse induzierte Reduktion der *FGF14*-Expression führt zu einem geringeren genregulativen Einfluss des *FGF14*-Proteins. Die Dysregulation der von *FGF14* regulierten Gene (z.B. Gene der EZM) steigert die Proliferations- und Migrationskapazität der Tumorzellen. Eigene Darstellung.

6 Limitationen der Arbeit

Zur Überprüfung und Spezifizierung der neu aufgestellten Hypothese müssten viele weiterführende Untersuchungen angestellt werden. Zwar konnte im ersten Teil dieser Arbeit mittels verschiedener Ansätze demonstriert werden, dass die *FGF14*-Expression bei LUAD reduziert war, doch wurde kein Mechanismus nachgewiesen, der für diese Reduktion ursächlich war. Zur weiterführenden Untersuchung könnten beispielsweise Experimente zum Methylierungsgrad des *FGF14*-Gens durchgeführt werden. Dieser könnte *in vitro* analysiert werden, indem verschiedene NSCLC-Zelllinien einer

Behandlung mit dem Inhibitor der DNA-Methyltransferase 5-aza-2'-deoxycytidine ausgesetzt werden. Auch der genregulative Einfluss des FGF14-Proteins wurde nicht kausal nachgewiesen. Die RNA-Sequenzierung und die Signalweg-Analyse konnten lediglich einen Anhaltspunkt für eine mögliche Korrelation zwischen der *FGF14*-Expression und dem Tumorzelltranskriptom schaffen. Ob FGF14 tatsächlich eine Funktion bei der Genregulation zukommt, könnte mit Hilfe einer Chromatin-Immunoprecipitations-DNA-Sequenzierung untersucht werden. Würde eine solche Sequenzierung bestätigen, dass FGF14 an bestimmte Gene bindet, könnte folgend die Dynamik zwischen diesen Genen und FGF14 erforscht werden. Um den beobachteten Einfluss der *FGF14*-Expression auf das Tumorzellverhalten weitergehend zu testen, sollten weitere *In-Vitro*- und *In-Vivo*-Versuche durchgeführt werden. Während *in vitro* von Interesse sein könnte, ob die *FGF14*-Expression einen Einfluss auf die Apoptoserate, Chemoresistenz oder Invasivität von NSCLC-Zellen ausübt, könnten die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse mit Hilfe verschiedener *In-Vivo*-Lungentumor-Tiermodelle weiter verifiziert werden. Der dritte Hypothesenteil fußt lediglich auf den Daten der TCGA-LUAD-Kohorte. Um weitere Evidenz für diese Hypothese zu sammeln, sollte die *FGF14*-Expression bei weiteren humanen LUAD-Sequenzierungsdatensätzen untersucht werden.

7 Schlussfolgerungen für die Klinik

Würden die hier vorgeschlagenen weiterführenden Untersuchungen die neu aufgestellte Hypothese bestätigen, könnte *FGF14* im Zeitalter der personalisierten und digitalisierten Krebsmedizin Bedeutung als prognostischer oder therapeutischer Biomarker zukommen. Vorstellbar wäre beispielsweise, dass Computeralgorithmen, die nach der Sequenzierung eines Tumors automatisiert Auskunft über mögliche Behandlungsoptionen und Prognosen geben, die *FGF14*-Expression als Faktor berücksichtigen. Therapeutisch könnte untersucht werden, ob FGF14 in therapieinduzierte Resistenzmechanismen involviert ist oder ob es möglich ist, *FGF14* kontrollierende, übergeordnete Mechanismen zu inhibieren, um die Tumormalignität u.a. durch eine Erhöhung der *FGF14*-Expression zu reduzieren. Vielleicht könnten solche Ansätze in Zukunft dazu beitragen, die Therapie und Prognose von Lungenkrebspatienten langfristig zu verbessern.

8 Zusammenfassung

Für den Zeitraum 2016-2018 betrug die relative 5-Jahres-Überlebensrate Lungenkrebserkrankter in Deutschland bei Frauen 22% und bei Männern 17%. Lungenkarzinome werden in die zwei Hauptgruppen SCLC und NSCLC unterteilt. Als häufigste NSCLC-Subtypen treten die LUAD und die LUSC auf. Die weitere Unterteilung und Unterscheidung dieser Subtypen auf Grundlage molekularbiologischer Marker könnte Aufschluss über die Prognose und die Behandlungsoptionen eines Lungenkarzinoms geben. Als eine Gruppe von Proteinen, deren Expression in einer Vielzahl von Tumorentitäten verändert ist, sind die Proteine der *FGF*-Familie und ihre Signalkaskaden mit der Proliferation und dem Zellüberleben, sowie mit Prozessen der Angiogenese und Wundheilung assoziiert. Über die biologische Funktion von *FGF14* existieren bei Lungenkrebs bislang keine Studien. Durch die Analyse der TCGA-LUNG-, -LUSC- und -LUAD-Datensätze, der Gewebeproben von Tumorpatienten und NSCLC-Zelllinien, der Durchführung verschiedener Zellassays sowie einer RNA-Sequenzierung wurde erstmalig die folgende Hypothese untersucht: Eine Dysregulation der *FGF14*-Expression beeinflusst das Proliferations- und das Migrationsverhalten von NSCLC-Zellen. In einem ersten Schritt wurde festgestellt, dass die *FGF14*-Expression bei LUAD vermindert und bei NSCLC-Zelllinien dysreguliert war. Diese Verminderung korrelierte bei der TCGA-LUAD-Kohorte mit einem geringeren Gesamtüberleben. Die Überexpression von *FGF14* führte sowohl bei A549- als auch bei H838-Zellen zu einer reduzierten Migrations- und Proliferationskapazität *in vitro*. Eine siRNA-induzierte Reduktion der *FGF14*-Expression bei A549-FGF14oe- und H460-Zellen resultierte *in vitro* in einer erhöhten Migrations- und Proliferationskapazität. Die RNA-Sequenzierung der A549-LV- und A549-FGF14oe-Zellen ergab, dass sich die Transkriptome beider Zellklone signifikant voneinander unterschieden. Signalweg-Analyse-Algorithmen offenbarten unter den DEG eine Überrepräsentation von Genen der extrazellulären Matrix. Die Ergebnisse der Signalweganalyse-Algorithmen, die weiterführende Untersuchung der DEG *CCBE1*, *ADARB1*, *MUC16* und *COL11A1* bei LUAD sowie die Beobachtungen zum Zellverhalten führen zu der neuen Hypothese, dass FGF14 die Proliferations- und Migrationskapazität von Tumorzellen durch die Regulation bestimmter, u.a. zur EZM gehöriger Gene vermindert.

9 Summary

In Germany, the 5-year-survival-rate of lung cancer patients was estimated to be 22% for women and 17% for men. In order to improve lung cancer diagnostics and therapy for late stage lung cancer a better understanding of lung cancer biology is needed.

Lung cancers are divided in SCLC and NSCLC. LUAD and LUSC are the most commonly diagnosed NSCLC subtypes. Depending on the subtype's molecular profile, therapeutic options as well as outcomes may differ. Therefore, further investigation on the molecular dynamics of lung cancer is needed. The FGF-Family consists of proteins which's genes are often altered in various cancers being associated with proliferation, cell survival, angiogenesis and wound healing. About *FGF14* little is known in the context of lung cancer. This Study therefore aimed to investigate the role of *FGF14* in lung cancer. By analyzing TCGA data, tissue samples and NSCLC cells, by conducting *in-vitro*-assays and by RNA Sequencing the following hypothesis was investigated: A dysregulation of *FGF14* influences the proliferative and migratory behavior of NSCLC cells. First, the *FGF14* expression was found to be reduced in LUAD and dysregulated in NSCLC cell lines. A low *FGF14* expression correlated with a poor overall survival in the TCGA-LUAD cohort. *In-vitro*, a plasmid-based overexpression of *FGF14* reduced the proliferation and migration of A549 and H838 cells, whereas a reduction of *FGF14* expression by siRNA in *FGF14* high expressing A549-FGF14oe cells and H460 cells resulted in an increased proliferation and migration. Lastly, the RNA sequencing revealed a difference in the gene expression profile of A549-LV- and A549-FGF14oe-cells. Among DEG, Pathway analysis indicated that genes associated with the extracellular matrix were significantly enriched. Further, the investigation of Top50-DEG expression in LUAD and siRNA treated A549-FGF14oe cells revealed *CCBE1*, *ADARB1*, *MUC16* and *COL11A1* as potential FGF14 target genes. All observations taken together suggest that FGF14 reduces proliferation and migration of tumor cells by regulating gene expression.

10 Abkürzungsverzeichnis

+siFGF14	Gegen FGF14 gerichtete siRNA
+siNT	Kontroll-siRNA
±stddev	Standardabweichung
ANOVA	einfache Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CT	Cycle Threshold
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEG	Differentially Regulated Gene
DPBS	Phosphatgepufferten Salzlösung
DZL	Deutsches Zentrum für Lungenforschung
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial To Mesenchymal Transition
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGF14oe	FGF14-Plasmid
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FHF	Fibroblast Growth Factors Homologous Factors
HBEC	humanen Zellen des Bronchialepithels
HRP	Meerrettichperoxidase
ICC	Immunfluoreszenzzytochemie
log ₂ (FC)	Log2(fold change)
LUAD	Lungenadenokarzinom
LUSC	Lungenplattenepithelkarzinom
LV	Kontrollplasmid
MW	arithmetische Mittel
norm_count	RSEM normalisierte Werte
NSCLC	Nicht-Kleinzellige-Lungenkarzinome
ORA	Gene set over-representation analysis
padj	adjustierter p-Wert nach Benjamini-Hochberg
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	Small Interfering RNA
TBST	TRIS-gepufferter Saline mit Tween
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TEMED	Tetramethylethylendiamin
UCSC	University of California, Santa Cruz
UGMLC	Universities of Giessen and Marburg Lung Center
W/O	Zellmedium ohne Zusätze

11 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Anteil des Lungenkarzinoms an den Krebssterbefällen Deutschlands und der Welt. (A, B, C) Die Tortendiagramme zeigen den relativen Anteil der 5 Krebsentitäten mit den meisten Todesfällen an der Gesamtzahl der Krebstodesfälle in der Welt 2020 (A) und in Deutschland 2020 für weibliche (B) und männliche (C) Individuen aller Altersgruppen. Die den optisch angepassten Abbildungen zugrunde liegenden Daten wurden ¹¹ (A, B, C) entnommen. Die abgebildeten Werte wurden auf- oder abgerundet. 1
- Abbildung 2 Die Überlebensrate Lungenkrebserkrankter ist vom Krankheitsstadium bei der Erstdiagnose abhängig. (A) Die Tabelle zeigt die aktuell gültige 8. Auflage der TNM-Klassifikation und die korrespondierenden UICC-Stadien für Lungenkrebs. T = Tumorgroße. N = Lymphknoten 0 = keine, 1 = ipsilateral, peribronchial, 2 = ipsilateral mediastinal/subcarinal, 3 = kontralateral oder skalenar/supraclavikulär. M = Metastase, 0 = keine, 1a = kontralateral Lunge, 1b = eine extrathorakale, 1c = mehrere extrathorakale. (B) Das Balkendiagramm zeigt die Verteilung der UICC-Stadien (8.Auflage TNM) bei Erstdiagnose eines Lungenkarzinoms (ICD-10 C33-C34) aufgeteilt nach Geschlecht in Deutschland für den Zeitraum 2017-2018. (C) Das Balkendiagramm zeigt das relatives 5-Jahres-Überleben Lungenkrebserkrankter (ICD-10 C33-C34) aufgeteilt nach UICC-Stadium (7. Auflage TNM) und Geschlecht in Deutschland für den Zeitraum 2016-2018. (D) Das Kaplan-Meier-Diagramm zeigt die relativen Überlebensraten bis 10 Jahre nach Erstdiagnose eines Lungenkarzinoms (ICD-10 C33-C34) in Deutschland für den Zeitraum 2017-2018 aufgeteilt nach Geschlecht. Die den optisch angepassten Abbildungen zugrunde liegenden Daten wurden ³⁴ (A) und ⁵⁷ (B, C, D) entnommen. Die abgebildeten Werte wurden auf- oder abgerundet. 2
- Abbildung 3 Schematische Darstellung der Entstehung eines Lungenkarzinoms. (A) Eine Lungenepithelzelle (Respiratorisches Epithel oder Alveolarepithel), die über Jahre bis Jahrzehnte verschiedenen exogenen und endogenen Risikofaktoren ausgesetzt wird, erwirbt Driver-Mutationen, welche ihr einen Selektionsvorteil gegenüber den anderen Zellen ihres Zellverbandes gewähren. Bereits drei Driver-Mutationen können genügen, um die Zelle in eine Krebszelle zu transformieren. (B) Die Charakteristika eines malignen Tumors werden unter dem Begriff „Hallmarks of Cancer“ gesammelt. Die optische Darstellung der Hallmarks of Cancer orientiert sich an der Darstellung von Weinberg et al ¹⁵. 3
- Abbildung 4 Histologische und molekularbiologische Differenzierung des Lungenkarzinoms. Die Tortendiagramme zeigen die Verteilung bösartiger Neubildungen der Lunge nach histologischem Typ für weibliche (A) und männliche (B) Individuen in Deutschland 2017-2018. (C) Das Diagramm zeigt vereinfacht die häufigsten Driver-Mutationen bei NSCLC und ihre Signalkaskaden. Rot = inaktivierende Mutation (Tumorsuppressorgene), blau = aktivierende Mutation (Onkogene). Die Daten der optisch angepassten Abbildungen wurden ⁵⁷ entnommen (A, B). Die Abbildung (C) wurde nach ¹⁶ konzipiert. Die abgebildeten Werte wurden auf- oder abgerundet. 5
- Abbildung 5 Mögliche Funktionen des FGF14-Proteins. Von FGF14 wird angenommen, dass es als intrazelluläres Signalmolekül fungiert und nicht sezerniert wird. Es existieren zwei Isoformen. FGF14-a reichert sich im Zellkern an und könnte in der Lage sein, DNA zu binden. FGF14-b ist im Zytoplasma lokalisiert und interagiert mit spannungsabhängigen Ionenkanälen. Eigene Darstellung der Informationen aus ⁸⁵, ²⁹ und ⁴⁷. 9
- Abbildung 6 Die *FGF14*-Expression korrelierte mit dem Gesamtüberleben der TCGA-LUAD-Patientenkohorte. (A, D, G) Vergleich der *FGF14*-mRNA-Expression ($\log_2(\text{norm_count}+1)$) zwischen gesundem Nichttumorgewebe (NT) und Tumorgewebe (NSCLC, LUSC, LUAD) eines Patienten (n=57). (B, E, H) Überlebensanalyse in einer Kaplan-Meier-Kurve. Die Patienten wurden anhand des Medians der *FGF14*-Expression in zwei gleichgroße Gruppen eingeteilt (n=501). (C) Vergleich der *FGF14*-mRNA-Expression (ΔCT) zwischen 18 Tumormustern von LUAD-Patienten (LUAD) und 18 Proben von Nichttumorgewebe (NT). (F) Repräsentative immunhistochemische Färbungen des FGF14-Proteins auf Tumor- und Nichttumorgewebe von 3 LUAD-Patienten. Maßstableiste 50 μm . (I) Vergleich der *FGF14*-mRNA-Expression (ΔCT) von HBEC-Zellen mit LUAD-Zelllinien (A549, H1299, H838 und

H1650), LUSC-Zelllinien (H226 und H520), der Lungenkarzinomzelllinie A427 und der Groß-Zell-Karzinomzelllinie H460 (n=6). Die Daten in A, C, D, G, I werden mit ihrem Mittelwert und ihrer $\pm$ Standardabweichung abgebildet. In B, E, H werden die zensierten Datenpunkte abgebildet. Zur Statistik dienten in A, D, G abhängige T-Tests und in B, E, H Logrank-Tests. Zur Statistik in C diente ein Welch-Test und zur Statistik in I bei mehr als einer Versuchsgruppe eine One-way ANOVA. Bei einem p -Wert $< 0,05$ wurde die Differenz der Mittelwerte der Stichproben bzw. der Hazard-Funktionen als statistisch signifikant betrachtet. 37

Abbildung 7 Eine Überexpression von *FGF14* reduzierte die Proliferations- und Migrationskapazität in vitro. (A) Vergleich der *FGF14*-mRNA-Expression (Δ CT) zwischen LV-Zellen und FGF14oe-Zellen (n=9) für A549 und H838. (B) ICC der LV-Zellen und FGF14oe-Zellen für A549 und H838. FGF14 wurde durch den Sekundärantikörper AlexaFluor 488 in Grün sichtbar gemacht. Die DNA erscheint durch eine DAPI-Färbung blau. Maßstabsleiste 50 μ m (A549) 100 μ m (H838). (C) Quantifizierung der relativen Bandendichte FGF14/ACTB der Western-Blots für A549 und H838-Zellen (n=3). (D) Vergleich der FGF14-Proteinexpression zwischen LV-Zellen und FGF14oe-Zellen (n=3) für A549 und H838 mittels Western-Blot. Als Ladekontrolle diente ACTB. (E) Vergleich der relativ zur LV-Kontrollgruppe gemessenen BrdU-Inkorporation zwischen LV-Zellen und FGF14oe-Zellen für A549 (n=3) und H838 (n=3). (F) Vergleich der Anzahl der Kolonien zwischen LV-Zellen und FGF14oe-Zellen für A549 (n=6) und H838 (n=3). (G) Vergleich des nach 18 h geschlossenen Flächenanteils im Wundheilungs-Assay zwischen LV-Zellen und FGF14oe-Zellen für A549 (n=5) und H838 (n=3) und repräsentative Bilder nach 0 h und 18 h für A549 (H) und H838 (I). Maßstabsleiste 100 μ m. (J) Vergleich der relativ zur LV-Kontrollgruppe migrierten Zellen zwischen LV-Zellen und FGF14oe-Zellen für A549 (n=4) und H838 (n=3) und repräsentative Bilder für A549 nach 6 h (K) und H838 nach 16 h (L). Maßstabsleiste 100 μ m. Die Daten werden mit ihrem Mittelwert und ihrer $\pm$ Standardabweichung abgebildet. Zur Statistik diente ein Zweistichproben-T-Test. Bei einem p -Wert $< 0,05$ wurde die Differenz der Mittelwerte der Stichproben als statistisch signifikant betrachtet. 39

Abbildung 8 Eine Reduktion der *FGF14*-Expression erhöhte die Proliferations- und Migrationskapazität in vitro. (A) Vergleich der *FGF14*-mRNA-Expression (Δ CT) zwischen Zellen mit +siNT-Transfektion und +siFGF14-Transfektion für A549-FGF14oe- (n=7) und H460 (n=9). (B) ICC der Zellen mit +siNT-Transfektion und +siFGF14-Transfektion für A549-FGF14oe und H460. FGF14 wurde durch den Sekundärantikörper AlexaFluor 488 in Grün sichtbar gemacht. Die DNA erscheint durch eine DAPI-Färbung blau. Maßstabsleiste 50 μ m. (C) Quantifizierung der relativen Bandendichte FGF14/ACTB der Western-Blots für A549 FGF14oe- und H460-Zellen (n=3). (D) Vergleich der FGF14-Proteinexpression zwischen Zellen mit +siNT-Transfektion und +siFGF14-Transfektion (n=3) für A549-FGF14oe und H460 mittels Western-Blot. Als Ladekontrolle diente ACTB. (E) Vergleich der relativ zur +siNT-Kontrollgruppe gemessenen BrdU-Inkorporation zwischen Zellen mit +siNT-Transfektion und +siFGF14-Transfektion für A549-FGF14oe und H460-Zellen (n=3). (F) Vergleich der Anzahl der Kolonien zwischen Zellen mit +siNT-Transfektion und +siFGF14-Transfektion für A549-FGF14oe und H460 (n=3). (G) Vergleich der relativ zur +siNT-Kontrollgruppe migrierten Zellen zwischen Zellen mit +siNT-Transfektion und +siFGF14-Transfektion für A549-FGF14oe und H460-Zellen (n=3) und repräsentative Bilder für A549-FGF14oe nach 6 h (H) und H460 nach 24 h (I). Maßstabsleiste 100 μ m. Die Daten werden mit ihrem Mittelwert und ihrer $\pm$ Standardabweichung abgebildet. Zur Statistik diente ein Zweistichproben-T-Test. Bei einem p -Wert $< 0,05$ wurde die Differenz der Mittelwerte der Stichproben als statistisch signifikant betrachtet. 40

Abbildung 9 Die Überexpression von *FGF14* beeinflusste das Transkriptom von A549-Zellen. (A) Die Heatmap zeigt die 1070 DEG. Eine blaue Kontrastierung gibt einen negativen z-Wert, eine rote Kontrastierung einen positiven z-Wert an. (B) Der Volcano-Plot bildet die DEG anhand ihres logarithmisch transformierten relativen Regulationsunterschieds und ihres negativen dekadischen Logarithmus des adjustierten p-Wertes ($-\log(\text{padj})$) ab. Rot = hochreguliert, blau = herunterreguliert. (C) Das Venn-Diagramm zeigt die Anzahl der DEG. (D) Cytoscape-Netzwerk generiert mit Hilfe der EnrichmentMap. Das Netzwerk zeigt die von der ORA unter den DEG als signifikant überrepräsentiert befundenen Signalwege. Die Farbe der Knoten gibt Auskunft über den Regulationszustand der hauptsächlich enthaltenen DEG. Rot = hochreguliert, blau = herunterreguliert. Die Verbindungslinien zeigen

Überlappungen zwischen den Knoten an. Die Stärke der Verbindungslinie gibt Auskunft über die Anzahl sich überlappende Gene. Rot = hochreguliert, blau = herunterreguliert. Zur Statistik dient der exakte Test nach Fischer. Zur Beherrschung des Problems des multiplen Testens wurde zusätzlich die Benjamini-Hochberg-Prozedur angewendet. Bei einem p -Wert $< 0,05$ wird die Differenz der beobachteten Häufigkeit von der erwarteten Häufigkeit als statistisch signifikant betrachtet. 42

Abbildung 10 Die DEG *CCBE1*, *ADARB1*, *MUC16* und *COL11A1* waren bei der TCGA-LUAD-Kohorte dysreguliert. (A) Die Heatmap zeigt sortiert nach dem negativen dekadischen Logarithmus des adjustierten p -Wertes ($-\log(p_{adj})$) die 50 DEG mit dem größten Wert. Eine blaue Kontrastierung gibt einen negativen z -Wert, eine rote Kontrastierung einen positiven z -Wert an. (B-I) Untersuchung des TCGA-LUAD-Datensatzes auf die Expression von *CCBE1*, *ADARB1*, *MUC16* und *COL11A1*. (B, D, F, H) Vergleich der mRNA-Expression ($\log_2(\text{norm_count}+1)$) zwischen gesundem Nichttumorgewebe (NT) und Tumorgewebe (LUAD) eines Patienten ($n=57$) für *CCBE1* (B), *ADARB1* (D), *MUC16* (F), *COL11A1* (H). (C, E, G, I) Überlebensanalyse in einer Kaplan-Meier-Kurve. Die Patienten werden anhand des Medians der Expression von *CCBE1* (C), *ADARB1* (E), *MUC16* (G), *COL11A1* (I) in zwei gleichgroße Gruppen eingeteilt ($n=501$). Die Daten in B, D, F, H werden mit ihrem Mittelwert und ihrer $\pm$ Standardabweichung abgebildet. In C, E, G, I werden die zensierten Datenpunkte abgebildet. Zur Statistik dient in B, D, F, H ein abhängiger T-Test und in C, E, G, I ein Logrank-Test. Bei einem p -Wert $< 0,05$ wird die Differenz der Mittelwerte der Stichproben bzw. der Hazard-Funktionen als statistisch signifikant betrachtet. 44

Abbildung 11 Validierung der *CCBE1*-, *ADARB1*-, *MUC16*- und *COL11A1*-Expression bei LUAD und A549-Zellen. (A, B, C, D) Vergleich der mRNA-Expression (ΔCT) zwischen 18 Tumormustern von LUAD-Patienten (LUAD) und 18 Mustern von Nichttumorgewebe (NT) für *CCBE1* (A), *ADARB1* (B), *MUC16* (C), *COL11A1* (D). (E, F, G, H) Vergleich der mRNA-Expression (ΔCT) zwischen Zellen mit +siNT-Transfektion und +siFGF14-Transfektion für *CCBE1* (E), *ADARB1* (F), *MUC16* (G), *COL11A1* (H). Die Daten werden mit ihrem Mittelwert und ihrer $\pm$ Standardabweichung abgebildet. Zur Statistik dient in A, B, C, D ein Welch-Test und in E, F, G, H ein Zweistichproben-T-Test. Bei einem p -Wert $< 0,05$ wird die Differenz der Mittelwerte der Stichproben als statistisch signifikant betrachtet. 45

Abbildung 12 Reifephasen der EZM. Die Ausbildung einer EZM kann in drei Phasen unterteilt werden. Zuerst wird eine frühprovisorische Matrix aus Fibrinogen gebildet. Diese reift zur spätprovisorischen Matrix. Dabei wird das Fibrinogen durch Fibronectin ersetzt. Eine Fibronectinmatrix bildet ein Netzwerk, in welchem sich Wachstumsfaktoren und TGF- β anreichern können. Die ausgereifte Matrix setzt sich schließlich aus Kollagen- und Fibronectinfasern zusammen. Alle EZM-Komponenten sind über Integrine mit den sie umgebenden Zellen gekoppelt. Die Abbildung wurde einer Abbildung aus ⁹⁰ nachempfunden. 49

Abbildung 13 Hypothese über die Rolle der FGF14-Expression bei NSCLC-Zelllinien. (A) Eine Überexpression des *FGF14*-Gens führt zu einem stärkeren genregulativen Einfluss des FGF14-Proteins. Das dadurch veränderte Tumorzelltranskriptom reduziert die Proliferations- und Migrationskapazität der Tumorzellen. (B) Eine durch prä- oder posttranskriptionelle Prozesse induzierte Reduktion der *FGF14*-Expression führt zu einem geringeren genregulativen Einfluss des FGF14-Proteins. Die Dysregulation der von FGF14 regulierten Gene (z.B. Gene der EZM) steigert die Proliferations- und Migrationskapazität der Tumorzellen. Eigene Darstellung. 53

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Geräte.....	11
Tabelle 2 Software.....	12
Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien.....	12
Tabelle 4 Reagenzien	13
Tabelle 5 Zellkultur	14
Tabelle 6 Kits.....	14
Tabelle 7 TBST 20x.....	14
Tabelle 8 TBST 1x.....	15
Tabelle 9 Ladepuffer	15
Tabelle 10 Laufpuffer.....	15
Tabelle 11 Blottingpuffer	15
Tabelle 12 Transfektion mit FugeneHD	19
Tabelle 13 Verwendete Plasmide von ORIGENE	19
Tabelle 14 siRNA-Transfektion für 6-Well.....	20
Tabelle 15 siRNAs	20
Tabelle 16 Mastermix Reverse Transkription.....	24
Tabelle 17 Thermocycler-Programm Reverse Transkription	25
Tabelle 18 Mastermix qPCR	25
Tabelle 19 qPCR Primersequenzen	25
Tabelle 20 Lysierpuffer zur Proteinisolation	27
Tabelle 21 BCA-Assay Standards	28
Tabelle 22 Herstellung der SDS-PAGE-Proben.....	28
Tabelle 23 Komponenten eines 12%-SDS-Trenngels	29
Tabelle 24 Komponenten eines Sammelgels.....	29
Tabelle 25 Antikörper Western-Blot.....	31
Tabelle 26 Antikörper ICC.....	33
Tabelle 27 Antikörper Polymerfärbung	34

13 Literaturverzeichnis

1. Alders M, Hogan BM, Gjini E, et al. Mutations in CCBE1 cause generalized lymph vessel dysplasia in humans. *Nat Genet.* 2009;41(12):1272-1274. doi:10.1038/ng.484
2. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Glob Health.* 2019;85(1):8. doi:10.5334/aogh.2419
3. Barton CA, Gloss BS, Qu W, et al. Collagen and calcium-binding EGF domains 1 is frequently inactivated in ovarian cancer by aberrant promoter hypermethylation and modulates cell migration and survival. *Br J Cancer.* 2010;102(1):87-96. doi:10.1038/sj.bjc.6605429
4. Bhushan A, Singh A, Kapur S, et al. Identification and Validation of Fibroblast Growth Factor 12 Gene as a Novel Potential Biomarker in Esophageal Cancer Using Cancer Genomic Datasets. *OMICS J Integr Biol.* 2017;21(10):616-631. doi:10.1089/omi.2017.0116
5. Cancer Genome Atlas Research Network, Campbell JD, Alexandrov A, et al. Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nat Genet.* 2016;48(6):607-616. doi:10.1038/ng.3564
6. Cao Y, Jiang F, Zhang S, Yang L, Sun Y. MEX3C promotes osteosarcoma malignant progression through negatively regulating FGF14. *JBUON.* 2020;25(3):1554-1561.
7. Cenci C, Barzotti R, Galeano F, et al. Down-regulation of RNA Editing in Pediatric Astrocytomas: *ADAR2 EDITING ACTIVITY INHIBITS CELL MIGRATION AND PROLIFERATION.* *J Biol Chem.* 2008;283(11):7251-7260. doi:10.1074/jbc.M708316200
8. De Matteis S, Consonni D, Lubin JH, et al. Impact of occupational carcinogens on lung cancer risk in a general population. *Int J Epidemiol.* 2012;41(3):711-721. doi:10.1093/ije/dys042
9. de Sousa VML, Carvalho L. Heterogeneity in Lung Cancer. *Pathobiology.* 2018;85(1-2):96-107. doi:10.1159/000487440
10. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(2):69-84. doi:10.1038/s41580-018-0080-4
11. Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Published March 23, 2022. <https://gco.iarc.fr/today>
12. Goldfarb M, Schoorlemmer J, Williams A, et al. Fibroblast Growth Factor Homologous Factors Control Neuronal Excitability through Modulation of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron.* 2007;55(3):449-463. doi:10.1016/j.neuron.2007.07.006
13. Goldman MJ, Craft B, Hastie M, et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat Biotechnol.* 2020;38(6):675-678. doi:10.1038/s41587-020-0546-8
14. Gu S, Luo J, Yao W, et al. The regulation of miR-139-5p on the biological characteristics of breast cancer cells by targeting COL11A1. *Math Biosci Eng.* 2020;17(2):1428-1441. doi:10.3934/mbe.2020073
15. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

16. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 2018;553(7689):446-454. doi:10.1038/nature25183
17. Ho J, Tumkaya T, Aryal S, Choi H, Claridge-Chang A. Moving beyond P values: data analysis with estimation graphics. *Nat Methods*. 2019;16(7):565-566. doi:10.1038/s41592-019-0470-3
18. Hogan BM, Bos FL, Bussmann J, et al. ccbe1 is required for embryonic lymphangiogenesis and venous sprouting. *Nat Genet*. 2009;41(4):396-398. doi:10.1038/ng.321
19. Hollern DP, Swiatnicki MR, Rennhack JP, et al. E2F1 Drives Breast Cancer Metastasis by Regulating the Target Gene FGF13 and Altering Cell Migration. *Sci Rep*. 2019;9(1):10718. doi:10.1038/s41598-019-47218-0
20. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(1):45-60. doi:10.1038/nrc1251
21. Hyde L, Hyde CI. Clinical Manifestations of Lung Cancer. *Chest*. 1974;65(3):299-306. doi:10.1378/chest.65.3.299
22. Jafari M, Ansari-Pour N. Why, When and How to Adjust Your P Values? *Cell J Yakhteh*. 2018;20(04). doi:10.22074/cellj.2019.5992
23. Jassal B, Matthews L, Viteri G, et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. Published online November 6, 2019:gkz1031. doi:10.1093/nar/gkz1031
24. Jin Y, Zhang M, Duan R, et al. Long noncoding RNA FGF14-AS2 inhibits breast cancer metastasis by regulating the miR-370-3p/FGF14 axis. *Cell Death Discov*. 2020;6(1):103. doi:10.1038/s41420-020-00334-7
25. Kanwal M, Ding XJ, Song X, Zhou GB, Cao Y. MUC16 overexpression induced by gene mutations promotes lung cancer cell growth and invasion. *Oncotarget*. 2018;9(15):12226-12239. doi:10.18632/oncotarget.24203
26. Kraywinkel K, Schönfeld I. Epidemiologie des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms in Deutschland. *Onkol*. 2018;24(12):946-951. doi:10.1007/s00761-018-0480-2
27. Kucera M, Isserlin R, Arkhangorodsky A, Bader GD. AutoAnnotate: A Cytoscape app for summarizing networks with semantic annotations. *F1000Research*. 2016;5:1717. doi:10.12688/f1000research.9090.1
28. Kui Wong N, Easton RL, Panico M, et al. Characterization of the Oligosaccharides Associated with the Human Ovarian Tumor Marker CA125. *J Biol Chem*. 2003;278(31):28619-28634. doi:10.1074/jbc.M302741200
29. Laezza F, Lampert A, Kozel MA, et al. FGF14 N-terminal splice variants differentially modulate Nav1.2 and Nav1.6-encoded sodium channels. *Mol Cell Neurosci*. 2009;42(2):90-101. doi:10.1016/j.mcn.2009.05.007
30. Li A, Li J, Lin J, Zhuo W, Si J. COL11A1 is overexpressed in gastric cancer tissues and regulates proliferation, migration and invasion of HGC-27 gastric cancer cells in vitro. *Oncol Rep*. 2017;37(1):333-340. doi:10.3892/or.2016.5276
31. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. Published online 2011:16.
32. Li P, Cong Z, Qiang Y, et al. Clinical significance of CCBE1 expression in lung cancer. *Mol Med Rep*. Published online November 29, 2017. doi:10.3892/mmr.2017.8187

33. Liang C, Qin Y, Zhang B, et al. Oncogenic KRAS Targets MUC16/CA125 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mol Cancer Res*. 2017;15(2):201-212. doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0296
34. Lim W, Ridge CA, Nicholson AG, Mirsadraee S. The 8th lung cancer TNM classification and clinical staging system: review of the changes and clinical implications. *Quant Imaging Med Surg*. 2018;8(7):709-718. doi:10.21037/qims.2018.08.02
35. Liu J, Lichtenberg T, Hoadley KA, et al. An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics. *Cell*. 2018;173(2):400-416.e11. doi:10.1016/j.cell.2018.02.052
36. Liu MY, Zhang H, Hu YJ, Chen YW, Zhao XN. Identification of key genes associated with cervical cancer by comprehensive analysis of transcriptome microarray and methylation microarray. *Oncol Lett*. 2016;12(1):473-478. doi:10.3892/ol.2016.4658
37. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*. 2012;196(4):395-406. doi:10.1083/jcb.201102147
38. Markowitz SB, Levin SM, Miller A, Morabia A. Asbestos, Asbestosis, Smoking, and Lung Cancer. New Findings from the North American Insulator Cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(1):90-96. doi:10.1164/rccm.201302-0257OC
39. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer*. 2005;93(7):825-833. doi:10.1038/sj.bjc.6602769
40. Merico D, Isserlin R, Stueker O, Emili A, Bader GD. Enrichment Map: A Network-Based Method for Gene-Set Enrichment Visualization and Interpretation. Ravasi T, ed. *PLoS ONE*. 2010;5(11):e13984. doi:10.1371/journal.pone.0013984
41. Mesci A, Huang X, Taeb S, et al. Targeting of CCBE1 by miR-330-3p in human breast cancer promotes metastasis. *Br J Cancer*. 2017;116(10):1350-1357. doi:10.1038/bjc.2017.105
42. Morgensztern D, Ng SH, Gao F, Govindan R. Trends in Stage Distribution for Patients with Non-small Cell Lung Cancer: A National Cancer Database Survey. *J Thorac Oncol*. 2010;5(1):29-33. doi:10.1097/JTO.0b013e3181c5920c
43. Olsen SK, Garbi M, Zampieri N, et al. Fibroblast Growth Factor (FGF) Homologous Factors Share Structural but Not Functional Homology with FGFs. *J Biol Chem*. 2003;278(36):34226-34236. doi:10.1074/jbc.M303183200
44. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2015;4(3):215-266. doi:10.1002/wdev.176
45. Paz N, Levanon EY, Amariglio N, et al. Altered adenosine-to-inosine RNA editing in human cancer. *Genome Res*. 2007;17(11):1586-1595. doi:10.1101/gr.6493107
46. Paz-Ares L, Tan EH, O'Byrne K, et al. Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: overall survival data from the phase IIb LUX-Lung 7 trial. *Ann Oncol*. 2017;28(2):270-277. doi:10.1093/annonc/mdw611
47. Peled S, Leiderman O, Charar R, Efroni G, Shav-Tal Y, Ofra Y. De-novo protein function prediction using DNA binding and RNA binding proteins as a test case. *Nat Commun*. 2016;7(1):13424. doi:10.1038/ncomms13424
48. Popper HH, Ryska A, Tímár J, Olszewski W. Molecular testing in lung cancer in the era of precision medicine. *Transl Lung Cancer Res*. 2014;3(5):10.

49. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol.* 2013;14(9):813-822. doi:10.1016/S1470-2045(13)70279-1
50. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Hvidberg M, et al. Lung Cancer Incidence and Long-Term Exposure to Air Pollution from Traffic. *Environ Health Perspect.* 2011;119(6):860-865. doi:10.1289/ehp.1002353
51. Raglow Z, Thomas SM. Tumor matrix protein collagen XI α 1 in cancer. *Cancer Lett.* 2015;357(2):448-453. doi:10.1016/j.canlet.2014.12.011
52. Raja A, Malik MFA, Haq F. Genomic relevance of FGF14 and associated genes on the prognosis of pancreatic cancer. Rishi A, ed. *PLOS ONE.* 2021;16(6):e0252344. doi:10.1371/journal.pone.0252344
53. Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, et al. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W191-W198. doi:10.1093/nar/gkz369
54. Reck M, Rabe KF. Precision Diagnosis and Treatment for Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. Longo DL, ed. *N Engl J Med.* 2017;377(9):849-861. doi:10.1056/NEJMra1703413
55. Reimand J, Isserlin R, Voisin V, et al. Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. *Nat Protoc.* 2019;14(2):482-517. doi:10.1038/s41596-018-0103-9
56. Reinartz S, Failer S, Schuell T, Wagner U. CA125 (MUC16) gene silencing suppresses growth properties of ovarian and breast cancer cells. *Eur J Cancer.* 2012;48(10):1558-1569. doi:10.1016/j.ejca.2011.07.004
57. Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 2021;(13):172.
58. Rotow J, Bivona TG. Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(11):637-658. doi:10.1038/nrc.2017.84
59. Schoorlemmer J, Goldfarb M. Fibroblast Growth Factor Homologous Factors and the Islet Brain-2 Scaffold Protein Regulate Activation of a Stress-activated Protein Kinase. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49111-49119. doi:10.1074/jbc.M205520200
60. Schoorlemmer J, Goldfarb M. Fibroblast growth factor homologous factors are intracellular signaling proteins. *Curr Biol.* 2001;11(10):793-797. doi:10.1016/S0960-9822(01)00232-9
61. Semrad TJ, Mack PC. Fibroblast Growth Factor Signaling in Non–Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer.* 2012;13(2):90-95. doi:10.1016/j.clcc.2011.08.001
62. Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498-2504. doi:10.1101/gr.1239303
63. Shen L, Yang M, Lin Q, Zhang Z, Zhu B, Miao C. COL11A1 is overexpressed in recurrent non-small cell lung cancer and promotes cell proliferation, migration, invasion and drug resistance. *Oncol Rep.* 2016;36(2):877-885. doi:10.3892/or.2016.4869
64. Smallwood PM, Munoz-Sanjuan I, Tong P, et al. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93(18):9850-9857. doi:10.1073/pnas.93.18.9850

65. Sölétormos G, Duffy MJ, Othman Abu Hassan S, et al. Clinical Use of Cancer Biomarkers in Epithelial Ovarian Cancer: Updated Guidelines From the European Group on Tumor Markers. *Int J Gynecol Cancer*. 2016;26(1):43-51. doi:10.1097/IGC.0000000000000586
66. Song J, Chen W, Cui X, et al. CCBE1 promotes tumor lymphangiogenesis and is negatively regulated by TGF β signaling in colorectal cancer. *Theranostics*. 2020;10(5):2327-2341. doi:10.7150/thno.39740
67. Su T, Huang L, Zhang N, et al. FGF14 Functions as a Tumor Suppressor through Inhibiting PI3K/AKT/mTOR Pathway in Colorectal Cancer. *J Cancer*. 2020;11(4):819-825. doi:10.7150/jca.36316
68. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
69. van Swieten JC, Brusse E, de Graaf BM, et al. A Mutation in the Fibroblast Growth Factor 14 Gene Is Associated with Autosomal Dominant Cerebral Ataxia. *Am J Hum Genet*. 2003;72(1):191-199. doi:10.1086/345488
70. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 2012;489(7417):519-525. doi:10.1038/nature11404
71. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511(7511):543-550. doi:10.1038/nature13385
72. The Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP) and Network Genomic Medicine (NGM). A Genomics-Based Classification of Human Lung Tumors. *Sci Transl Med*. 2013;5(209):209ra153-209ra153. doi:10.1126/scitranslmed.3006802
73. The Royal College of Physicians of London. Smoking and Health: Summary of a Report of The Royal College of Physicians of London on Smoking in relation to Cancer of the Lung and Other Diseases. *PITMAN Med Publ CO LTD*. Published online 1962.
74. Tomasetti C, Marchionni L, Nowak MA, Parmigiani G, Vogelstein B. Only three driver gene mutations are required for the development of lung and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(1):118-123. doi:10.1073/pnas.1421839112
75. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1243-1260. doi:10.1097/JTO.0000000000000630
76. Turkowski K, Herzberg F, Günther S, et al. Fibroblast Growth Factor—14 Acts as Tumor Suppressor in Lung Adenocarcinomas. *Cells*. 2020;9(8):1755. doi:10.3390/cells9081755
77. Turner MC, Chen Y, Krewski D, Calle EE, Thun MJ. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Is Associated with Lung Cancer Mortality in a Prospective Study of Never Smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(3):285-290. doi:10.1164/rccm.200612-1792OC
78. Turner MC, Krewski D, Chen Y, Pope CA, Gapstur S, Thun MJ. Radon and Lung Cancer in the American Cancer Society Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(3):438-448. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-1153
79. Vineis P, Airoidi L, Veglia F, et al. Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *BMJ*. 2005;330(7486):277. doi:10.1136/bmj.38327.648472.82

80. Vogelstein B, Kinzler KW. The Path to Cancer — Three Strikes and You're Out. *N Engl J Med*. 2015;373(20):1895-1898. doi:10.1056/NEJMp1508811
81. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-1558. doi:10.1126/science.1235122
82. Waclaw B, Bozic I, Pittman ME, Hruban RH, Vogelstein B, Nowak MA. A spatial model predicts that dispersal and cell turnover limit intratumour heterogeneity. *Nature*. 2015;525(7568):261-264. doi:10.1038/nature14971
83. Wang J, Liu X, Sun B, Du W, Zheng Y, Sun Y. Upregulated miR-154 promotes ECM degradation in intervertebral disc degeneration. *J Cell Biochem*. 2019;120(7):11900-11907. doi:10.1002/jcb.28471
84. Wang Q, Bardgett ME, Wong M, et al. Ataxia and Paroxysmal Dyskinesia in Mice Lacking Axonally Transported FGF14. *Neuron*. 2002;35(1):25-38. doi:10.1016/S0896-6273(02)00744-4
85. Wang Q, McEwen DG, Ornitz DM. Subcellular and developmental expression of alternatively spliced forms of Fibroblast growth factor 14. *Mech Dev*. Published online 2000:5.
86. Wang X, Xu Z, Ren X, et al. Function of low ADARB1 expression in lung adenocarcinoma. Guo NL, ed. *PLOS ONE*. 2019;14(9):e0222298. doi:10.1371/journal.pone.0222298
87. Winkler J, Abisoye-Ogunniyan A, Metcalf KJ, Werb Z. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nat Commun*. 2020;11(1):5120. doi:10.1038/s41467-020-18794-x
88. Wu Y, Huang Y, Chang T, Chou C. Activation of TWIST1 by COL11A1 promotes chemoresistance and inhibits apoptosis in ovarian cancer cells by modulating NF- κ B-mediated IKK β expression. *Int J Cancer*. 2017;141(11):2305-2317. doi:10.1002/ijc.30932
89. Wu YH, Chang TH, Huang YF, Huang HD, Chou CY. COL11A1 promotes tumor progression and predicts poor clinical outcome in ovarian cancer. *Oncogene*. 2014;33(26):3432-3440. doi:10.1038/onc.2013.307
90. Yamauchi M, Barker TH, Gibbons DL, Kurie JM. The fibrotic tumor stroma. *J Clin Invest*. 2018;128(1):16-25. doi:10.1172/JCI93554
91. Yang H, Wu J, Zhang J, et al. Integrated bioinformatics analysis of key genes involved in progress of colon cancer. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(4):e00588. doi:10.1002/mgg3.588
92. Yin BWT, Lloyd KO. Molecular Cloning of the CA125 Ovarian Cancer Antigen: IDENTIFICATION AS A NEW MUCIN, MUC16. *J Biol Chem*. 2001;276(29):27371-27375. doi:10.1074/jbc.M103554200
93. Zhang P, He Q, Lei Y, et al. m6A-mediated ZNF750 repression facilitates nasopharyngeal carcinoma progression. *Cell Death Dis*. 2018;9(12):1169. doi:10.1038/s41419-018-1224-3
94. Zhang X, Bao L, Yang L, Wu Q, Li S. Roles of intracellular fibroblast growth factors in neural development and functions. *Sci China Life Sci*. 2012;55(12):1038-1044. doi:10.1007/s11427-012-4412-x
95. Zhao YR, Liu H, Xiao LM, Jin CG, Zhang ZP, Yang CG. The clinical significance of CCBE1 expression in human colorectal cancer. *Cancer Manag Res*. 2018;Volume 10:6581-6590. doi:10.2147/CMAR.S181770

14 Publikationsverzeichnis

Die im Ergebnis-Abschnitt präsentierten Daten wurden teilweise bereits veröffentlicht:

Turkowski K, **Herzberg F**, Günther S, Brunn D, Weigert A, Meister M, Muley T, Kriegsmann M, Schneider MA, Winter H, Thomas M, Grimminger F, Seeger W, Savai Pullamsetti S, Savai R. Fibroblast Growth Factor-14 Acts as Tumor Suppressor in Lung Adenocarcinomas. *Cells*. 2020 Jul 22;9(8):1755. doi: 10.3390/cells9081755. PMID: 32707902; PMCID: PMC7466013.

15 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

16 Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich auf dem Weg zur Vollendung dieser Arbeit begleitet haben.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Rajkumar Savai für die Möglichkeit danken, meine Dissertation in seinem Labor anzufertigen. Ohne sein Vertrauen in meine Fähigkeiten wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Meiner Betreuerin Frau Dr. Kati Turkowski danke ich in ganz besonderem Maße für die hervorragende Betreuung und ihre stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Ihre Unterstützung hat im Wesentlichen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Der gesamten AG Savai möchte ich für die produktive und kollaborative Arbeitsatmosphäre danken.

Dem Fachbereich Medizin danke ich für die finanzielle und ideelle Förderung meiner Dissertation im Rahmen des JLU-TRAINEE-Programms.

Ein großer Dank gilt auch meinen Freunden. Ihr habt die letzten sieben Jahre in Gießen unvergesslich gemacht.

Zuletzt möchte ich Lotte, meiner Schwester, meinen Eltern und meinen Großeltern für ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung danken. Ich bin so dankbar, dass ihr immer für mich da seid.