

Pharmakologische Hemmung der Smad-abhängigen  
TGF- $\beta$ -Signaltransduktion  
in metastasierten Lungenkarzinomzellen

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

vorgelegt von Pirzad, Zahra  
aus Hamburg

Gießen 2024

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Medizinische Klinik und Poliklinik IV -  
Innere Medizin, Professur für Molekulare Onkologie solider Tumore

Gutachter: Prof. Dr. Andre Menke

Gutachterin: Prof. Dr. Veronika Grau

Tag der Disputation: 22.10.2024

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Lungenkarzinom.....	1
1.1.1	Therapie des Lungenkarzinoms .....	2
1.2	Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ (TGF- $\beta$ ).....	4
1.2.1	TGF- $\beta$ -Signalweg.....	5
1.2.2	Die Rolle von TGF- $\beta$ 1 in der Kanzerogenese.....	8
1.3	Epitheliale-mesenchymale Transition.....	9
1.4	Zielsetzung .....	11
2	Material und Methoden .....	12
2.1	Material .....	12
2.1.1	Humane Zelllinien.....	12
2.1.2	Plasmide .....	12
2.1.3	Primär-Antikörper .....	12
2.1.4	Sekundär-Antikörper.....	13
2.1.5	Zellbiologische und molekularbiologische Kits.....	14
2.1.6	Marker .....	14
2.1.7	Chemikalien .....	14
2.1.8	Gebrauchswaren .....	16
2.1.9	Geräte .....	16
2.1.10	Software .....	17
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	Zellkultur.....	18
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	23
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	28
3	Ergebnis.....	30
3.1	TGF- $\beta$ 1 beeinflusst die EMT in A549-Zellen.....	30
3.1.1	TGF- $\beta$ 1-abhängige Phosphorylierung von Smad2.....	30
3.1.2	TGF- $\beta$ 1-induzierte Umverteilung von E-Cadherin.....	33
3.1.3	TGF- $\beta$ 1 verändert die Proteinmenge von Vimentin.....	37
3.1.4	Immuncytochemische Analyse von weiteren EMT-Markerproteinen.....	41
3.2	Analyse diverser EMT-Markerproteine in transfizierten A549-Zellen.....	42
3.3	TGF- $\beta$ 1-induzierte Migration von A549-Zellen .....	45
4	Diskussion .....	48
4.1	TGF- $\beta$ 1-induzierter Einfluss auf A549-Zellen.....	49
4.1.1	Einfluss auf Smad2/3 .....	49
4.1.2	Umverteilung von EMT-Markern .....	51

4.1.3	Migrationsfähigkeit von A549-Zellen.....	55
4.2	Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die EMT in A549-Zellen .....	56
4.3	Ausblick .....	58
5	Zusammenfassung.....	61
6	Abstract .....	62
	Abkürzungsverzeichnis .....	63
	Literaturverzeichnis.....	65
	Anhang .....	74
	Ehrenwörtliche Erklärung .....	75
	Danksagung.....	76
	Tabellarischer Lebenslauf .....	77

# 1 Einleitung

## 1.1 Lungenkarzinom

Maligne Neoplasien der Lunge bzw. der Bronchien und Bronchiolen gehören weltweit zu den häufigsten Krebstodesursachen<sup>118</sup>. Den größten Risikofaktor bei der Entstehung von Lungenkarzinomen stellt v.a. die Menge und Dauer des Zigarettenkonsums dar<sup>6</sup>.

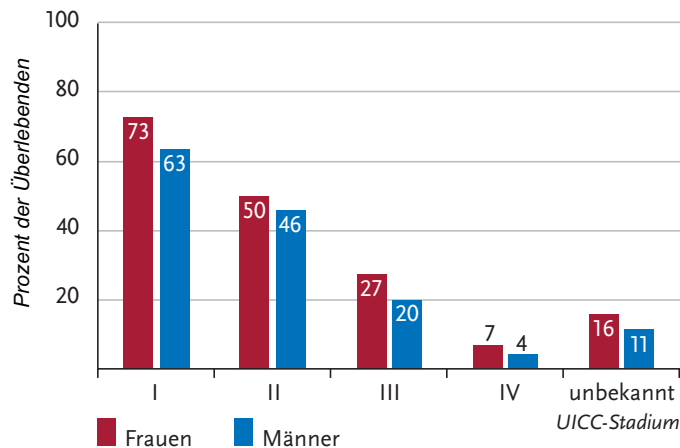
Häufig werden Lungenkarzinome erst bei fortgeschrittenem Tumorwachstum symptomatisch, weshalb sie generell eher spät diagnostiziert werden. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung haben sich bereits häufig Metastasen in anderen Geweben bzw. Teilen des Körpers gebildet<sup>36</sup>.

Anhand der Histomorphologie und Immunhistochemie können Lungenkarzinome in zwei größere Subgruppen unterteilt werden. Hierbei wird zwischen dem kleinzelligen (SCLC) und dem nicht-kleinzelligen (NSCLC) Lungenkarzinom unterschieden<sup>39</sup>.

SCLC zählen zu den neuroendokrinen Tumoren und stellen ca. 15 % der diagnostizierten Lungenkarzinome dar<sup>39</sup>. Im Vergleich zum NSCLC weisen SCLC meistens eine höhere Zellteilungsrate auf, weshalb sie zugänglicher für eine Chemotherapie sind<sup>49</sup>. Diese hohe Zellteilungsrate führt jedoch auch zu einer schnelleren und höheren Metastasierungsrate und bedingt eine schlechtere Prognose des SCLC im Vergleich zum NSCLC<sup>36</sup>.

NSCLC machen den größten Anteil an Lungenkarzinomen aus. Sie werden in Plattenepithel-, großzellige Lungen- und Adenokarzinome eingeteilt<sup>36</sup>. Aufgrund ihres vergleichsweise eher langsamen Wachstums sind sie oft weniger sensitiv gegenüber einer Chemotherapie, weshalb eine chirurgische Resektion häufig die primäre Therapie darstellt<sup>28</sup>.

Die Prognose und Heilungsaussichten von Lungenkarzinomen sind stark vom Zeitpunkt der Diagnosestellung, dem Differenzierungsgrad, dem Stadium der Tumorerkrankung und dessen Ausdehnung abhängig<sup>6</sup>. Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate von Lungenkarzinompatienten und -patientinnen in Deutschland betrug zwischen den Jahren 2017 und 2018 etwa 17 % bei Männern und etwa 22 % bei Frauen<sup>8</sup>. Sie kann in Abbildung 1 nachvollzogen werden.



**Abbildung 1: Relatives 5-Jahres-Überleben nach UICC-Stadium und Geschlecht (2016-2018)**

Der Prozentsatz der überlebenden Patienten und Patientinnen fünf Jahre nach der Diagnosestellung eines Lungenkarzinoms in Abhängigkeit des zu diesem Zeitpunkt bestehenden Tumorstadiums ist dargestellt. Hierbei wird der Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Tumorstadium und der Überlebensrate deutlich. Je fortgeschrittener der Tumor war, desto geringer fiel das 5-Jahres-Überleben aus.

Diese Abbildung wurde angepasst und mit Genehmigung des Robert-Koch-Instituts (RKI) übernommen<sup>8</sup>.

### 1.1.1 Therapie des Lungenkarzinoms

Die Therapie des NSCLC und SCLC hängt v.a. vom jeweiligen Stadium des Tumors ab<sup>28</sup>.

Im Folgenden wird die Therapie des NSCLC und SCLC zusammengefasst nach der S3 Leitlinie „Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms“ der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und der Deutschen Krebsgesellschaft aus dem Jahr 2023 wiedergegeben<sup>67</sup>.

Beim NSCLC wird bis einschließlich Stadium II ein kurativer Therapieansatz verfolgt, welcher eine operative Resektion und ggf. eine (neo-)adjuvante Systemtherapie vorsieht. Bei lokal begrenzten und nicht operablen Tumoren kommt eine stereotaktische Bestrahlung zum Einsatz.

Für das Stadium III besteht prinzipiell ein kurativer Therapieansatz, jedoch umfasst dieses Stadium eine sehr diverse Patientengruppe. Je nach Unterstadium besteht die Therapie aus einer Strahlen- und Kombinationschemotherapie, neoadjuvanten Radiochemotherapie oder einer Induktionschemotherapie. Bei Umsetzung einer Induktionschemotherapie wird im Anschluss eine Bestrahlung durchgeführt. Gegebenenfalls kommt ebenfalls eine Operation in Betracht. Im Stadium IV wird häufig ein nicht-kurativer Therapieansatz verfolgt. Jedoch kann bei solitären Nebennieren-, ZNS-, Lungen-, Leber- oder Knochenmetastasen trotz eines höheren Stadiums eine kurative Behandlung in Erwägung gezogen werden.

Im Stadium IVB können zielgerichtete Arzneimittel eingesetzt werden, sollten spezifische genetische Marker bzw. Treibermutationen in den Tumorzellen vorhanden sein (siehe Kapitel 1.1.1.2).

Die Therapieempfehlungen des SCLC erfolgt auf Basis der Stadieneinteilung nach „*Very Limited Disease*“ „*Limited Disease*“ und „*Extensive Disease*“. Im ersten Stadium erfolgt eine Operation mit adjuvanter Chemotherapie. In den fortgeschritteneren Stadien wird häufig auf eine OP verzichtet und ausschließlich chemo- bzw. kombiniert radio- oder immuntherapeutisch behandelt.

### **1.1.1.2 Zielgerichtete Therapie (*targeted therapy*) des Lungenkarzinoms**

Eine Möglichkeit zur Bereitstellung effektiver Therapien für Patientengruppen mit einem fortgeschrittenen NSCLC-Stadium besteht in der Entwicklung zielgerichteter Arzneimitteltherapien, die in onkogene Treibermutationen sowie in die Immunregulation eingreifen.

Im Gegensatz zu einer Chemotherapie, welche die Teilung von sich schnell teilenden Zellen – unabhängig ihrer Malignität – hemmt, wirken zielgerichtete Therapien auf spezifische Zielproteine in Tumorzellen<sup>119,41</sup>. Eine zielgerichtete Therapie kann mit bereits etablierten Therapiemethoden, wie der Chemo-, Radio- oder Immuntherapie kombiniert werden<sup>67</sup>.

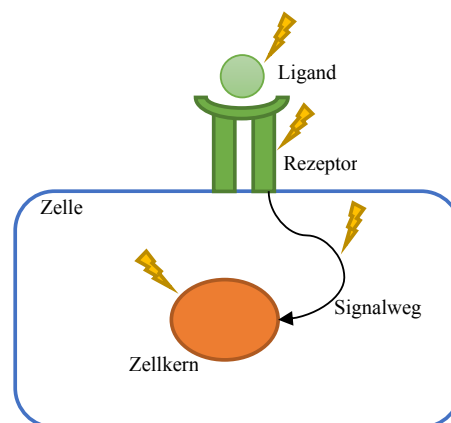
Für den möglichen Einsatz dieser Arzneimittel werden alle NSCLC unabhängig ihres Subtyps bereits ab dem Stadium IB molekularpathologisch auf therapierrelevante Mutationen untersucht<sup>67</sup>, zu denen (mit entsprechendem relativen Vorkommen) u.a. KRAS (21-33 %), der EGF-Rezeptor (14-17 %), HER2 (2 %), RET-Fusionen (2 %), ROS1-Fusionen (1-2 %), ALK-Fusionen (1-2 %), BRAF (1-10 %) und MET Exon 14 Alterationen (2-7 %) zählen<sup>122,107</sup>.

KRAS-Mutationen können bei einem Großteil von Lungenkarzinomen detektiert werden, jedoch ist deren pharmakologische Blockade aufgrund von fehlenden potentiellen Bindungsstellen erschwert<sup>108</sup>. Im Gegensatz hierzu können bei diversen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen häufig Mutationen gefunden werden, welche potentielle molekulare Angriffspunkte im Rahmen der zielgerichteten Therapie darstellen können<sup>114</sup>. Patienten und Patientinnen, welche Mutationen dieser Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aufweisen, werden bereits mit Tyrosin-Kinase-Inhibitoren behandelt, zu denen u.a. Afatinib, Erlotinib und Gefitinib gehören<sup>67</sup>. Bei EGF-Rezeptormutationen kommt z.B. Osimertinib in Betracht. Insgesamt können diese Inhibitoren an den Rezeptor binden und so

Signaltransduktionswege blockieren, welche zu einer unkontrollierten Zellproliferation beitragen<sup>22,92</sup>.

Ab dem Stadium II des NSCLC wird zudem der PD-L1-Status bei allen Patienten und Patientinnen immunhistochemisch erhoben, da eine Korrelation zwischen der PD-L1-Expression und dem Ansprechen gegenüber entsprechend gerichteter monoklonaler Antikörper gefunden werden konnte<sup>113,112</sup>.

PD-1 (*programmed cell death protein 1*) ist ein Zelloberflächenrezeptor, der auf Lymphozyten und Monozyten vorkommt und u.a. an den PD-Liganden 1 (PD-L1) auf antigenpräsentierenden Zellen bindet<sup>23</sup>. Hierdurch wird die T-Zell-Antwort abgeschwächt. NSCLC-Zellen machen sich diesen Mechanismus zunutze, indem sie PD-L1 an ihrer Zelloberfläche exprimieren und so die Immunantwort schwächen<sup>115</sup>. Wenn eine PD-L1-Expression von mindestens 50 % in den Zellen vorliegt, sollte Nivolumab und Ipilimumab<sup>101</sup> oder Pembrolizumab ggf. in Kombination mit einer Chemotherapie<sup>106</sup> nach den Leitlinien von 2023 verordnet werden<sup>67</sup>.



### **Abbildung 2: Schematische Darstellung möglicher Angriffspunkte zielgerichteter Therapien**

Dargestellt ist eine schematische Zelle. Die Blitze zeigen mögliche Angriffspunkte für eine zielgerichtete Arzneimitteltherapie an. Diese können an Liganden, Rezeptoren, Signalwegen oder im Zellkern der Zelle wirken. Hierdurch kann die Weiterleitung tumorfördernder Signale blockiert werden.

## **1.2 Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

TGF- $\beta$  wird gemeinsam mit weiteren zellregulatorischen Proteinen zu der TGF- $\beta$ -Superfamilie zusammengefasst, die wiederum in unterschiedliche Unterfamilien eingeteilt wird. Zu denen zählen u.a. die TGF- $\beta$ -Familie (TGF- $\beta$ 1, 2 und 3), die BMPs (*bone morphogenic proteins*) und GDFs (*growth and differentiation factors*) sowie die Aktivine und Inhibine<sup>56,82</sup>.

Die Rezeptoren der TGF- $\beta$ -Superfamilie können weiter in Typ I, II und III eingeteilt werden<sup>93,35</sup>. Vom Typ-I-Rezeptor existieren sieben und vom Typ II fünf weitere Rezeptoruntergruppen, welche strukturelle Ähnlichkeiten zu den Serin/Threonin Kinasen aufweisen<sup>93</sup>. Typ-III-Rezeptoren, auch Betaglycan genannt, sind in der Lage dem TGF- $\beta$ -Rezeptorkomplex TGF- $\beta$  zu präsentieren<sup>69</sup>.

Die Liganden der TGF- $\beta$ -Superfamilie binden an unterschiedliche Kombinationen der einzelnen Rezeptoruntergruppen Typ I und Typ II. TGF- $\beta$ 1, 2 und 3 binden z.B. an eine Kombination aus dem ALK5-Rezeptor (Typ I) und T $\beta$ RII (Typ II)<sup>35</sup>.

### 1.2.1 TGF- $\beta$ -Signalweg

Die Bindung eines zur TGF- $\beta$ -Superfamilie gehörenden Liganden an den Typ-II-Rezeptor induziert die Rekrutierung eines Typ-I-Rezeptors, wodurch eine Dimerisierung beider Rezeptoren bewirkt wird<sup>141</sup>. Der Typ-I-Rezeptor wird durch die vom Typ-II-Rezeptor ausgehende Phosphorylierung aktiviert<sup>133</sup>. Diese Phosphorylierung bewirkt eine strukturelle Änderung des Typ-I-Rezeptors und ermöglicht es diesem mit der *Mad homology 2* (MH2)-Domäne der rezeptorregulierten Smads (R-Smads) zu interagieren, was zu einer Phosphorylierung der R-Smads an deren konserviertem Carboxy-terminalen SSxS-Sequenzmotiv führt<sup>75</sup>.

Durch die Rekrutierung und Phosphorylierung von R-Smads, zu denen u.a. Smad2 und Smad3 gehören, kann der TGF- $\beta$ -Signalweg aktiviert werden<sup>76</sup>. Nach der Phosphorylierung der R-Smads können sich diese vom Rezeptor lösen und im Cytoplasma der Zelle mit dem Co-Smad (Smad4) einen Komplex bilden<sup>75</sup>. Dieser Komplex wird in den Nucleus transportiert, wo er häufig in Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren die Regulation der Genexpression von diversen Zielgenen beeinflussen kann<sup>88</sup>.

Der Smad-abhängige TGF- $\beta$ -Signalweg kann über das inhibierend wirkende Smad7 autoreguliert werden<sup>89</sup>. Smad7 ist in der Lage an den Typ-I-Rezeptor zu binden und so die Bindungsstelle für R-Smads zu blockieren<sup>69</sup>. Infolgedessen wird deren Phosphorylierung und Aktivierung verhindert und die Komplexbildung mit Smad4 mit anschließender Translokation in den Nucleus gehemmt<sup>89</sup>. Die von Smad7 initiierte Rekrutierung von Smurf kann zur Ubiquitinierung und Degradierung des Typ-I-Rezeptors führen<sup>69,53</sup>. Durch die Anlagerung des aus Smad4 und Smad2/3 bestehenden Proteinkomplexes an die DNA werden u.a. Gene exprimiert, welche Smad7 aktivieren<sup>69</sup>.

Hierdurch entsteht eine negative Rückkopplungsschleife, welche die Intensität des TGF- $\beta$ -Signalwegs reguliert<sup>69</sup>.

TGF- $\beta$ -Rezeptoren können darüber hinaus mit anderen Smad-unabhängigen Signaltransduktionswegen interagieren, zu denen u.a. die MAP-Kinase-Signalwege (ERK, p38 und JNK), PI3K/AKT/TOR- und die Rho-like-GTPase-Signalwege gehören. Diese können synergistisch zum Smad-abhängigen Signaltransduktionsweg wirken und führen zu ähnlichen Effekten innerhalb der Zellen<sup>143</sup>.

TGF- $\beta$  kann das Zellwachstum, die Migration, Apoptose sowie Produktion der extrazellulären Matrix der Zellen regulieren und stellt einen entscheidenden Faktor im Rahmen der Kanzerogenese dar (siehe Kapitel 1.2.2)<sup>76</sup>.

### **1.2.1.1 Pharmakologische Inhibierung des TGF- $\beta$ -Signalwegs**

Eine Deregulierung des TGF- $\beta$ -Signalwegs kann in vielen Tumorzellen beobachtet werden<sup>74</sup>. Diese geht mit einer Beeinflussung des Tumormikromilieus einher und führt zu einer vermehrten Angiogenese, Fibrosierung und Metastasierung<sup>90</sup>.

Zur Regulierung des Tumormikromilieus sowie zur Verhinderung einer weiteren Tumorprogression kann der TGF- $\beta$ -Signalweg einen möglichen Angriffspunkt zielgerichteter Therapien darstellen<sup>19</sup>. Hierbei können unterschiedliche Komponenten des TGF- $\beta$ -Signalwegs gehemmt werden, was die Variabilität der verwendeten pharmakologischen Inhibitoren bedingt. Mögliche Angriffspunkte sind in Abbildung 2 und 3 dargestellt. Die Wirkung pharmakologischer Inhibitoren auf Tumorzellen konnte im Rahmen von vielen prä- und einigen klinischen Studien bereits erprobt werden<sup>29,19,58,27,72,97</sup>.

Zu den am weitesten entwickelten und klinisch erprobtesten Arzneimitteln zählen u.a. *antisense oligonucleotides* (AON), welche die Translation von mRNA runterregulieren, monoklonale Antikörper, die Liganden inhibieren und *small-molecule*-Inhibitoren, welche die TGF- $\beta$ -Rezeptor-Kinase angreifen<sup>69,92</sup>.

*Small-molecule*-Inhibitoren können durch ihre ökonomische Produktion, Stabilität und orale Aufnahmemöglichkeit anderen pharmakologischen Inhibitoren überlegen sein<sup>2</sup>. Sie fungieren z.B. als ATP-Mimetika und verhindern die Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 durch eine kompetitive Bindung der Rezeptor-Kinase bzw. des Typ I TGF- $\beta$ -Rezeptors, während Smad-unabhängige Signalwege erhalten bleiben können<sup>2</sup>.

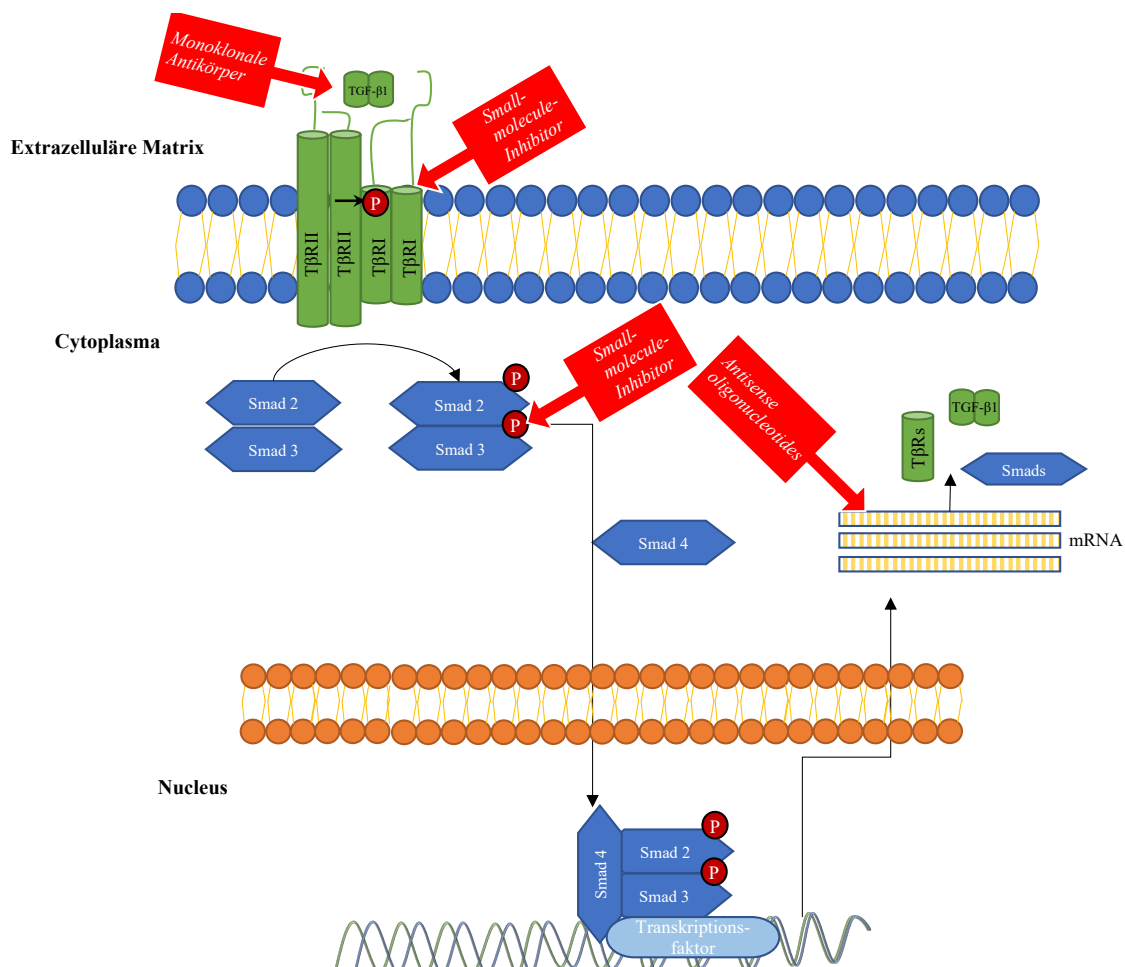
Zu den *small-molecule*-Inhibitoren gehören u.a. SB-431542, SB-505124, BI-4659 und SIS3.

SB-431542 bindet kompetitiv an der ATP-Bindungsstelle der TGF- $\beta$ -Rezeptoren ALK4, ALK5 und ALK7 und hemmt hierdurch die Phosphorylierung von Smad2 und Smad3. Dadurch wird der Smad-abhängige Signalweg blockiert, während der MAP-Kinase-Signalweg intakt bleibt<sup>40</sup>.

Die ALK4-, ALK5- und ALK7-Rezeptoren können alternativ durch SB-505124 inhibiert werden, welcher ebenfalls kompetitiv an die ATP-Bindungsstelle der genannten Rezeptoren bindet<sup>20</sup>. Im Vergleich zu SB-431542 zeigte sich SB-505124 in den Versuchen von DaCosta *et al.* als der potentere Inhibitor, welcher zusätzlich den TGF- $\beta$ -induzierten MAP-Kinase-Signalweg hemmen kann<sup>20</sup>.

BI-4659 ist ein ALK5-Rezeptor-Inhibitor, welcher die Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 blockiert<sup>11</sup>.

SIS3 kann selektiv die Phosphorylierung von Smad3 sowie dessen Bindung an die DNA hemmen<sup>44</sup>. Die Phosphorylierung von Smad2, die Proteinmenge von Smad4 und Smad7 sowie die Phosphorylierung anderer Signalwege, wie p38, p85 oder ERK wird nicht von SIS3 beeinflusst<sup>44</sup>.



### **Abbildung 3: Schematische Darstellung möglicher Angriffspunkte pharmakologischer Inhibitoren des Smad-abhängigen TGF- $\beta$ -Signalwegs**

Durch die Bindung von einem zur TGF- $\beta$ -Superfamilie gehörenden Liganden, wird eine Dimerisierung des Typ I und Typ-II-Rezeptors induziert. Der Typ-II-Rezeptor initiiert die Phosphorylierung des Typ-I-Rezeptors, wodurch R-Smads an diesen binden, phosphoryliert und aktiviert werden können. Sie bilden einen Komplex mit Smad4 und gelangen so in den Nucleus. Dort kann dieser Komplex an weitere Transkriptionsfaktoren binden und die Genexpression modulieren.

Der Smad-abhängige Signalweg kann durch unterschiedliche Arten von Inhibitoren reprimiert werden. Monoklonale Antikörper hemmen die Bindung von Liganden an den TGF- $\beta$ -Rezeptoren. *Antisense oligonucleotides* können die Translation der mRNA hemmen. *Small-molecule*-Inhibitoren greifen die TGF- $\beta$ -Rezeptorkinase an. Zu ihnen gehören die Inhibitoren SB-431542, SB-505124 und BI-4659. Sie binden am ALK5-Rezeptor, wodurch Smad2 und Smad3 nicht mehr an diesem Rezeptor phosphoryliert werden können. Der Inhibitor SIS3, welcher ebenfalls zu den *small-molecule*-Inhibitoren gehört, hemmt spezifisch die Phosphorylierung von Smad3 und somit dessen Aktivität. Smad2 kann bei Einsatz dieses Inhibitors weiterhin phosphoryliert werden.

## **1.2.2 Die Rolle von TGF- $\beta$ 1 in der Kanzerogenese**

Als ein Teil der TGF- $\beta$ -Superfamilie vermittelt TGF- $\beta$ 1 unterschiedliche zelluläre Aufgaben. Es reguliert die Proliferation und Differenzierung vieler Zelltypen und stellt darüber hinaus einen wichtigen Faktor bei der Wundheilung dar, indem es die Zellmigration, Entzündung, Proliferation von Fibroblasten und den Umbau der extrazellulären Matrix steuert<sup>82</sup>. Während der G1-Phase des Zellzyklus kann TGF- $\beta$ 1 in epithelialen Zellen zudem einen Zellzyklusarrest induzieren<sup>130</sup>. Dies bewirkt abhängig von der Signalintensität einen zytostatischen Effekt oder kann zur Apoptose der Zelle führen<sup>74</sup>. Der TGF- $\beta$ -Signalweg spielt außerdem eine wichtige, aber auch dichotome, Rolle bei der Pathogenese von Tumorzellen. Der Signalweg vermittelt in frühen Stadien von Tumorzellen eine tumorsuppressive Wirkung, während in späteren Stadien eine Tumorprogression gefördert wird<sup>9</sup>.

Die inhibitorische bzw. tumorsuppressive Wirkung des TGF- $\beta$ -Signalwegs wird u.a. durch die Aktivierung antiproliferativer Gene wie p15<sup>INK</sup> und p21<sup>cip1/Waf1</sup> vermittelt und wird v.a. bei sich noch im Anfangsstadium befindenden Tumorzellen beobachtet<sup>90</sup>.

In fortgeschrittenen Stadien bzw. im weiteren Verlauf einer Krebserkrankung geht diese antiproliferative Wirkung verloren<sup>130</sup>. Es kann dann eine erhöhte TGF- $\beta$ 1-Menge gemessen werden, welche u.a. mit einer höheren Malignität korreliert<sup>30,34</sup>. Der erhöhte Anteil an TGF- $\beta$ 1 in der Zellumgebung bewirkt u.a. eine verstärkte Angiogenese, Immunsuppression sowie Interaktion der Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix und führt darüber hinaus zur Einschränkung der Zelladhäsion zwischen den Tumorzellen, was eine höhere Invasivität der Tumorzellen bedingt<sup>10</sup>. Durch die Umgestaltung und Degradierung der umgebenden extrazellulären Matrix (ECM) der Tumorzellen kann TGF- $\beta$ 1 zusätzlich aus dem gespeicherten Reservoir der ECM freigesetzt werden<sup>90</sup>.

Hierdurch wird die TGF- $\beta$ 1-Konzentration in der Tumorzellumgebung potenziert, wodurch die pro-metastatische Wirkung weiter verstärkt werden kann<sup>90</sup>.

Neben den bereits beschriebenen Veränderungen kann eine erhöhte Menge von TGF- $\beta$ 1 in den Tumorzellen ebenfalls zu deren Transition von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp führen<sup>46</sup>. Diese epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) geht außerdem mit einer Umgestaltung des Zytoskeletts, dem Verlust an Zellpolarität und Zelladhäsion, erhöhter Invasivität und Migrationsfähigkeit einher<sup>33</sup> (siehe Kapitel 1.3).

### **1.3 Epitheliale-mesenchymale Transition**

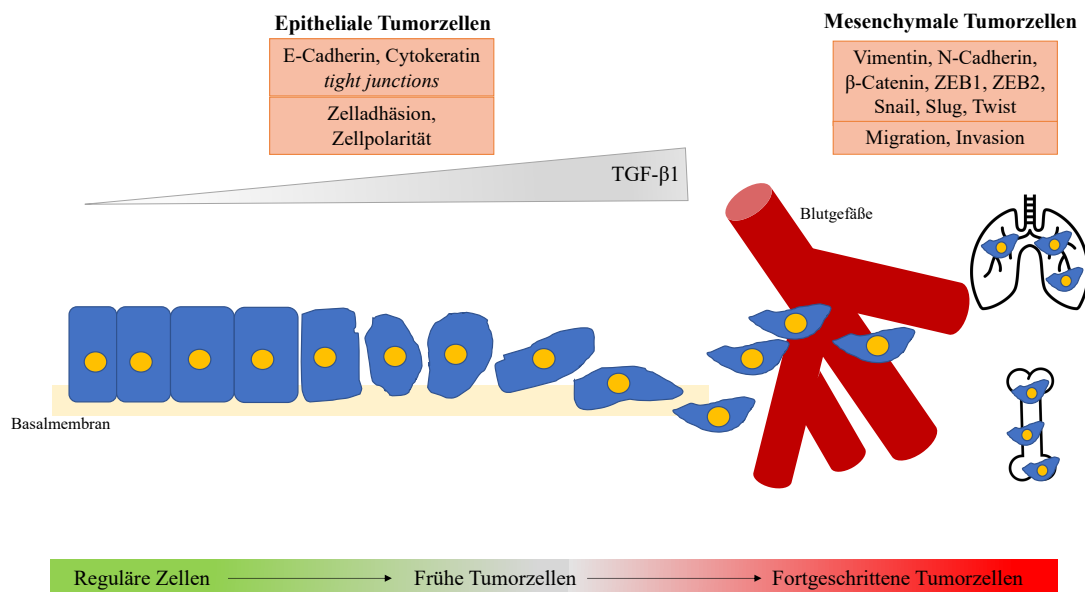
Eine epitheliale-mesenchymale Transition kommt physiologisch während der Embryonalentwicklung sowie im Rahmen der Wundheilung vor<sup>7</sup> und kann durch spezifische Transkriptionsfaktoren, zu denen u.a. Mitglieder der Snail/Slug, ZEB1/2 und Twist-Familie zählen, induziert werden<sup>95</sup>. Die EMT ist ein dynamischer Prozess, daher können (Tumor-)Zellen unterschiedliche intermediäre Stadien zwischen einem vollständig ausgeprägten epithelialen und mesenchymalen Phänotyp einnehmen<sup>95</sup>.

Sie geht u.a. mit einer Umgestaltung des Zytoskeletts von Tumorzellen einher. Hierbei ändert sich durch die Repression von Cytokeratin und der vermehrten Synthese von Vimentin die Zusammensetzung der Intermediärfilamente, wodurch Tumorzellen einen mesenchymalen Phänotyp annehmen können, der Fibroblasten ähnelt<sup>65,47</sup>. Darüber hinaus kommt es zur Degradierung der Zellkontakte zwischen den einzelnen Zellen sowie zur Basalmembran. In diesem Zusammenhang wird eine verminderte Menge an E-Cadherin detektiert, welches zum Aufbau von stabilen Zell-Zellkontakten benötigt wird<sup>102</sup>. Im Rahmen der Tumorgenese kann ein „Cadherin-Switch“ beobachtet werden, welcher mit einer verringerten E-Cadherin-Expression und einer verstärkten Expression von N-Cadherin einhergeht. EMT-durchlaufende Zellen verlieren so ihre Verbindung zu anderen epithelialen Zellen und erlangen zusätzlich Ähnlichkeit zu mesenchymalen Zellen<sup>131</sup>. Dies führt dazu, dass sich diese Zellen aus dem Zellverbund ihres Primärtumors lösen und in andere Regionen des Organismus migrieren und eindringen können<sup>95,80</sup>. Bei Erreichen einer sekundären Kolonisationsstelle können diese Tumorzellen dann wieder zu ihrem epithelialen Phänotyp zurückkehren. Dieser Prozess wird auch mesenchymale-epitheliale Transition (MET) genannt und führt letztendlich zur Ausbildung von Metastasen<sup>52</sup>.

Die Erhöhung der TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Gewebe bzw. im Tumor spielt eine entscheidende Rolle für die Induktion einer EMT im Rahmen der Wundheilung, Fibrose

und Kanzerogenese<sup>65,134</sup>. Die Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 bewirkt eine vermehrte Expression von N-Cadherin, wodurch die Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps im Zuge des oben beschriebenen „Cadherin-Switches“ gefördert wird<sup>71,5</sup>. Durch die TGF- $\beta$ 1-bedingte Angiogenese wird den Zellen die Migration zusätzlich erleichtert<sup>134</sup>.

Eine Erhöhung der TGF- $\beta$ 1-Konzentration bewirkt durch die Aktivierung des Smad-abhängigen TGF- $\beta$ -Signalwegs eine verstärkte Genexpression von EMT-Transkriptionsfaktoren (EMT-TFs) wie z.B. von Snail, Slug, ZEB1, ZEB2 und Twist<sup>102</sup>. Smad-unabhängige TGF- $\beta$ -Signalwege können ebenfalls eine EMT beeinflussen<sup>85</sup>. TGF- $\beta$ 1 bewirkt die Aktivierung des PI3K/Akt/TOR-Signalwegs und hierüber eine erhöhte Mobilität und Invasivität der Zellen während der EMT<sup>64</sup>. Die Aktivierung des mTOR-Komplex 2 durch TGF- $\beta$ 1 führt darüber hinaus zur Reorganisation des Zytoskeletts und ermöglicht so die Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps<sup>63</sup>.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung einer EMT im Zusammenhang mit TGF- $\beta$ 1**

Reguläre Epithelzellen sind fest untereinander verbunden und in der Basalmembran verankert. Sie weisen eine eher rundliche Form auf. Im Verlauf der Tumorentwicklung nimmt die Konzentration an TGF- $\beta$ 1 zu, welche mit der morphologischen Veränderung der frühen Tumorzellen korreliert. Bei weiterem Fortschreiten der EMT nimmt die TGF- $\beta$ 1-Konzentration in den Tumoren zu. Diese bilden einen mesenchymalen Phänotyp aus. Die Zellen werden länglicher und ähneln Fibroblasten. Durch die Proteinexpression von Vimentin, Repression von Cytokeratin, dem Austausch von E-Cadherin durch N-Cadherin wird es diesen fortgeschrittenen Tumorzellen ermöglicht zu migrieren und invadieren sowie letztendlich Sekundärtumore bzw. Metastasen ausbilden.

## 1.4 Zielsetzung

Lungenkarzinome zählen zu den weltweit tödlichsten und am häufigsten vorkommenden Tumoren, da sie häufig erst in einem fortgeschrittenen und bereits metastasierten Stadium diagnostiziert werden. Die Weiterentwicklung bereits etablierter Therapien stellt daher einen entscheidenden Faktor für die Prognose und Überlebensrate betroffener Patienten und Patientinnen dar. Eine Möglichkeit hierzu besteht in der vermehrten Etablierung zielgerichteter Arzneimitteltherapien.

Im Rahmen der Metastasierung spielt die epitheliale-mesenchymale Transition, welche auch in Lungenkarzinomzellen beobachtet werden kann, eine wichtige Rolle. Diese wird u.a. durch eine erhöhte TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Tumormikromilieu gefördert.

In Zusammenschau dieser Erkenntnisse erscheint die Fortentwicklung von pharmakologischen Inhibitoren sinnvoll, welche den TGF- $\beta$ 1-Signalweg und der daraus folgenden EMT hemmen können.

Ziel dieser Arbeit ist die Analyse unterschiedlicher *small-molecule*-Inhibitoren, welche eben jenen Signalweg beeinflussen können und zu bewerten, inwiefern diese im klinischen Alltag eingesetzt werden könnten.

Hierzu soll deren Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen, Proteinmenge und Lokalisation epithelialer und mesenchymaler EMT-Markerproteine mithilfe von proteinbiochemischen und immunhistochemischen Methoden untersucht werden. Zur weiteren Differenzierung soll zudem der Effekt einer Überexpression diverser Transkriptionsfaktoren auf die Proteinmenge von epithelialen und mesenchymalen Markerproteinen beobachtet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Humane Zelllinien

**Tabelle 1: Herkunft der verwendeten Zelllinien**

Zelllinie	Gewebe-/Tumorart	Morphologie	ATCC-Nummer
A549	NSCLC, Lungenadenokarzinom	Epithelial	ATCC® CCL-185™

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

#### 2.1.2 Plasmide

**Tabelle 2: Verwendete Plasmide**

Plasmid	Herkunft
pEGFP-C1	Clontech, Heidelberg
pCMV3/Sip1	Addgene, Watertown, MA, USA
pcDNA3/Snail	AG Menke, Gießen
pCMV3/Slug	Addgene, Watertown, MA, USA
pCMV3/Twist	Addgene, Watertown, MA, USA
pCMV3/ZEB1	Addgene, Watertown, MA, USA

#### 2.1.3 Primär-Antikörper

**Tabelle 3: Eigenschaften der verwendeten Primär-Antikörper**

Antigen	Ursprung	Verdünnung WB	Hersteller und Artikelnummer
$\beta$ -Aktin	Maus (mk)	1:5000	Sigma-Aldrich, A5441
$\beta$ -Catenin	Maus (mk)	1:2000	Becton Dickinson, 610154
$\beta$ -Catenin	Kaninchen (pk)	1:5000	Sigma-Aldrich, 94 C2206
E-Cadherin	Maus (mk)	1:4000	Becton Dickinson, 610182

E-Cadherin	Kaninchen (mk)	1:7000	Thermo Fischer #PA5-85088
N-Cadherin	Maus (mk)	1:2000	Becton Dickinson, 610920
N-Cadherin	Kaninchen (pk)	1:1000	Takara, M142
ESRP1	Kaninchen (pk)	1:1000	Sigma-Aldrich, HPA023719
ESRP2	Kaninchen (pk)	1:1000	Sigma-Aldrich, SAB3500719
Cytokeratin 7	Kaninchen (pk)	1:2000	ProteinTech, 17513-1-AP
GAPDH	Maus (mk)	1:2000	Acris #ACR001P
Smad2/3	Maus (mk)	1:1000	Becton Dickinson, 610842
Smad2/3	Kaninchen (pk)	1:1000	CST #8685
Phospho-Smad2	Kaninchen (pk)	1:1000	GeneTex GTX133614
Slug	Kaninchen (pk)	1:1000	CST #9585
Snail	Kaninchen (pk)	1:1000	CST #3879
Twist	Kaninchen (pk)	1:1000	ProteinTech, 25465-1-AP
Vimentin	Maus (mk)	1:500	Sigma-Aldrich, V-6630
Vimentin	Kaninchen (pk)	1:1000	CST #5741
ZEB1	Kaninchen	1:1000	CST #3396
ZEB2	Kaninchen	1:1000	Sigma-Aldrich, SAB4503710

WB: Western Blot; CST: Cell Signaling Technology (Frankfurt a. M.); pk: polyklonal; mk: monoclonal

## 2.1.4 Sekundär-Antikörper

**Tabelle 4: Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenz-gekoppelten Sekundär-Antikörper**

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Hersteller und Artikelnummer
IRDye R 680LT anti- <i>mouse</i> IgG (H+L)	Ziege (pk)	1:150000	Li-Cor, 926-68020

IRDye R 800CW anti- <i>rabbit</i> IgG (H+L)	Ziege (pk)	1:150000	Li-Cor, 926-32211
Alexa Fluor 488 anti- <i>mouse</i> IgG (H+L)	Ziege (pk)	1:1000	Mol. Probes A-11001
Cy3 AffiniPure anti- <i>rabbit</i> IgG (H+L)	Ziege (pk)	1:2000	Dianova 111-166-045

H+L: *heavy and light chain*; IgG: Immunglobulin G; pk: polyklonal

### 2.1.5 Zellbiologische und molekularbiologische Kits

DNA-midi <sup>TM</sup> GT <i>Purification Kit</i>	Intron Biotechnology, 7-Bioscience, Freiburg
NucleoBond <sup>®</sup> <i>Finalizer Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren

### 2.1.6 Marker

#### Marker für die SDS-PAGE

<i>Page Ruler Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Kaleidoscope marker</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

### 2.1.7 Chemikalien

Alle genutzten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheit von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Serva Electrophoreses (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Dharmacon (Lafayette, USA), AppliChem (Darmstadt), GIBCO Life Technologies (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Thermo Fisher Scientific (Langenselbold) verwendet.

30 % Acrylamid (Rotiphorese <sup>®</sup> Gel A)	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin bovine Fraction V (BSA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
2 % Bisacrylamid (Rotiphorese <sup>®</sup> Gel B)	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Crystal Violet (C3886)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DharmaFECT 1 Transfection Reagent	Dharmacon, Lafayette, USA

4,6-Diamindin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	GIBCO Life Technologies, Darmstadt
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fetal Bovine Serum (FBS)	GIBCO Life Technologies, Darmstadt
GlutaMAX™ Supplement	GIBCO Life Technologies, Darmstadt
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Isobutanol (2-Methyl-1-propanol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
MEM <i>Non-Essential Amino Acids Solution</i> (100x)	GIBCO Life Technologies, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat (NaDOC)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Opti-MEM® I (1x)	GIBCO Life Technologies, Darmstadt
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
<i>BCA Protein Assay Reagent A Pierce®</i>	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau-S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris ultrapure	AppliChem, Darmstadt
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA (1x), Phenol-Rot	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 2.1.8 Gebrauchswaren

Die Plastikzellkulturmaterialien wurden in der Standard-Qualität der Firmen Sarstedt (Nümbrecht) genutzt.

6-Well-Platte	Sarstedt, Nümbrecht
12-Well-Platte	Sarstedt, Nümbrecht
96-Well-Mikrotiterplatte	Sarstedt, Nümbrecht
Amersham Protran 0,45 µm Nitrocellulose	GE Healthcare
Deckglas (22 x 22 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Corning® Transwell® Insert	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kanülen 26 G (0,5 x 25 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	LLG Labware, Meckenheim
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Tuberkulin-Spritzen (1 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Whatman® Chromatography Paper	GE Healthcare, Frankfurt am Main
Zellkulturschalen (Ø 10 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen (Ø 6 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflasche (T75)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.1.9 Geräte

Blotkammer	C.B.S. Scientific Co., California, USA
ELx800 <i>Absorbance Microplate Reader</i>	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
Elektrophoresekammer	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
EVOS FL Auto 2 <i>Cell Imaging System</i>	Invitrogen, Langenselbold
<i>Function Line</i> Bakterieninkubator	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Acrylamid-Gelgießständer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gilson-Pipetten	Gilson International, Limburg-Offheim
HERAcell 150i CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

Inverses Fluorezenzmikroskop Olympus IX81	Olympus Europa SE, Hamburg
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen
Inverses Lichtmikroskop Primo Vert	Carl Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifuge Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Li-Cor Odyssey CLx	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg
MaxQ 400 Bakterienschüttler	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Neubauer Zählkammer	VWR, Darmstadt
pH Meter	Mettler Toledo Gießen
Sicherheitswerkbank MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Tischzentrifuge 5415-R	Eppendorf, Hamburg
µMACS™ Separator und Multi Stand	Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach

### 2.1.10 Software

CellSens Dimension 1.6	SIS-Olympus, Münster
Fiji OpenSource Software	National Institutes of Health, USA
Gen5 (Version 2.00)	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
Image Studio (Version 5.2.5)	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg
Microsoft® Excel 2019 (Mac)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft® PowerPoint 2019 (Mac)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft® Word 2019 (Mac)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
GraphPad Prism 10	GraphPad Software Inc., Boston, MA, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten mit den verwendeten Zellen wurden zur Gewährleistung der Sterilität an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Zum optimalen Wachstum der Zelllinien wurden diese in Inkubationschränken bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 10 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Darüber hinaus wurde alle 2-3 Tage das Wachstumsmedium gewechselt.

#### Wachstumsmedium

*Dulbecco's Modified Eagle* (DMEM) Medium

10 % Fötale Rinderserum (FBS)

1 % GlutaMAX (100 x)

1 % MEM Nicht-essenzielle Aminosäuren (100 x)

Für diese Arbeit wurden A549-Zellen in 60 mm Schalen ausgesät und jeweils mit denen in Tabelle 5 aufgeführten Reagenzien stimuliert. Die Behandlung mit Inhibitoren SB-431542, SB-505124, BI-4659 und SIS3 erfolgte sowohl einzeln als auch in Kombination mit TGF- $\beta$ 1.

**Tabelle 5: Verwendete Stimulationsreagenzien mit jeweils eingesetzten Konzentrationen**

Stimulationsreagenz	Hersteller	Bestellnummer	Stammkonzentration	Eingesetzte Konzentration
Citrat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	S4641	10 mM	0,02 mM
TGF- $\beta$ 1	PeptoTech (Rocky Hill, USA)	#100-21	5 $\mu$ g/ml	0,01 $\mu$ g/ml
SB-431542	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	616461	1 mM	1 nM
SB-505124	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	S4696	2 mM	1 nM

BI-4659	Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein)	Keine Bestellnummer vorhanden, Bestellung über <a href="https://opnme.com">https://opnme.com</a>	10 mM	1 nM
SIS3	Biomol (Hamburg)	Cay15945-1	1 mM	0,5 nM

### 2.2.1.2 Passagieren von Zellen

Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80-100 % erreicht hatten, wurden sie in ein neues Kulturgefäß umgesetzt. Dazu wurde zunächst das Wachstumsmedium der Zellen abgesaugt und anschließend mit 3-4 ml CMF-PBS gewaschen, um die Mediumreste vollständig zu entfernen.

Zur Lösung der Zellen voneinander und vom Untergrund wurde den Zellen im Anschluss 3-4 ml Trypsin-EDTA-Lösung hinzugegeben. Zur Beschleunigung dieser Trypsinreaktion wurden sie daraufhin für fünf Minuten in einem Inkubationsschrank bei 37 °C gelagert.

Die Reaktion wurde durch das Hinzufügen von mindestens der gleichen Menge an Wachstumsmedium gestoppt.

Danach wurden die Zellen mithilfe einer Pipette aufgenommen und zur Zentrifugation für drei Minuten bei 200 x g, in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt.

Nach der Zentrifugation lagerte sich am Boden des Polypropylenröhrchen das Zellsediment ab. Nach dem Absaugen des Mediumüberstands wurde das Zellsediment mit 10 ml Medium vollständig resuspendiert. Dieses Resuspendat wurde auf neue Kulturgefäße ausgesät und durch kreuzförmiges Schwenken der Gefäße gleichmäßig verteilt.

#### CMF-PBS 1x

140 mM NaCl

2,7 mM KCl

8 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,4

### **2.2.1.3 Zellzahlbestimmung mit Neubauer-Zählkammer**

Zur Bestimmung der Zellzahl des Resuspendats wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Je ein Tropfen Zellsuspension wurde mithilfe einer Pasteurpipette auf die Neubauer-Zählkammer gegeben. Dazu wurde auf diese im Vorfeld ein geschliffenes Deckglas gelegt, welches leicht mit Wasser befeuchtet wurde.

Im Lichtmikroskop wurde mithilfe eines 10 x Objektivs die Anzahl der Zellen, welche sich in den vier Quadranten der Zählkammer befanden, ausgezählt und anschließend deren Mittelwert ermittelt. Dieser entsprach mit dem Faktor von  $10^4$  der Anzahl der Zellen, welche sich in einem Milliliter Zellresuspendat befanden.

### **2.2.1.4 Transiente Plasmidtransfektion von A549 Zellen mit DharmafectDuo**

Zur Transfektion von A549 Zellen mit Plasmid-DNA, wurden diese zunächst mit einer Zelldichte von  $4 \times 10^5$  in jeweils einer Schale eines 6-Wells ausgesät. Nachdem diese eine Konfluenz von ca. 80-90 % erreicht hatten, wurden die Zellen mithilfe des Transfektionsreagenzes DharmafectDuo transfiziert.

Hierfür wurden zunächst 6,5  $\mu$ l der Transfektionsreagenz in 190  $\mu$ l OptiMEM aufgenommen, mit in 192  $\mu$ l OptiMEM aufgenommener 1,5  $\mu$ g Plasmid-DNA vermischt, für 15 Minuten inkubiert und auf die Zellen geträufelt. Davor wurden 1,1 ml Wachstumsmedium pro Schale vorgelegt.

Zur Verringerung der Toxizität des Transfektionsreagenz erfolgte nach 6-stündiger Inkubation bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> ein Wechsel des Mediums.

Die Lyse der Zellen erfolgte nach 24 bzw. 48 Stunden. Im Anschluss wurden sie proteinbiochemisch analysiert.

### **2.2.1.5 Migrationsassay mittels Transwell-Einsätzen**

A549-Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  Zellen in Transwell-Insert überführt, welche in entsprechende 12-Transwell-Platten eingefügt wurden. In die Wells wurden im Vorfeld 0,5 ml Wachstumsmedium vorgelegt.

Nach dem Überführen in die Inserts wurden die Zellen für zwei bis drei Stunden halbstündlich mit einer Pipette aufgenommen und verteilt, sodass sie sich gleichmäßig in den Inserts absetzen konnten.

Nachdem sich die Zellen nach vier bis sechs Stunden am Grund der Inserts abgeheftet hatten, wurde der jeweilige Stimulus (Citrat, EGF, TGF- $\beta$ 1 oder TGF- $\beta$ 2) in das Well

gegeben, während die eingesetzten Inhibitoren (SB-431542, SB-505124, BI-4659 oder SIS3) jeweils in das Insert gegeben wurden.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen in den Inserts mit 4 % PFA in CMF-PBS fixiert. Nach ca. 10 Minuten wurde das PFA entfernt und die Inserts mit destilliertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

Zur Färbung der Zellen wurden diese in 200 µL 0,1 % Kristallviolett in Ethanol für 20 min gefärbt. Anschließend wurde die Lösung wieder abgenommen und die Inserts wurden gemeinsam mit den Wells mit destilliertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

Die Zellen, die sich oberhalb des Inserts befanden, wurden mithilfe eines Wattestäbchen abgenommen, sodass nur noch jene Zellen übrigblieben, welche sich auf der Unterseite des Inserts befanden.

Diese Zellen wurden entweder unter dem Lichtmikroskop oder im EVOS FL Auto 2 *Cell Imaging System* ausgezählt. Dazu wurden 3-5 Gesichtsfelder genutzt und anschließend wurde die Zellzahl gemittelt.

#### **2.2.1.6 Immunfluoreszenz**

Mithilfe der Immunfluoreszenz kann die Lokalisation von Proteinen innerhalb einer Zelle festgestellt werden.

Dazu wurden A549-Zellen auf vier sterilen Deckgläschen innerhalb eines 6-Wells ausgesät. Nach einem Tag wurden die Zellen in je einem Well mit Citrat, TGF-β1, TGF-β2 oder TGF-β1 in Kombination mit SB-505124 behandelt.

Drei Tage nach Aussaat der Zellen wurden diese fixiert. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt, woraufhin ein Waschschrift mit CMF-PBS erfolgte. Anschließend wurden die Zellen auf den Deckgläschen für 10 Minuten mit 4 % PFA in CMF-PBS oder kaltem Methanol-Aceton (1:1) fixiert.

Durch die Methanol-Aceton-Fixierung konnte eine bessere Fixierung membranständiger Proteine erreicht werden und diente dazu die Kernmembran durchlässiger zu machen, um die Färbung von Kernproteinen zu ermöglichen.

Nach der Fixierung wurden die Zellen wieder mit CMF-PBS gewaschen und anschließend wurde ihnen 0,2 % Triton X-100 in CMF-PBS hinzugegeben. Dieser Schritt führt zur Permeabilisierung der Zellmembran, wodurch diese für Antikörper durchgängig gemacht wird. Dieser Schritt ist bei der Fixierung mit Methanol/Aceton nicht notwendig.

Um unspezifische Adhäsionen abzusättigen, wurden die Zellen 60 Minuten mit 3 % BSA in TBS-T unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder mit CMF-PBS gewaschen.

Zur Färbung mit dem Primär-Antikörper wurden die Zellen für eine Stunde in einer feuchten Kammer mit der Antikörper-Lösung inkubiert. Dafür wurde das Antiserum in 0,3 % BSA in TBS verdünnt und jeweils 150 µl davon auf die sich auf den Deckgläsern befindlichen Zellen gegeben.

Danach wurde der Antikörper gründlich abgesaugt und die Zellen dreimal mit CMF-PBS gewaschen.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten sekundären Fluoreszenz-gekoppeltem Antikörper, welcher in 0,3 % BSA in TBS verdünnt wurde. Die Arbeitsschritte erfolgten aus diesem Grund lichtgeschützt.

Zur technischen Kontrolle der unspezifischen Bindung der Sekundärantikörper wurden die Präparate hierfür ebenfalls jeweils ohne Primärantikörper inkubiert.

Nach einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Antikörper abgenommen und die Zellen dreimal mit CMF-PBS gewaschen.

Danach wurden die Deckgläser kurz in destilliertem Wasser gewaschen und mit Elvanol auf Objektträger eingedeckt.

Die Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop *Olympus IX81* untersucht und dokumentiert.

TBS-T (in H<sub>2</sub>O)

10 mM Tris-HCl  
150 mM NaCl  
0,1 % Tween 20

TBS (in H<sub>2</sub>O)

10 mM Tris-HCl  
150 mM NaCl  
pH: 7,4

Elvanol (in H<sub>2</sub>O)

10 % Mowiol 4-88  
25 % Glycerin  
0,1 M Tris-HCl, pH 8,5

## 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 Zellyse

Zur Analyse des Proteingehalts der Zellen mussten diese lysiert werden. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt. Verbliebene Medienreste wurden mit eiskaltem CMF-PBS ausgewaschen. Anschließend wurde RIPA-Lysepuffer, welcher zusätzlich einen Protease-Inhibitor-Mix im Verhältnis von 1:50 enthielt, auf die Zellen gegeben.

Dieser Protease-Inhibitor-Mix verhinderte eine Degradation der Proteine. Sollte zusätzlich noch die Phosphorylierung bestimmter Proteine untersucht werden, wurde zusätzlich ein Phosphatase-Inhibitor-Mix in einem Verhältnis von 1:50 dem Lysepuffer hinzugefügt, um die Dephosphorylierung der Proteine zu verhindern.

Für 10 cm-Schalen wurden 400 µl, für 6 cm-Schalen 130 µl und für 6-Well 80 µl RIPA-Puffer verwendet. Anschließend wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur Homogenisierung der Zellsuspension wurde diese je siebenmal mit einer 26 G-Injektionsnadel aufgezogen und anschließend für 2 Minuten in einem Ultraschallbad behandelt. Bei Lysaten unter 100 µl wurde auf die Homogenisierung mit der Injektionsnadel verzichtet. Diese wurden direkt im Ultraschallbad behandelt. Danach wurde das Lysat für 10 Minuten in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C und 13.200 x g gegeben, wodurch sich der Zellreste und die proteinhaltige Lösung voneinander trennten. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und konnte analysiert werden. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

#### RIPA-Puffer

1 % Triton X-100

1 % Na-DOC

0,2 % SDS

150 mM NaCl

50 mM Tris

20 mM EDTA

In Wasser gelöst und auf pH 7,2  
eingestellt

#### 1x Protease-Inhibitor-Mix (in H<sub>2</sub>O)

1 µM Aprotinin

1 mM Perfabloc

2,5 µM Sojabohnen-Trypsininhibitor

2,1 µM Leupeptin

#### 1x Phosphatase-Inhibitor-Mix (in H<sub>2</sub>O)

10 mM NaF

1 mM Na-Orthovanadat

25 mM Beta-Glycerophosphat

750 nM Okadasäure

### **2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration durch *BCA Protein Assay***

Um die Proteinkonzentration von den Zellysaten zu ermitteln, wurde das *Bicinchoninic Acid Protein Assay* (BCA Assay) durchgeführt. Hierfür wurden 5 bzw. 10 µl des Lysats abgenommen und mit 45 bzw. 40 µl destilliertem H<sub>2</sub>O in einem Reaktionsgefäß aufgefüllt. Je 20 µl der Lösung wurden dann jeweils als Duplikat auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen.

Als Vergleich diente eine Eichgrade mit bekannten Proteinkonzentrationen. Diese wurde bestimmt, indem BSA-Konzentrationen zwischen 0 und 125 µg/ml (0 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml und 125 µg/ml) auf die Platte aufgetragen wurden.

Zu den jeweiligen Proben und zur Eichgerade wurden im Anschluss je 180 µl der BCA-Färbereagenz hinzugefügt. Diese Farbreagenz wurde durch eine Vermengung von BCA in einem Verhältnis von 50:1 zu 4 % Cu(II)SO<sub>4</sub> hergestellt. Durch die Bindung an Bicinchoninsäure wurden proportional zur Proteinmenge die Cu<sup>2+</sup>-Ionen zu Cu<sup>+</sup>-Ionen reduziert, was einen Farbumschlag von grün zu violett bewirkte.

Diese Reaktion fand für 30 Minuten bei 37 °C statt. Anschließend wurde die Absorption mithilfe des Bio-Tek ELx800 *Absorbance Microplate Reader* bei 562 nm gemessen. Die dabei bestimmten Extinktionswerte wurden dazu genutzt, um die Geradengleichung der Eichreihe zu bestimmen, anhand derer die Proteinkonzentrationen berechnet wurden.

### **2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Identifikation von Proteinen wurde die SDS-PAGE genutzt. Hierbei wurden je 50 µg Proteinlösung unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Größe bzw. ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Zur Denaturierung der Proteine wurde den Proben mindestens ein Fünftel ihres Volumens an reduzierendem SDS-Probenpuffer in einem Reaktionsgefäß hinzugegeben. Dieser Probenpuffer enthielt zur Maskierung der Ladung der Aminosäuren SDS. Darüber hinaus befand sich in ihm DTT, was zur Reduktion der freigelegten Disulfidbrücken diente. Durch den Probenpuffer konnte sichergestellt werden, dass alle Proteine eine einheitlich negative Ladung aufwiesen und linearisiert wurden. Die so versetzten Proben, wurden dann für 5 min bei 95 °C erhitzt.

Das Polyacrylamid-Gel, in welchem die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte, war aus einem Sammel- und Trenngel aufgebaut, welche sich

im Hinblick auf die Ionenkonzentration, der Porengröße und dem pH-Wert unterschieden.

Der Trennbereich unterschied sich je nach Acrylamidgehalt der jeweiligen Gele. Zur Auftrennung größerer Proteine wurde ein schwächer konzentriertes Gel verwendet, während für kleinere ein höher konzentriertes genutzt wurde.

**Tabelle 6: Herstellung eines Polyacrylamid-Gels**

SDS-Gel (80 x 50 x 1 mm <sup>3</sup> )	Trenngel				Sammelgel
	7,5 %	8,5 %	10 %	12,5 %	
30 % Acrylamid	0,5 ml	1,15 ml	1,3 ml	1,625 ml	0,19 ml
2 % Bisacrylamid	0,4 ml	0,45 ml	0,5 ml	0,6 ml	0,075 ml
3 M Tris-HCl pH 8,8	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	-
1 M Tris-HCl pH 6,8	-	-	-	-	0,19 ml
10 % SDS	0,04 ml	0,04 ml	0,04 ml	0,04 ml	0,15 ml
60 % Saccharose	-	-	-	-	0,375 ml
H <sub>2</sub> O destilliert	2,05 ml	1,8 ml	1,6 ml	1,225 ml	650 ml
TEMED	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	2 µl
APS	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	20 µl

Das Polyacrylamid-Gel wurde zwischen zwei gereinigte Glasplatten gegossen und anschließend mit Wasser-gesättigtem Isobutanol überschichtet, sodass sich eine gerade Trennschicht bildete. Nach dem Aushärten des Gels bei Raumtemperatur für ein bis drei Stunden, wurde es über Nacht zum vollständigen Auspolymerisieren bei 4 °C gelagert.

Am darauffolgenden Tag wurde das auspolymerisierte Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet, in welches ein Probenkamm eingeführt wurde. Nach 15 Minuten war das Sammelgel auspolymerisiert und der Kamm wurde vorsichtig entfernt, sodass sich Sammeltaschen bilden konnten. Anschließend wurden die Glasplatten in eine Laufkammer horizontal gespannt und mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt.

Die mit SDS-Probenpuffer versetzten Proben wurden in jeweils eine Sammeltasche mit gleicher Proteinmenge (30 µg bzw. 50 µg) aufgetragen. Zur Identifizierung der Proteingrößen wurde zusätzlich ein Proteinmarker in eine Sammeltasche gegeben, welcher ausschließlich Proteine bekannter Größe enthielt. An die Laufkammer wurde ein elektrisches Feld angelegt, sodass die Proteine für 15 min im Sammelgel bei 80 V

konzentriert wurden. Danach folgte die Auftrennung im Trenngel bei 110 V für 1,5 Stunden bzw. so lange bis die Lauffront das Ende des Gels erreichte.

5x SDS-Probenpuffer (H<sub>2</sub>O)

200 mM Tris-HCl

5 mM EDTA pH 8,0

1 M Saccharose

1 mM DTT

2 % SDS

0,1 % Bromphenolblau

1x SDS-Laufpuffer (in H<sub>2</sub>O)

50 mM Tris-HCl

500 mM Glycin

0,1 % SDS

#### **2.2.2.4 Western Blot**

Die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran, wurden mithilfe des Nass-Blot-Verfahrens durchgeführt.

Dabei fand der Transfer in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer statt. Um eine Übertragung zu gewährleisten, musste sich die Nitrozellulose-Membran auf der Anodenseite befinden. Darüber hinaus musste sichergestellt werden, dass sich keine Luftblasen zwischen dem Polyacrylamidgel und der Nitrozellulose-Membran befanden. Hierfür wurden Filterpapiere (Whatman-Papiere) und Schwämme unter das Polyacrylamidgel und die Nitrocellulose-Membran gelegt, welche mithilfe eines Kunststoffgitters einen leichten und gleichmäßigen Druck auf das Gel und die Membran erzeugten. Dieses Kunststoffgitter wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer überführt und ein elektrisches Feld angelegt. Durch dieses wanderten die negativ geladenen Proteine auf die Nitrozellulose-Membran, an welche sie aufgrund ihrer polaren Eigenschaften banden. Der Transfer kleinerer Proteine bis ca. 100 kDa bzw. für Proteinphosphorylierungen erfolgte bei 60 V für 3 Stunden, für größere Proteine ab 100 kDa erfolgte der Transfer für 10 Stunden bei 20 V. Die Transferkammer wurde für diese Zeit in einer Kühlkammer bei 4 °C gelagert. In der Kammer selbst befand sich zusätzlich ein Rührmagnet, sodass der Puffer regelmäßig gemischt wurde.

Nach der Transferzeit wurde die Nitrozellulose-Membran mit den gebundenen Proteinen in H<sub>2</sub>O gewaschen, um die Reste des Transferpuffers und hierbei insbesondere die des Methanols zu entfernen. Zur Überprüfung der Qualität des Transfers wurde die Nitrozellulose-Membran für fünf bis zehn Minuten mit einer Ponceau-Rot-Lösung gefärbt, welche reversibel an positiv geladenen Aminosäuren band. Anschließend wurde

die Membran wieder in H<sub>2</sub>O gewaschen, um den rot gefärbten Hintergrund zu reduzieren und die ausschließliche Färbung der Proteinbanden zu gewährleisten. Die Membran wurde gescannt und digital dokumentiert. Anschließend wurde die Membran zurechtgeschnitten und in TBS unter leichtem Schütteln wieder vollständig entfärbt.

#### Transferpuffer (in H<sub>2</sub>O)

25 mM Tris-HCl

0,1 % SDS

1,5 % Glycin

20 % Methanol

#### Ponceau-Rot-Färbung in H<sub>2</sub>O

0,2 % Ponceau S

3 % Trichloressigsäure

### **2.2.2.5 Immunchemischer Nachweis**

Um spezifische Proteine mithilfe von Antikörpern nachzuweisen, wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran zunächst für eine Stunde mithilfe von 5 % Milchpulver in TBS unter leichtem Schütteln abgesättigt. Zur Entfernung der überschüssigen Block-Reagenz wurde die Membran nochmal mit TBS gewaschen. Die Membran wurde dann mit den spezifischen Primär-Antikörpern, welche in 3 % BSA in TBS-T verdünnt wurden, über Nacht auf einer Wippe bei 4 °C inkubiert. Um die ungebundenen Primär-Antikörper zu entfernen, wurde am darauffolgenden Tag die Membran zweimal für je 5 Minuten bei Raumtemperatur mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit dem jeweiligen Sekundär-Antikörper, der im Vorfeld mit 3 % BSA in TBS-T in einem Verhältnis von 1:150.000 verdünnt worden war, in einer abgedunkelten Box inkubiert. Der Sekundär-Antikörper war gegen die Fc-Region der Primär-Antikörper gerichtet und an einen Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt.

Im Anschluss wurden die ungebundenen Sekundär-Antikörper für je 5 Minuten zweimal mit TBS-T und einmal mit TBS abgewaschen.

Mithilfe des *Odyssey CLx Imaging System* (LI-COR) wurden die gekoppelten Fluorochrome der Sekundär-Antikörper mit einer Wellenlänge von 685 nm bzw. 785 nm angeregt. Hierdurch wurde Licht emittiert, welches vom *Odyssey*-System erfasst und abgebildet werden konnte.

Die jeweilige Bandenintensität wurde mithilfe der Software Programme Fiji bzw. Image Studio quantifiziert, welche die Pixelintensität der einzelnen Banden bestimmen und so die Proteinmenge erfassen können. Zur Berechnung der jeweiligen endogenen

Proteinmenge wurde die jeweilige Bandenintensität zunächst auf die GAPDH-Bandenintensität normiert und anschließend in Relation zu der entsprechenden Kontrolle, die gleich 1 gesetzt wurde, dargestellt.

Zur statistischen Auswertung wurde mithilfe von „Microsoft® Excel 2019“ der Einstichproben-t-Test mit einer *one-tailed hypothesis* und einem  $\alpha$  von 0,05 durchgeführt.

## 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.3.1 Transformation und Kultivierung von Bakterien

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurden zunächst 200  $\mu$ l kompetente E. coli Bakterien auf Eis aufgetaut und in ein Reaktionsgefäß gegeben. In dieses wurde 100  $\mu$ l kalter TCM-Puffer gemeinsam mit ca. 0,4  $\mu$ g Plasmid-DNA hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis, erfolgte zur DNA-Aufnahme ein Hitzeschock für drei Minuten bei 42 °C. Der Vorgang wurde durch die sofortige anschließende einminütige Abkühlung auf Eis gestoppt. Daraufhin wurden den Bakterien 0,7 ml LB-Medium hinzugegeben und für 40 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden danach auf einem Selektionsmedium ausplattiert, indem 200  $\mu$ l der Suspensionslösung auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum gleichmäßig verteilt wurde. Zur Ausbildung von Bakterienkolonien wurde die Platte über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank gelagert. Anschließend wurde eine Kolonie in Antibiotikahaltigem LB-Flüssigkeitsmedium für etwa vier bis acht Stunden kultiviert und anschließend in 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt. Zur Vermehrung wurde sie über Nacht bei 37 °C in einem Bakterienschüttler inkubiert.

#### TCM-Puffer (in H<sub>2</sub>O)

10 mM Tris-HCl pH 7,5

10 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM MgCl<sub>2</sub>

#### LB-Flüssigkeitsmedium (in H<sub>2</sub>O)

1 % Trypton

0,5 % Hefextrakt

1 % NaCl

#### LB-Agar-Medium (in H<sub>2</sub>O)

1 % Trypton

0,5 % Hefextrakt

1 % NaCl

1,5 % Agar in LB-Medium

### **2.2.3.2 MIDI Plasmid Präparation**

Nach Vermehrung der Plasmid-DNA in den Bakterien wurde diese mithilfe des DNA-midi *GT Plasmid DNA Purification Kits* isoliert. Um die DNA weiter aufzukonzentrieren, wurde das NucleoBond® *Finalizer Kit* eingesetzt.

Alle Arbeitsschritte sind nach Herstellerangaben durchgeführt worden.

### **2.2.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration ist photometrisch mithilfe des NanoDrop ND1000 Spektrophotometers erfolgt.

Zur Initialisierung des Gerätes wurden zunächst 1-2 µl H<sub>2</sub>O auf den Messpunkt des Gerätes aufgetragen. Zur Messung der DNA-Proben wurden 1-2 µl der Probe auf den Messpunkt aufgetragen und analysiert. Dies erfolgte durch die photometrische Messung des Lichts bei einer Wellenlänge von 260 nm sowie 280 nm beim Durchlaufen der Probe. Zur Überprüfung der Reinheit der DNA wurde das 260/280-Verhältnis berechnet, welches die Reinheit der Probe anzeigt. Dieses Verhältnis sollte bei 1,8 liegen, starke Abweichung zeigen eine Kontamination mit Proteinen oder Lösungsmitteln an.

## 3 Ergebnis

### 3.1 TGF- $\beta$ 1 beeinflusst die EMT in A549-Zellen

#### 3.1.1 TGF- $\beta$ 1-abhängige Phosphorylierung von Smad2

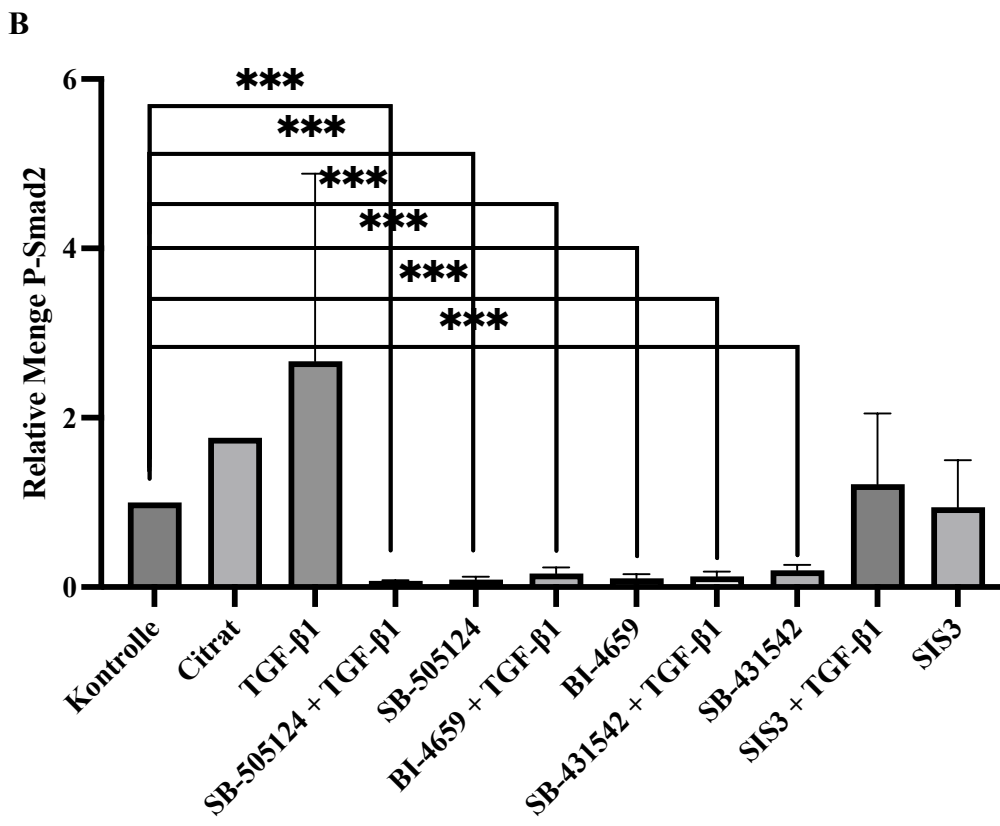
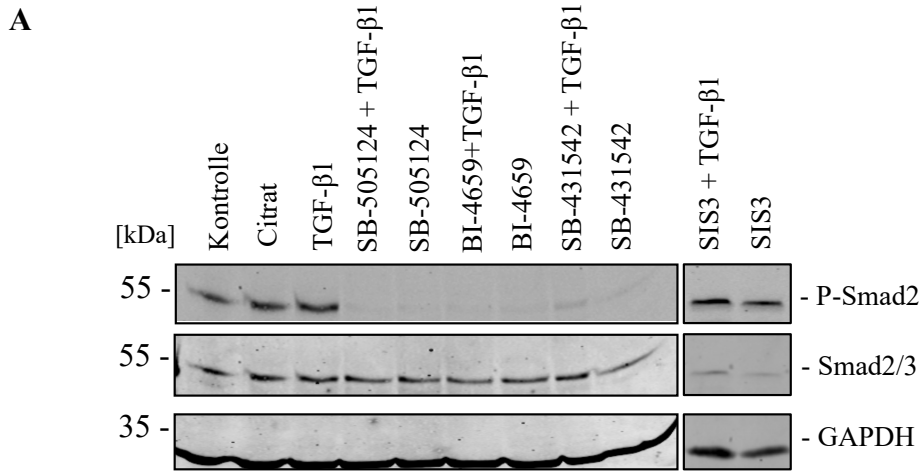
Die Analyse des Einflusses auf die Phosphorylierung von Smad2 in A549-Zellen von TGF- $\beta$ 1, BI-4659, SB-431542 erfolgte in **vier** unabhängig durchgeführten Versuchsreihen, während der Einfluss von SB-505124 und SIS3 in **drei** voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen untersucht wurde. Hierbei wurden die Zellen mit den Reagenzien aus Tabelle 5 für 72 Stunden inkubiert. Zum Vergleich wurde die Gesamtmenge von Smad2/3 mithilfe eines Standardantikörpers im Western Blot erfasst. Ein repräsentativer Western Blot ist in Abbildung 5A dargestellt. Die quantitative Auswertung erfolgte anhand der gemittelten densitometrischen Messungen der Phospho-Smad2-Banden und ist in Abbildung 5B dargestellt. Die Auswertung erfolgte jeweils im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen.

Citrat wurde als Lösungsmittel für TGF- $\beta$ 1 verwendet und diente als Kontrollsubstanz, um zu überprüfen, ob das alleinige Einbringen dieser Substanz A549-Zellen beeinflussen kann. Die Menge an phosphoryliertem Smad2 (P-Smad2) in Citrat-behandelten Zellen wurde in zwei unabhängigen Versuchen gemessen. Hierbei ergab ein Versuch eine 2-fache und ein weiterer eine 1,4-fache Erhöhung P-Smad2-Menge.

In den TGF- $\beta$ 1-behandelten Zellen wurde eine hohe Spannweite der jeweils gemessenen Mengen an phosphoryliertem Smad2 beobachtet. Im Durchschnitt zeigte sich 2,7-fach erhöhte P-Smad2-Menge mit einer Standardabweichung von  $\pm 2,2$ . Der durchgeführte t-test ergab hierbei keine Signifikanz (Abb. 5A, Spuren 1-3).

SB-431542, SB-505124 und BI-4659 führten einzeln sowie jeweils in Kombination mit TGF- $\beta$ 1 in allen vier durchgeführten Versuchen zu einer deutlichen Reduktion der P-Smad2-Menge.

Die Behandlung mit dem Inhibitor SIS3 bewirkte in zwei von drei durchgeführten Versuchen zu einer jeweiligen Reduktion von etwa 50 % und 30 %. In einem weiteren Versuch kam es zu einer 1,5-fachen Erhöhung der P-Smad2-Menge. Bei der kombinierten Behandlung von SIS3 und TGF- $\beta$ 1 wurde in einem Versuch eine 2-fache Erhöhung und in zwei Versuchen eine Reduktion um 10 % bzw. 50 % detektiert.

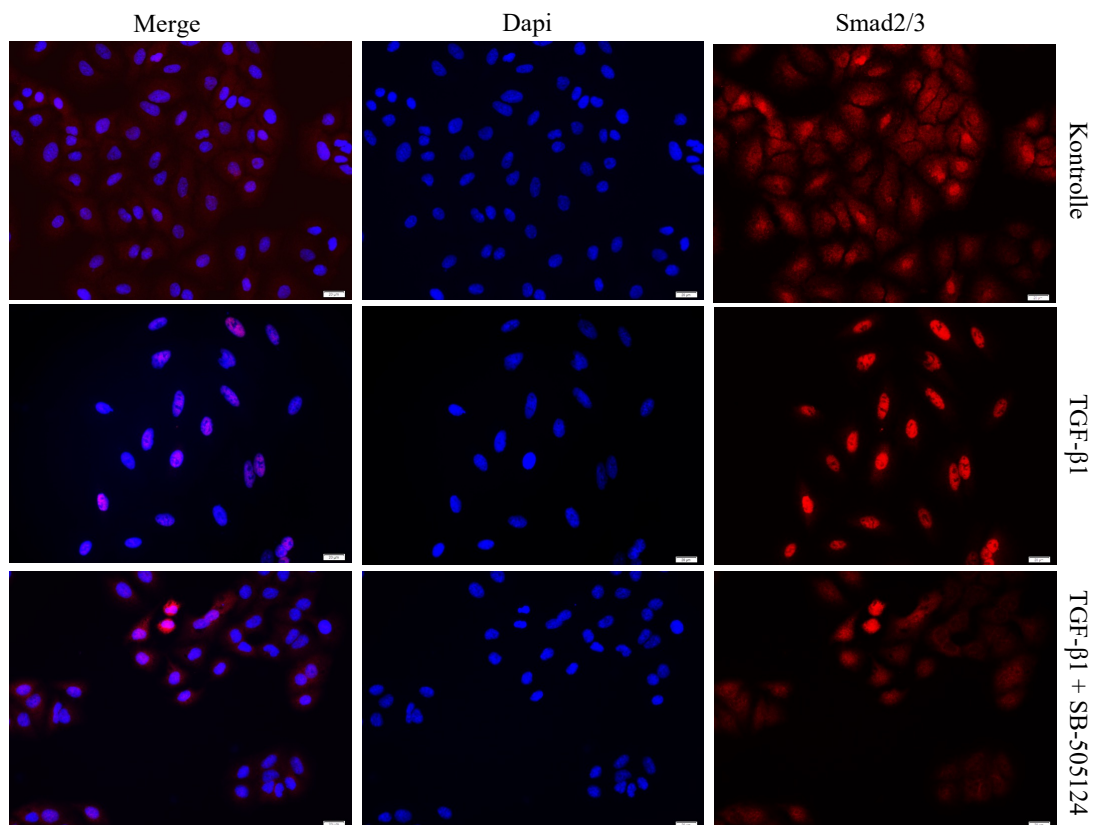


**Abbildung 5: Analyse der phosphorylierten Smad2 Menge in A549 Zellen**

A: Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot zur Charakterisierung der Smad2-Phosphorylierung in A549-Zellen. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit 0,02 mM Citrat, 0,01 µg/ml TGF-β1, je 1 nM SB-431542, SB-505124, BI-4659 und 0,5 nM SIS3 jeweils ± TGF-β1 behandelt. Während Smad2/3 in allen Zellen detektiert wird, kann die phosphorylierte Form von Smad2 lediglich in den Kontrollzellen sowie in den mit Citrat, TGF-β1 oder SIS3 ± TGF-β1-behandelten Zellen ermittelt werden. Die GAPDH-Färbung diente zum Nachweis einer gleichmäßigen Beladung der einzelnen Spuren.

B: Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus bis zu vier Versuchen dargestellt. Die Behandlung mit Citrat wurde in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt, daher ist an dieser Stelle auf eine Darstellung der Standardabweichung verzichtet worden. Verglichen mit den Kontrollzellen konnte in den mit TGF-β1-stimulierten Zellen eine vermehrte Phosphorylierung von Smad2 erfasst werden, die jedoch aufgrund von Abweichungen zwischen den einzelnen Ergebnissen der durchgeführten Versuche statistisch nicht signifikant war. SB-431542, SB-505124 und BI-4659 jeweils +/- TGF-β1 bewirkten eine signifikante Verringerung der Proteinmenge an phosphoryliertem im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Signifikanz wurde mit einem Einstichproben-t-Test ermittelt. \*\*\*p < 0,001

Zur Darstellung einer TGF- $\beta$ 1-abhängigen Lokalisationsänderung von Smad2/3 wurden A549-Zellen in drei unabhängigen Versuchen immunocytochemisch untersucht (Abb. 6). Hierzu wurden die Zellen für 48 Stunden mit TGF- $\beta$ 1  $\pm$  SB-505124 inkubiert und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt. In den unbehandelten Kontrollzellen konnten Smad2/3 sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma lokalisiert werden, wobei sich der überwiegende Teil im Cytoplasma befand. Nach Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 wurden Smad2/3 vermehrt im Zellkern beobachtet und konnten kaum noch im Cytoplasma detektiert werden. Im Gegensatz dazu befand sich der Großteil des Smad2/3-Signals in SB-505124 und TGF- $\beta$ 1-behandelten Zellen im Cytoplasma und ein geringer Anteil im Zellkern. Insgesamt ähnelte diese Färbung der Kontrollfärbung.



**Abbildung 6: Immunocytochemische Analyse der Smad2/3-Lokalisation in A549 Zellen**

In der immunhistochemischen Färbung konnte gezeigt werden, dass Smad2/3 in den Kontrollzellen im Cytoplasma und schwach im Zellkern nachweisbar sind. Nach TGF- $\beta$ 1-Induktion wird Smad2/3 vermehrt in den Zellkern verlagert. Die Behandlung von TGF- $\beta$ 1 mit SB-505124 zeigt sich eine ähnliche Verteilung von Smad2/3 wie in den Kontrollzellen. Eine zusätzliche Überlagerung von Smad2/3 und Dapi sind als Merge dargestellt.

Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Repräsentative Bilder sind hier dargestellt worden. Der Maßstab repräsentiert eine Länge von 20  $\mu$ m.

### **3.1.2 TGF- $\beta$ 1-induzierte Umverteilung von E-Cadherin**

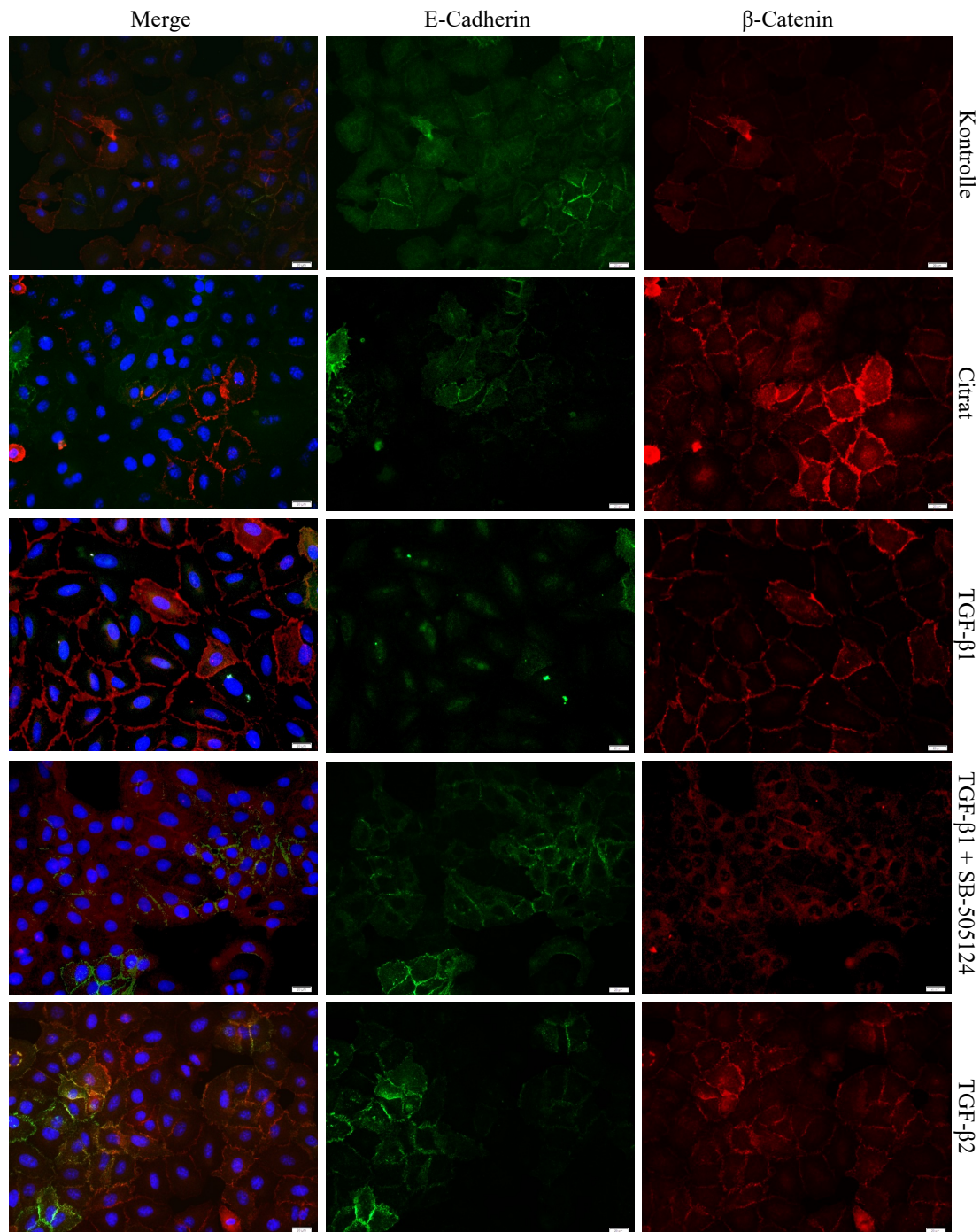
Der Einfluss von TGF- $\beta$ 1  $\pm$  SB-505124 und TGF- $\beta$ 2 auf die Lokalisation von E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin in A549-Zellen wurde in drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen untersucht. Citrat diente hierbei als zusätzliche Negativkontrolle. Nach einer 48-stündigen Inkubationszeit der Stimulationsreagenzien wurden die Zellen fixiert und immunhistochemisch analysiert. In Abbildung 7 sind repräsentative Bilder der erfassten E-Cadherin- und  $\beta$ -Catenin-Signale dargestellt.

Die mikroskopische Untersuchung der unbehandelten Kontrollzellen zeigte das E-Cadherin-Signal im Bereich der Zellmembran.  $\beta$ -Catenin wurde vor allem in jenen Bereichen der Zellmembran ohne E-Cadherin-Signal detektiert. Dies wird besonders in den überlagerten Bildern (Merge) der jeweiligen Signale in Abbildung 7 deutlich.

Bei den mit Citrat behandelten Zellen konnte das E-Cadherin-Signal ebenfalls in der Zellmembran erfasst und analog zu den Kontrollzellen wurde das  $\beta$ -Catenin-Signal an der Zellmembran bzw. vermehrt an jenen Bereichen detektiert, in welchen sich kein E-Cadherin-Signal befand.

Die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 induzierte ein verringertes E-Cadherin-Signal in der Zellmembran im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen und den mit Citrat behandelten Zellen. Das E-Cadherin-Signal wurde hierbei verstärkt im Cytoplasma beobachtet. Das  $\beta$ -Catenin-Signal war weiterhin an der Zellmembran vorhanden.

Die Behandlung von TGF- $\beta$ 1 mit SB-505124 oder TGF- $\beta$ 2 führte in den jeweiligen Zellen zu einer ähnlichen Verteilung der E-Cadherin- und  $\beta$ -Catenin-Signale wie in den Kontroll- und den mit Citrat behandelten Zellen. Hierbei wurde das E-Cadherin-Signal ebenfalls in der Zellmembran detektiert, während das  $\beta$ -Catenin-Signal auch an jenen Bereichen in der Zellmembran lokalisiert war, an denen sich das E-Cadherin-Signal nicht befand.



**Abbildung 7: Immuncytochemische Analyse der E-Cadherin- und  $\beta$ -Catenin-Lokalisation in A549-Zellen**

Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Hierbei wurden die E-Cadherin- und  $\beta$ -Catenin-Signale in unbehandelten Kontrollzellen und nach Behandlung mit Citrat, TGF- $\beta$ 1  $\pm$  SB-505124 und TGF- $\beta$ 2 erfasst. Die E-Cadherin- und  $\beta$ -Catenin-Signale sind jeweils einzeln als auch kombiniert (Merge) abgebildet worden. In den Kontroll- sowie in den mit Citrat und TGF- $\beta$ 2 behandelten Zellen befindet sich das E-Cadherin-Signal in der Zellmembran der Zellen. Das  $\beta$ -Catenin-Signal kommt jenen an Stellen vor, an denen E-Cadherin nicht lokalisiert ist. In TGF- $\beta$ 1-behandelten Zellen wird das E-Cadherin-Signal zunehmend im Cytoplasma detektiert. Nach Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 und SB-505124 befindet sich E-Cadherin in der Zellmembran. Der Maßstab repräsentiert eine Länge von 20  $\mu$ m.

Mithilfe des Western Blots wurde die Proteinmenge von E-Cadherin nach Stimulation mit den in Tabelle 5 genannten Stimulationsreagenzien zuzüglich 10 ng/ml TGF- $\beta$ 2 in A549-Zellen untersucht. Hierbei wurden sechs voneinander unabhängige Versuche mit Inkubationszeiten zwischen 24 und 72 Stunden durchgeführt. In Abbildung 8A ist ein Western Blot nach 72-stündiger Inkubationszeit dargestellt. Die erfasste Proteinmenge von E-Cadherin nach Behandlung des jeweiligen Stimulationsreagenz wurde anschließend auf die entsprechende E-Cadherin-Menge in den Kontrollzellen normiert. Zur Vereinfachung der einzelnen Auswertung wurden die unterschiedlichen Inkubationszeiten zusammengefasst und analysiert (Abb. 8B). Diese Vereinfachung führte zu einer größeren Stichprobenzahl.

An dieser Stelle wird näher auf die Auswirkungen der Proteinmenge von E-Cadherin nach Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 und BI-4659 im Vergleich zu den Kontrollzellen eingegangen.

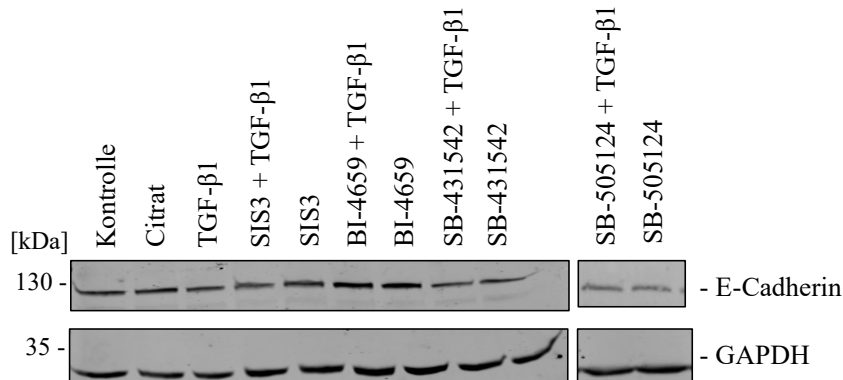
Die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 bedingte nach 24-stündiger Inkubationszeit eine 1,5-fache Erhöhung der E-Cadherin-Menge. Die beiden Versuche nach 48-stündiger Inkubation führten zu einer 1,2-fachen Erhöhung und zu einer ca. 30%igen Reduktion der E-Cadherin-Menge. Nach 72 Stunden Inkubation wurde eine Reduktion um ca. 13 % und 98 % der E-Cadherin-Menge festgestellt. Ein weiterer ergab nahezu keine Änderung.

Der Zusammenhang zwischen Inkubationszeit von TGF- $\beta$ 1 mit der Menge an E-Cadherin wurde durch die Berechnung des Korrelationskoeffizienten erfasst. Hierbei ergab sich ein Korrelationskoeffizient von etwa -0,64. Ein Streudiagramm mit entsprechender Regressionsgerade ist in Abbildung 9 dargestellt.

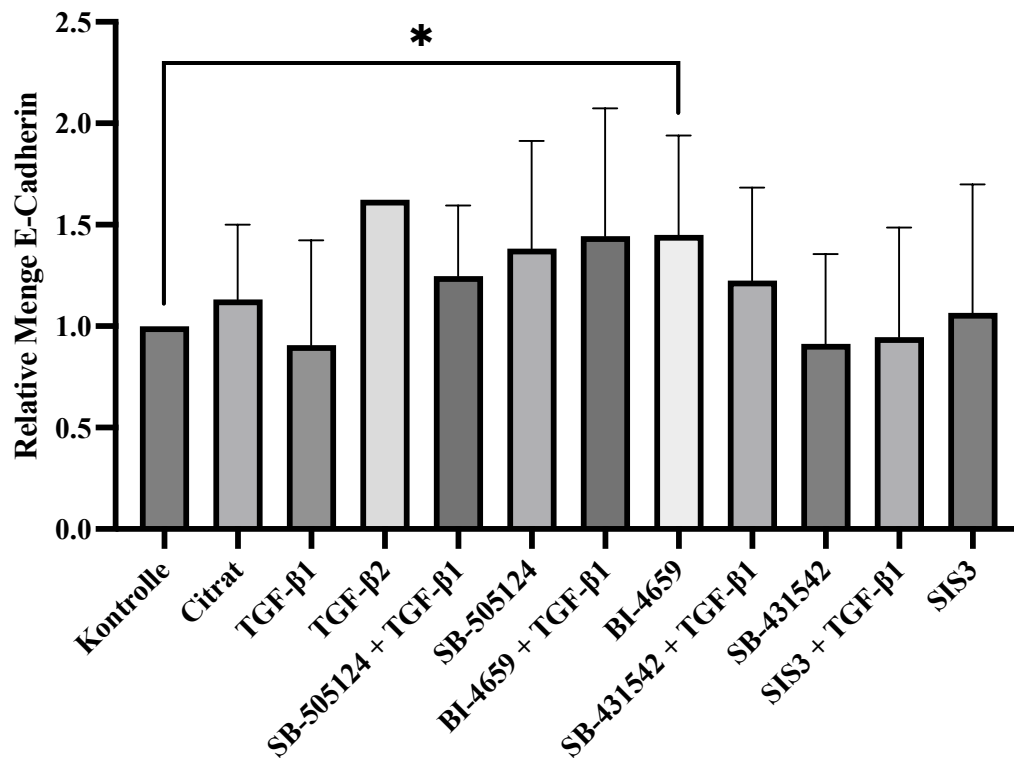
Die Behandlung mit BI-4659 führte in fünf von sechs durchgeführten Versuchen zu einer 1,2- bis 2,3-fachen Vermehrung der Proteinmenge an E-Cadherin. Ein Versuch führte zu einer Reduktion von etwa 13 %. Insgesamt konnte nach Behandlung mit BI-4659 eine signifikante mittlere Erhöhung der E-Cadherin-Menge um das 1,5-fache ( $SD \pm 0,5$ ) ermittelt werden.

Die Untersuchung der weiteren Stimulationsreagenzien zeigte teils hohe Schwankungen der Ergebnisse untereinander. In den einzelnen Versuchsreihen wurden sowohl erhöhte oder als reduzierte Mengen an E-Cadherin gemessen, sodass für diese keine signifikanten Änderungen beobachtet werden konnten.

A



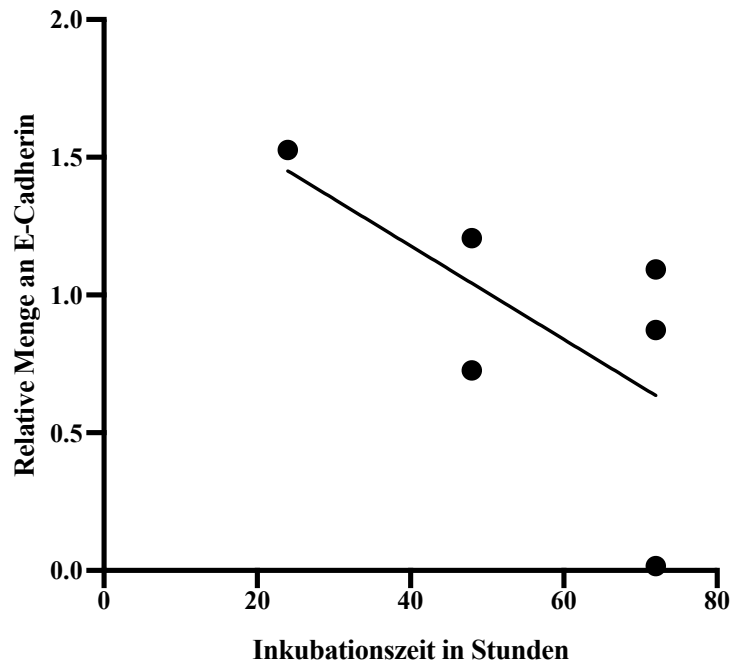
B



**Abbildung 8: Western-Blot Analyse von E-Cadherin in A549-Zellen**

A: Repräsentativer Western Blot zur Charakterisierung der Proteinmenge von E-Cadherin in A549-Zellen nach 72-stündiger Inkubationszeit mit 0,02 mM Citrat, 10 ng/ml TGF-β1, je 0,001 mM SB-431542, SB-505124, BI-4659 und SIS3 jeweils ± TGF-β1 sowie 10 ng/ml TGF-β2. Die GAPDH-Färbung diente zum Nachweis einer gleichmäßigen Beladung der einzelnen Spuren.

B: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus bis zu sechs Versuchen. Die relative Proteinmenge von E-Cadherin ist jeweils auf die Kontrollzellen normiert. Die Behandlung mit TGF-β2 wurde in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt worden, daher ist an dieser Stelle auf eine Darstellung der Standardabweichung verzichtet worden. Es zeigte sich eine hohe Spannweite der Ergebnisse nach Behandlung mit den unterschiedlichen Reagenzien. Es ergab sich eine signifikante Erhöhung der mittleren E-Cadherin-Menge bei den BI-4659-behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Signifikanz wurde mit einem Einstichproben-t-Test ermittelt. \*p < 0,05



**Abbildung 9: E-Cadherin-Menge im Vergleich zur Inkubationszeit mit Regressionsgrade**

Die einzelnen Punkte geben die gemessene Menge an E-Cadherin nach TGF- $\beta$ 1-Behandlung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in A549-Zellen an. Die Inkubationszeiten lagen jeweils bei 24, 48 und 72 Stunden. Es wurde ein Korrelationskoeffizient von etwa -0,64 berechnet. Im Diagramm ist die Regressionsgerade dargestellt. Es zeigte sich, dass bei längerer Inkubationszeit von TGF- $\beta$ 1 die Menge an E-Cadherin abnimmt.

### 3.1.3 TGF- $\beta$ 1 verändert die Proteinmenge von Vimentin

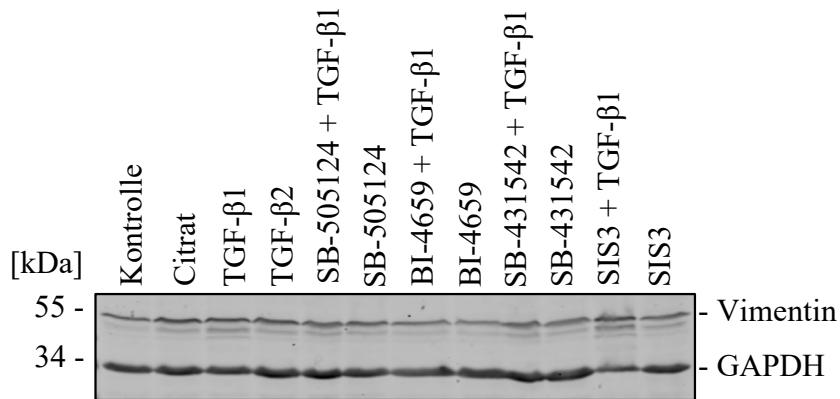
Die Proteinmenge von Vimentin in A549-Zellen wurde in unbehandelten Kontrollzellen sowie nach Behandlung mit den in Tabelle 5 genannten Reagenzien zuzüglich 10 ng/ml TGF- $\beta$ 2 im Western Blot bestimmt. Es wurden fünf unabhängige Versuche mit Inkubationszeiten zwischen 24 und 72 Stunden durchgeführt. Abbildung 10A zeigt einen Western Blot nach 72-stündiger Inkubationszeit. Die densitometrische Auswertung wurde in Abbildung 10B dargestellt.

Im Vergleich zu den Kontrollzellen führte die Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 zu einer 1,8-fachen Zunahme der Proteinmenge von Vimentin, während die Behandlung mit SB-505124 eine etwa 30%igen verringerten Proteinmenge bedingte.

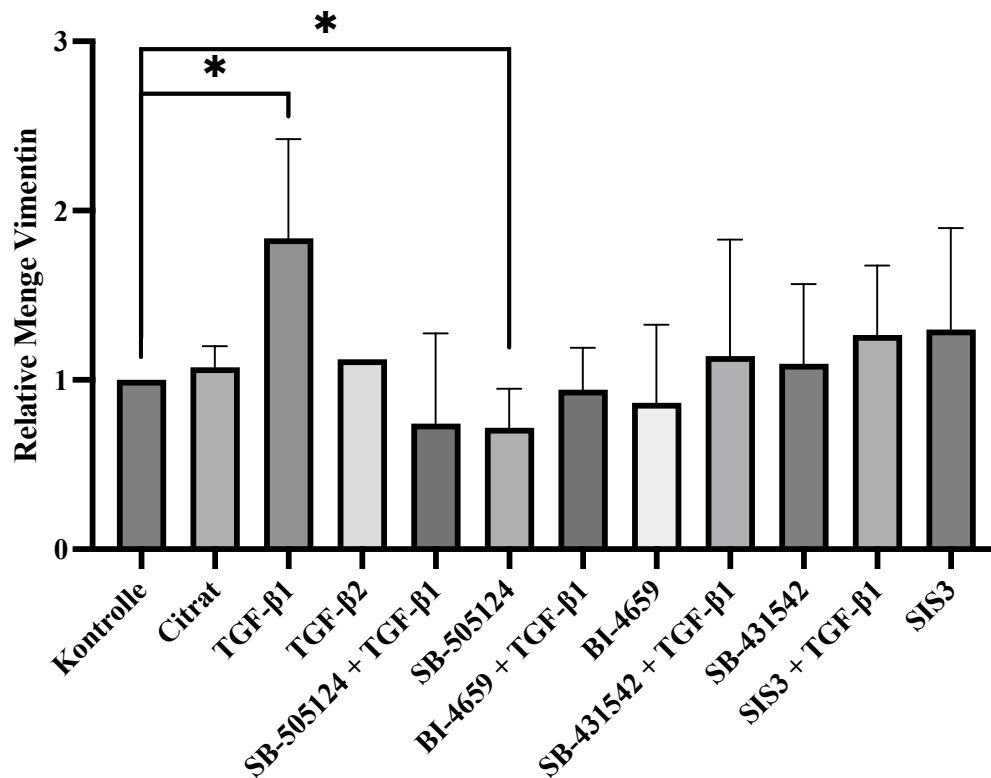
Für die weiteren Stimulationsreagenzien konnte keine eindeutige Änderung der Vimentin-Menge ermittelt werden. Unabhängig von der entsprechenden Inkubationszeit zeigten sich in den einzelnen Versuchsreihen sowohl erhöhte als auch reduzierte Vimentin-Mengen.

TGF- $\beta$ 2 wurde in einem Versuch untersucht. Hierbei zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine geringfügige Zunahme der Proteinmenge von Vimentin in den Zellen.

A



B



**Abbildung 10: Western Blot Analyse von Vimentin in A549-Zellen**

A: Es ist ein repräsentativer Western Blot nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden dargestellt. Die Proteinmenge von Vimentin in TGF-β1-behandelten Zellen nahm im Vergleich zu den Kontrollzellen zu. Die GAPDH-Färbung diente als Beladungskontrolle.

B: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen aus bis zu fünf voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Die quantitative Analyse der Proteinmenge von Vimentin ergab, dass im Vergleich zu den Kontrollzellen die Behandlung mit TGF-β1 zu einer erhöhten und der Inhibitor SB-505124 zu einer verringerten Proteinmenge von Vimentin führte. Die weiteren Stimulationsreagenzien zeigten keine eindeutigen Auswirkungen auf die Vimentin-Menge. Die Signifikanz wurde mit einem Einstichproben-t-Test ermittelt. \*p < 0,05.

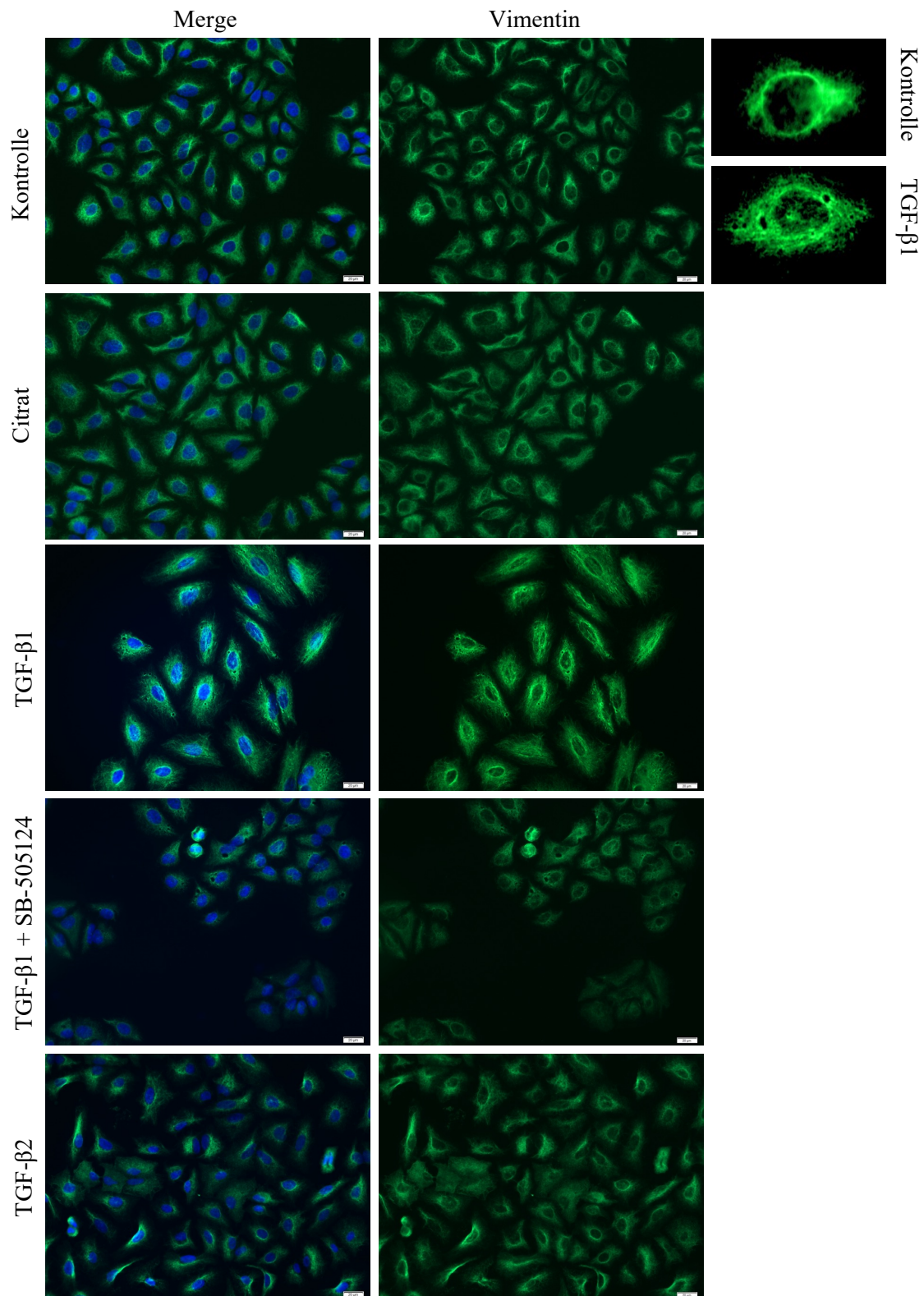
Die Auswirkungen der Behandlung mit Citrat, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 oder TGF- $\beta$ 1 mit SB-505124 auf das Vimentinfilamentnetzwerk in A549-Zellen wurden im Rahmen von drei unabhängig voneinander durchgeführten immunocytochemischen Versuchen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Citrat wurde, wie in den Versuchen zuvor, als Negativkontrolle genutzt.

Sowohl in den unbehandelten Kontrollzellen als auch in den mit Citrat behandelten Zellen war das Vimentinfilamentnetz vor allem um den Zellkern gelagert und wies eher kurze Filamente auf.

Die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 führte zu einer deutlichen Veränderung des Aufbaus und der Verteilung des Vimentinfilamentnetzwerks. Es zeigte im Vergleich zu den Kontroll- und den Citrat-behandelten Zellen deutlich längere und verzweigtere Filamente, die sich über die ganze Zelle bis in deren Peripherie verteilten.

Das Vimentinfilamentnetzwerk in Zellen, welche mit TGF- $\beta$ 1 + SB-505124 behandelt wurden, war ähnlich vor allem um den Zellkern gelagert und wies im Vergleich zu den mit TGF- $\beta$ 1 behandelten Zellen kürzere Filamente auf. Insgesamt ähnelte der Aufbau den Kontrollzellen und Citrat-behandelten Zellen.

Die Behandlung mit TGF- $\beta$ 2 führte ebenfalls zu einem ähnlichen Strukturaufbau der Vimentinfilamente wie in den Kontroll- und mit Citrat behandelten Zellen.



**Abbildung 11: Immuncytochemischer Nachweis der Lokalisation von Vimentin in A549-Zellen**

Abgebildet sind repräsentative Bilder aus drei voneinander unabhängig durchgeführten immunhistochemischen Versuchen. Während bei den Kontroll- und Citrat-behandelten Zellen Vimentin vor allem in der Nähe des Zellkerns konzentriert ist, bildet es nach TGF-β1-Behandlung ein größeres und verzweigteres Netzwerk mit mehr Filamenten aus, welches deutlich verlängert erscheint und bis in die Zellperipherie ragt. Zum besseren Vergleich ist sowohl eine vergrößerte Aufnahme einer unbehandelten Kontroll- als auch einer TGF-β1-behandelten Zelle rechts neben der Abbildung eingefügt. Das Vimentinfilamentnetzwerk in SB-505124 mit TGF-β1 und TGF-β2 behandelten Zellen ähnelt in seinem Aufbau den Kontrollzellen. Der Maßstabblock repräsentiert eine Länge von 20 µm.

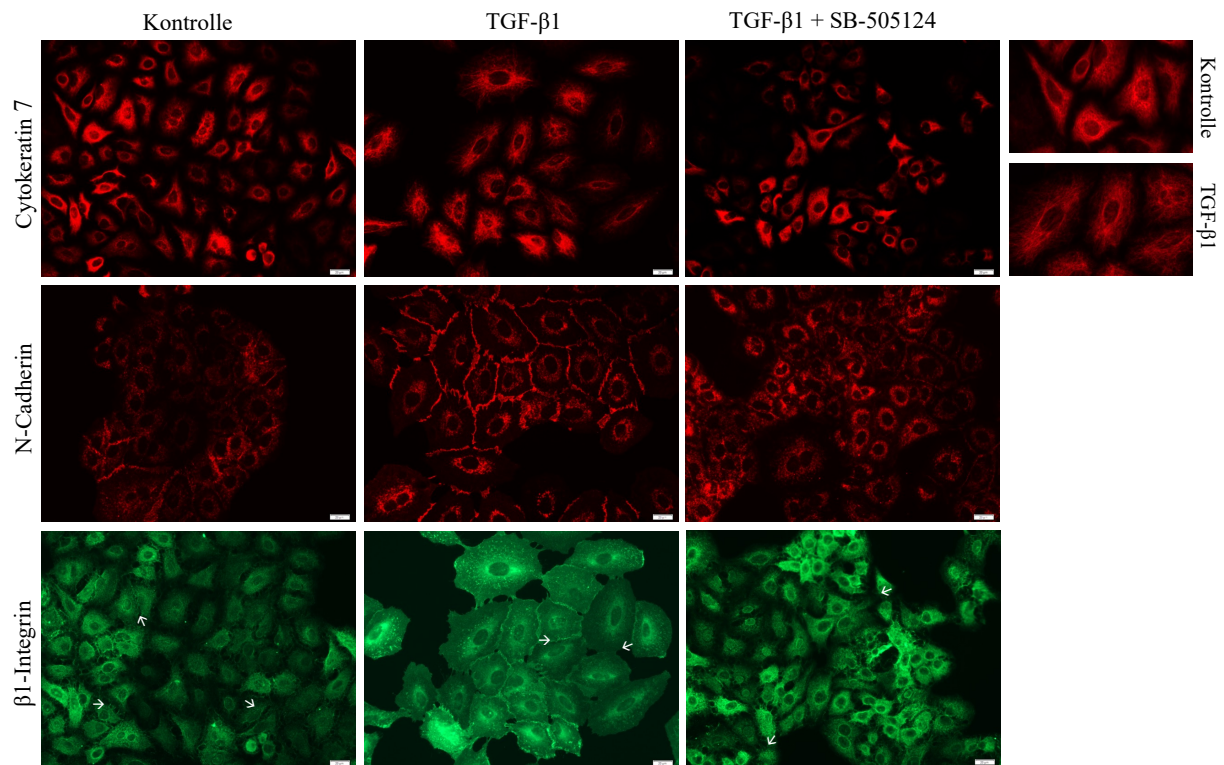
### **3.1.4 Immuncytochemische Analyse von weiteren EMT-Markerproteinen**

Um die strukturellen Veränderungen unterschiedlicher EMT-Markerproteine in A549-Zellen durch die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 sowie in Kombination mit SB-505124 zu ermitteln, wurde die Lokalisation von Cytokeratin 7, N-Cadherin und  $\beta$ 1-Integrin in drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen immuncytochemisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

Cytokeratin-Filamente waren in den unbehandelten Kontrollzellen dicht um den Zellkern konzentriert. Bei Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 konnten verlängerte Filamente dargestellt werden, welche bis in das periphere Cytoplasma hineinreichten und breitere Netze ausbildeten. Im Vergleich zu den Kontrollzellen waren die Filamente weniger stark im Zentrum konzentriert. Nach kombinierter Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 und SB-505124 waren die Cytokeratin-Filamente ähnlich wie bei den Kontrollzellen dicht im Zentrum der Zelle konzentriert.

In den unbehandelten Kontrollzellen wurde N-Cadherin in der Zellmembran detektiert. Im Vergleich zu diesen ist N-Cadherin in TGF- $\beta$ 1-induzierten Zellen vermehrt im Bereich der Zellkontakte zwischen den Zellen sichtbar geworden. Während N-Cadherin in den Kontrollzellen nur in der Zellmembran einiger Zellen beobachtet wurde, war es in fast allen Zellmembranen der mit TGF- $\beta$ 1 behandelten Zellen vorhanden. Die kombinierte Behandlung von TGF- $\beta$ 1 und SB-505124 führte im Vergleich zu den mit TGF- $\beta$ 1 behandelten Zellen zu einer verringerten N-Cadherin-Menge in der Zellmembran.

In den Kontrollzellen konnte eine schwache Membranfärbung von  $\beta$ 1-Integrin erkannt werden (vgl. Pfeile in Abb. 12). Nach Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 war  $\beta$ 1-Integrin verstärkt in der Zellmembran einzelner Zellen lokalisiert. Die Anordnung von  $\beta$ 1-Integrin ähnelte bei den mit TGF- $\beta$ 1 + SB-505124 behandelten Zellen eher der Kontrollfärbung.



**Abbildung 12: Lokalisation von EMT-Markerproteinen in A549-Zellen nach TGF- $\beta$ 1-Behandlung**  
 Repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen sind ausgewählt worden. Während bei den Kontrollzellen das Cytokeratin-Skelett eher dicht um den Zellkern konzentriert ist, sind die Filamente nach TGF- $\beta$ 1-Behandlung weiter ausgebreitet und weniger im Zentrum der Zelle konzentriert. Eine Abbildung mit höherer Vergrößerung ist rechtsseitig eingefügt. Nach Behandlung mit SB-505124 und TGF- $\beta$ 1 ähnelt die Verteilung des Cytokeratin-Skeletts dem der Kontrollzellen.  
 N-Cadherin wird nach Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu den Kontrollzellen vermehrt in der Zellmembran detektiert. Die Lokalisation von N-Cadherin ähnelt nach kombinierter Behandlung von TGF- $\beta$ 1 mit SB-505124 den Kontrollzellen.  
 $\beta$ 1-Integrin erstreckt sich in den Kontrollzellen über die ganze Zelle. Nach Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 ist  $\beta$ 1-Integrin verstärkt in der Zellmembran einzelner Zellen konzentriert. Bei der kombinierten Behandlung von TGF- $\beta$ 1 mit SB-505124 ähnelt die Anordnung von  $\beta$ 1-Integrin den Kontrollzellen. Der Maßstabbalken repräsentiert eine Länge von 20  $\mu$ m.

### 3.2 Analyse diverser EMT-Markerproteine in transfizierten A549-Zellen

Der Einfluss der Transkriptionsfaktoren ZEB1, Sip1, Slug, Snail und Twist auf die EMT-Markerproteine Cytokeratin 7, Vimentin, E-Cadherin, N-Cadherin, ESRP1, ESRP2 und  $\beta$ -Catenin wurde in A549-Zellen untersucht. Hierfür wurden die genannten Transkriptionsfaktoren jeweils in zwei bis vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen in den Zellen überexprimiert.

Die DNA der Transkriptionsfaktoren wurde mithilfe von Plasmiden in die Zellen integriert. Für die Auswertung wurden Kontrollzellen genutzt, in denen jeweils ein leeres Plasmid (pEGFP) ohne zusätzliche DNA eingeführt worden war. Die Transfektionseffizienz der Zellen betrug etwa 10 - 20 %. Diese wurde unter dem

Fluoreszenzmikroskop überprüft. Nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation wurden die Zellen lysiert und mithilfe eines Western Blots analysiert.

Unabhängig vom jeweils analysierten Protein unterschied sich die Varianz innerhalb der durchgeführten Versuche teilweise stark, wodurch sich eine hohe Standardabweichung ergab. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle auf die Darstellung der Primärdaten verzichtet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der untersuchten Proteinmengen sind jeweils als Balkendiagramm in Abbildung 13 dargestellt.

Die Überexpression von Sip1 und Twist führte zu einer signifikanten Verminderung der relativen Proteinmenge von Vimentin (siehe Abb. 13A). Sip1 bewirkte hierbei eine etwa 30%ige Reduktion ( $SD \pm 10\%$ ) der Vimentin-Menge, während Twist zu einer 40%igen Reduktion ( $SD \pm 25\%$ ) führte. ZEB1 konnte keine wesentliche Änderung bewirken. Slug führte im Mittel zu einer 20%igen Reduktion, die jedoch aufgrund der Standardabweichung von  $\pm 30\%$  nicht signifikant war. Diese war durch einen Ausreißer bedingt. Zu einem ähnlichen Ergebnis führte die Überexpression von Snail. Hierbei kam es zu einer etwa 30%igen Reduktion, die aufgrund einer Standardabweichung von  $\pm 25\%$  jedoch nicht signifikant war.

Die relative Proteinmenge von Cytokeratin 7 wurde durch die Überexpression von Snail und Twist signifikant vermindert (siehe Abb. 13B). Durch Snail konnte eine mittlere Reduktion von 25 % ( $SD \pm 17\%$ ) beobachtet werden. Twist konnte die relative Cytokeratin 7-Menge im Durchschnitt ebenfalls um 17 % senken ( $SD \pm 20\%$ ). Die ZEB1-, Sip1- oder Slug-Überexpression konnte keine signifikante Änderung bewirken. Die Überexpression von ZEB1, Sip1, Slug, Snail und Twist führte zu keiner signifikanten Änderung der Proteinmengen von E-Cadherin, N-Cadherin,  $\beta$ -Catenin oder ESRP1 (siehe Abb. 13C-F).

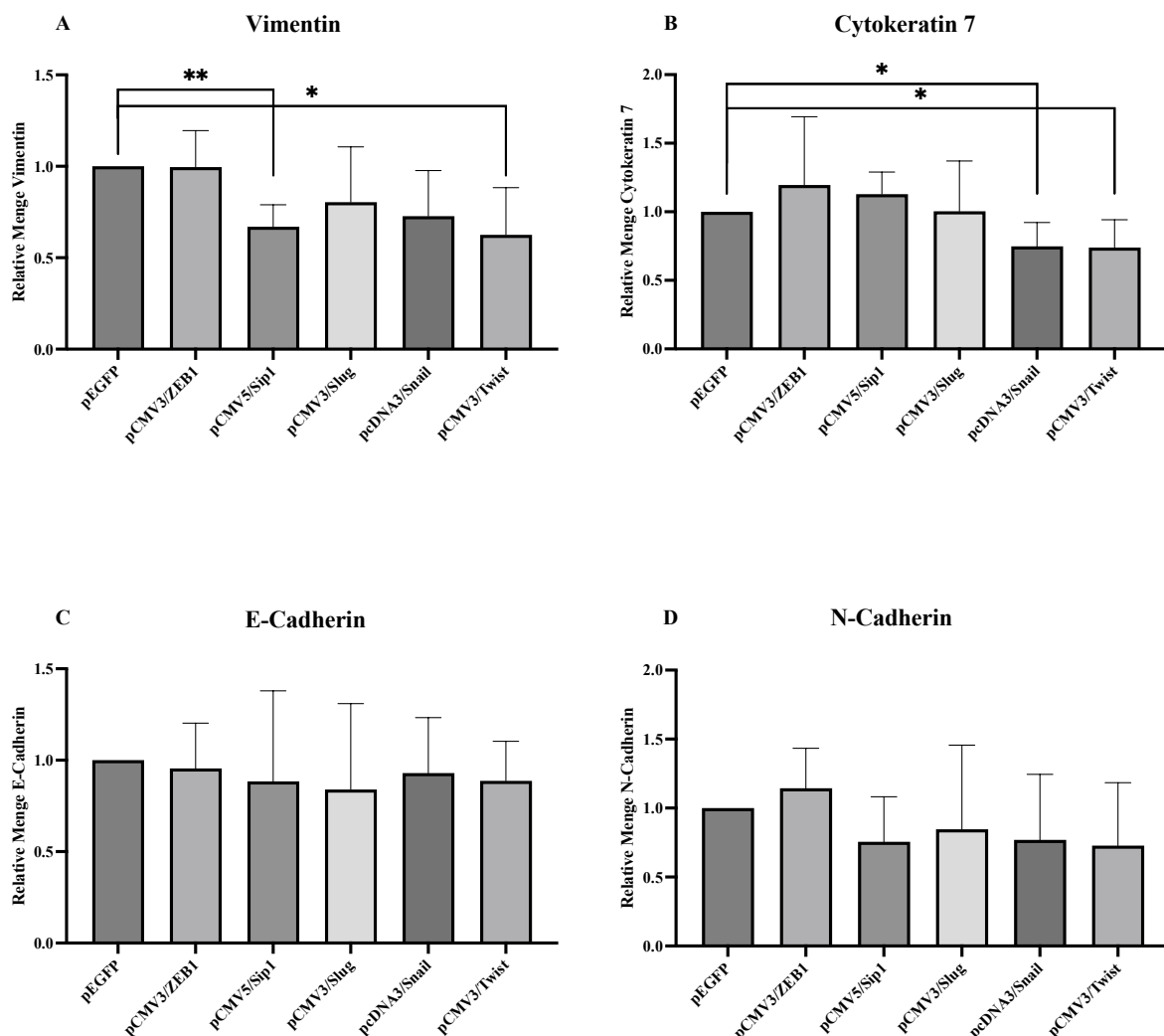
Die genannten Transfektionsfaktoren führten zu einer leichten Reduktion der E-Cadherin- und N-Cadherin-Menge, die jedoch u.a. aufgrund der jeweiligen Standardabweichungen statistisch nicht relevant waren.

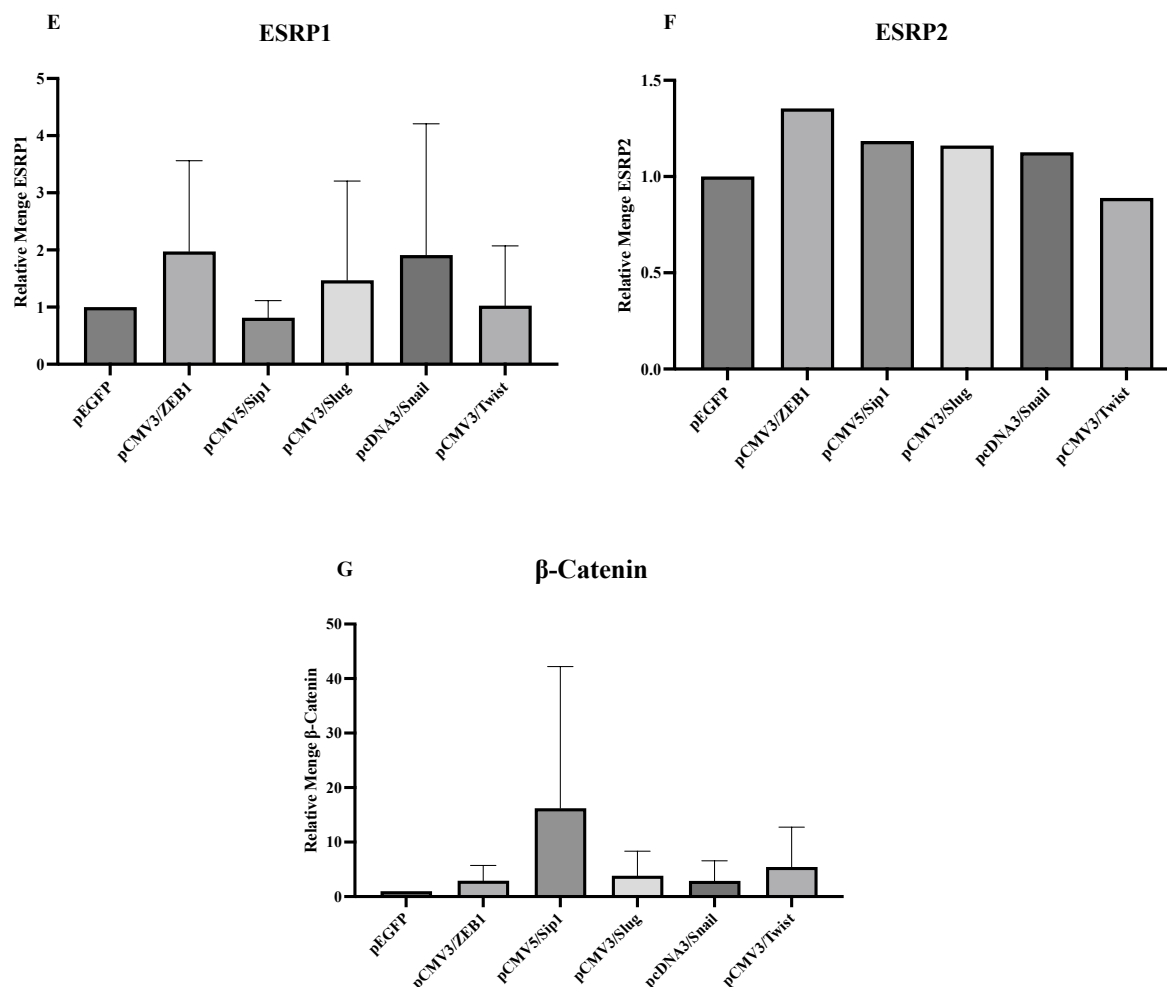
Insgesamt konnte in allen Versuchen im jeweiligen Mittel eine Erhöhung der  $\beta$ -Catenin-Menge beobachtet werden, die jedoch ebenfalls aufgrund der jeweiligen Standardabweichungen nicht signifikant waren. Im Vergleich zu den weiteren Proteinen fanden sich hier die jeweils die höchsten Abweichungen untereinander.

Die Überexpression von Sip1 führte zu einer verringerten Proteinmenge von ESRP1, während ZEB1, Slug und Snail durchschnittlich zu einer Vermehrung führten. Aufgrund der hohen Abweichungen in den einzelnen Versuchen untereinander konnte jedoch keine

Signifikanz ermittelt werden. Twist konnte im Mittel keine Änderung der ESRP1-Menge bewirken.

Der Einfluss der oben angegebenen Transkriptionsfaktoren auf die Proteinmenge von ESRP2 wurde in zwei Versuchen untersucht. Hierbei konnte nach Überexpression von Slug und Snail eine leichte Vermehrung der Proteinmenge an ESRP2 beobachtet werden. Twist bewirkte eine Verringerung. Die Überexpression von ZEB1 führte in jeweils einem Versuch zu einer Vermehrung und in einem weiteren zu einer Verminderung der Proteinmenge an ESRP2. Da insgesamt zwei Versuche durchgeführt worden sind, ist auf eine Ermittlung der Standardabweichung verzichtet worden.





**Abbildung 13: Analyse von Vimentin, Cytokeratin 7, E-Cadherin, N-Cadherin, ESRP1, ESRP2 und  $\beta$ -Catenin von transfizierten A549-Zellen**

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus bis zu vier Versuchen. Die relative Menge der oben genannten Proteine ist auf die jeweilige Menge der mit einem Kontrollplasmid (pEGFP) transfizierten Zellen normiert. Auf die einzelnen Ergebnisse der jeweiligen Versuche wird in Kapitel 3.2 näher eingegangen. Die Signifikanz wurde mit einem Einstichproben-t-Test ermittelt. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

### 3.3 TGF- $\beta$ 1-induzierte Migration von A549-Zellen

Der Einfluss von TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, EGF sowie von SB-431542, SB-505124, BI-4659 und SIS3 auf die gerichtete Migration von A549-Zellen wurde in bis zu sechs voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen mithilfe des Transwell-Migrationsassays untersucht.

Hierbei wurden die Auswirkungen von SIS3 in jeweils zwei, SB-505124, EGF und TGF- $\beta$ 2 in vier, SB-431542 und BI-4659 in fünf und TGF- $\beta$ 1 in sechs voneinander unabhängigen Versuchsreihen untersucht.

Für die durchgeführten Migrationsassays wurden Kontrollzellen genutzt, welche mit Citrat behandelt worden waren. Diese wurden, wie in den Versuchen zuvor, als Negativkontrollen genutzt.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Anzahl der migrierten Zellen ausgewertet, indem sie mithilfe eines Lichtmikroskop oder im EVOS FL Auto 2 *Cell Imaging System* ausgezählt wurden (siehe Abb. 14).

Die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 führte im Vergleich zu den Citrat-behandelten Zellen zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl migrierter Zellen. Hierbei bewirkte TGF- $\beta$ 1 eine mehr als doppelt so hohe Zellmigration ( $SD \pm 1,1$ ). TGF- $\beta$ 2 zeigte sich im Vergleich nicht so potent. Es bewirkte eine etwa 1,5-fache Zunahme der Zellmigration bei einer Standardabweichung von  $\pm 0,4$ .

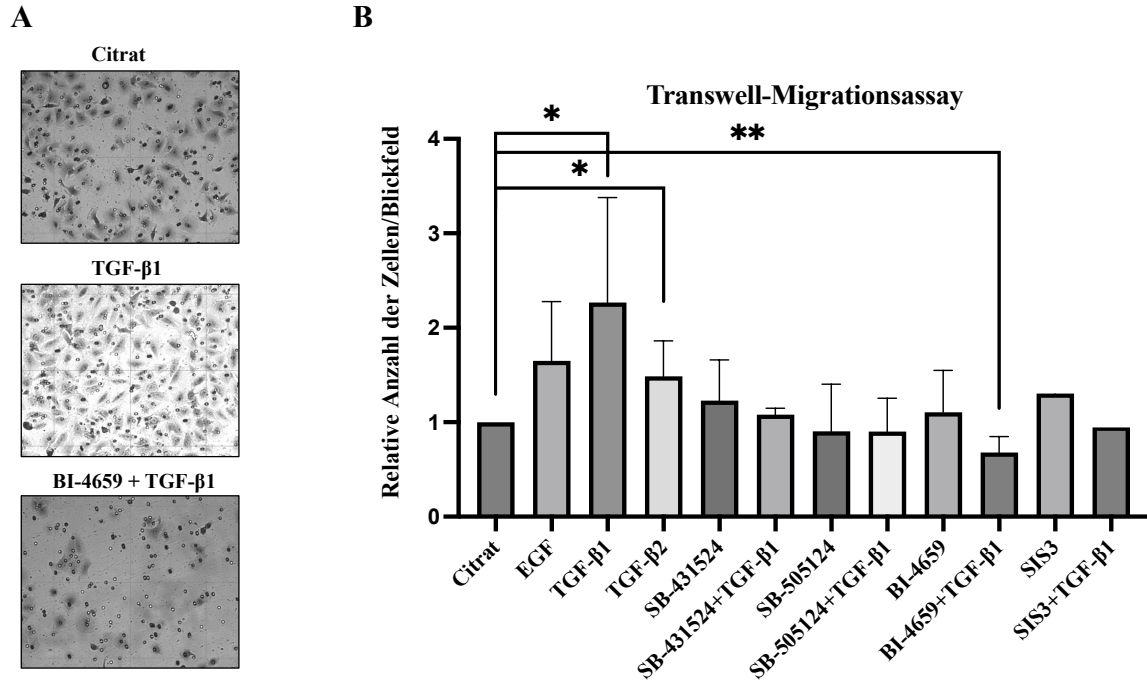
Bei EGF-behandelten Zellen ergab sich im Mittel eine 1,6-fache Erhöhung der migrierten Zellen ( $SD \pm 0,6$ ), die jedoch nicht signifikant war.

Die Behandlung mit SB-431524, SB-505124 und BI-4659 zeigte keinen eindeutigen Einfluss auf die Zellmigration. Es konnte sowohl eine Zunahme als auch eine Reduktion der migrierten Zellen gemessen werden. Die Behandlung mit sowohl SB-431524 als auch SB-505124 jeweils  $\pm$  TGF- $\beta$ 1 konnte keine eindeutige Veränderung der Migrationsfähigkeit bewirken.

Im Gegensatz hierzu führte die Behandlung mit BI-4659 und TGF- $\beta$ 1 insgesamt zu einer signifikanten Reduktion der migrierten Zellen um etwa 32 % im Vergleich zu den Citrat-behandelten Zellen.

Es wurden zwei Versuche mit SIS3-behandelten Zellen durchgeführt. Hierbei wurde in einem Versuch eine geringfügige und im anderen eine 1,6-fache Zunahme beobachtet. Aufgrund der Versuchsanzahl wurde auf die Ermittlung einer Standardabweichung verzichtet.

Die Behandlung von TGF- $\beta$ 1 mit SIS3 bewirkte in einem Versuch eine 1,3-fache Zunahme und in einem anderen Versuch eine 35%ige Reduktion der migrierten Zellen. Aufgrund der Versuchsanzahl wurde hier ebenfalls keine Standardabweichung ermittelt.



**Abbildung 14: Ergebnisse des Transwell-Migrationsassays**

A: Repräsentative mikroskopische Bilder eines Transwell-Migrationsassays mit A549-Zellen sind ausgewählt worden. Es wird deutlich, dass im Vergleich zu den Citrat-behandelten Zellen nach TGF-β1-Behandlung mehr Zellen migrieren. Bei Behandlung mit TGF-β1 und BI-4659 migrieren weniger Zellen.

B: Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus bis zu sechs Versuchen dargestellt. Es wurden die Zellen in jeweils zwei bis fünf Blickfeldern gezählt. Die Mittelwerte wurden auf die Citrat-behandelten Zellen normiert. Im Vergleich zu Citrat-behandelten Zellen führte die Behandlung mit TGF-β1 oder TGF-β2 zu einer Vermehrung der migrierten Zellen. Die kombinierte Behandlung mit TGF-β1 und BI-4659 bewirkte eine signifikante Abnahme der migrierten Zellen. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde der Einstichproben-t-Test angewendet. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss einer erhöhten TGF- $\beta$ 1-Konzentration und die pharmakologische Inhibierung durch die *small-molecule*-Inhibitoren SB-431542, SB-505124, BI-4659 und SIS3 auf Lungenadenokarzinomzellen der Zelllinie A549 untersucht. Hierfür wurden die Veränderungen der Proteinmengen und Lokalisationen von epithelialen EMT-Markerproteinen, wie z.B. E-Cadherin und Cytokeratin 7 und mesenchymalen EMT-Markerproteinen, wie z.B. Vimentin, N-Cadherin und  $\beta$ -Catenin, analysiert. Darüber hinaus wurden Transfektionsversuche durchgeführt, um den Einfluss von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren auf EMT-Markerproteine zu quantifizieren. Außerdem wurde der Einfluss von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 auf die Zellmigration und die Lokalisation diverser Markerproteine untersucht.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist der TGF- $\beta$ -Signalweg an der Regulation zahlreicher Prozesse im Organismus beteiligt. Dessen Dysregulation wird bei einer Reihe unterschiedlicher Erkrankungen beobachtet, zu denen u.a. kardiovaskuläre, pulmonale, muskulo-skeletale, metabolische, Bindegewebs-, Geschlechtsentwicklungs- und Krebserkrankungen gehören, wie Santibañez *et al.* in ihrem Review zusammengefasst haben<sup>111</sup>.

Die Pathogenese von metastasierenden Krebserkrankungen wird vor allem durch eine erhöhte TGF- $\beta$ 1-Konzentration beeinflusst, welche u.a. in Mammakarzinom-<sup>96</sup>, Plattenepithelkarzinom-<sup>105</sup>, ovarialen Adenosarkom-<sup>57</sup>, Melanom-<sup>43</sup>, Lungenadeno-<sup>55,62</sup> sowie in kolorektalen Karzinomzellen<sup>14</sup> detektiert werden konnte. Eine erhöhte TGF- $\beta$ 1-Konzentration ist darüber hinaus mit einem schlechteren Patientenüberleben assoziiert<sup>99</sup> und wurde u.a. in zytostatikaresistenten Tumorzellen gemessen<sup>136</sup>. Neben TGF- $\beta$ 1 spielt TGF- $\beta$ 2 ebenfalls eine Rolle bei der Pathogenese von Karzinomen. Yang *et al.* konnten eine Assoziation zwischen einer erhöhten Menge an TGF- $\beta$ 2 und einem schlechteren Patientenüberleben bei gastrointestinalen Karzinomen beobachten<sup>135</sup>.

In Zusammenschau dieser Erkenntnisse erscheint es sinnvoll die Auswirkungen einer erhöhten TGF- $\beta$ 1-Konzentration in Tumoren mithilfe von pharmakologischen Inhibitoren einzuschränken.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche weisen darauf hin, dass die pharmakologische Inhibierung des ALK5-Rezeptors durch SB-431542, SB-505124 oder BI-4659 den Einfluss einer erhöhten TGF- $\beta$ 1-Konzentration auf die Zellmorphologie und Migrationsfähigkeit in A549-Zellen einschränken kann. Es zeigte sich, dass einzelne

Inhibitoren potenter als andere auf die Menge eines bestimmten Proteins oder auf die Zellmigration wirken. Insgesamt erwies sich die Inhibierung des ALK5-Rezeptors potenter als die direkte Inhibierung von Smad3 durch SIS3, was in Kapitel 4.1.1 diskutiert wird. Die Zelltransfektion mit Expressionsplasmiden für Twist, ZEB1, Sip1, Slug und Snail zeigte eine große Spannbreite der Ergebnisse. Die Transkriptionsfaktoren bewirken sowohl eine Vermehrung als auch Verringerung der jeweils untersuchten Proteinmengen (siehe Kapitel 4.2). Im Vergleich zu TGF- $\beta$ 1 zeigte TGF- $\beta$ 2 eine geringere Potenz bei der Induktion der Zellmigration oder Veränderung des Phänotyps von A549-Zellen.

## **4.1 TGF- $\beta$ 1-induzierter Einfluss auf A549-Zellen**

### **4.1.1 Einfluss auf Smad2/3**

Die Phosphorylierung von Smad2 stellt einen wichtigen Schritt des Smad-abhängigen TGF- $\beta$ -Signaltransduktionswegs dar<sup>75</sup>. Eine TGF- $\beta$ 1-induzierte Aktivierung der Smad2-Phosphorylierung konnte in diversen Arbeiten sowohl in humanen (u.a. HSC-4) als auch tierischen (z.B. Mv1Lu, SM10) Zellen beobachtet werden<sup>88,3</sup>.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Phosphorylierung von Smad2 in A549-Zellen mithilfe von phospho-spezifischen Antikörpern analysiert.

In dieser Versuchsreihe wurde bei allen vier Durchläufen eine erhöhte Menge an phosphoryliertem Smad2 gemessen. Jedoch unterschieden sich die einzelnen Ergebnisse stark untereinander. Die Spannbreite lag zwischen einer 1,2-fachen und einer knapp 6-fachen Erhöhung der P-Smad2-Menge, sodass aufgrund der entsprechend hohen Standardabweichung keine Signifikanz ermittelt werden konnte.

Die eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse kann beispielsweise mit der Passagezahl der Zelllinie zusammenhängen. Sambuy *et al.* haben in ihrem Review zusammengetragen, dass eine hohe Passagezahl u.a. die Zellproliferation, Zelldichte und Carrier-vermittelten Transporte beeinflusst und so die ursprünglichen Funktionen der Zelllinie verändert<sup>110</sup>. Außerdem stellt es eine Schwierigkeit dar energiereiche Modifikationen, wie eine Phosphorylierung, wiederholt im gleichen Ausmaß im Western Blot zu konservieren.

Trotz der hohen Spannbreite der Ergebnisse kann die vorläufige Aussage getroffen werden, dass TGF- $\beta$ 1 bei allen Versuchen die P-Smad2-Menge in A549-Zellen verstärkt. Neben dem Einfluss von TGF- $\beta$ 1 wurde auch die Wirkung der Inhibitoren SB-431542, SB-505124, BI-4659 und SIS3 auf die Phosphorylierung von Smad2 untersucht. SB-

431542, SB-505124 und BI-4659 führten sowohl einzeln als auch in Kombination mit TGF- $\beta$ 1 zu einer signifikanten Verringerung der P-Smad2-Menge. Im Kontrast hierzu bewirkte SIS3 sowohl allein als auch in Kombination mit TGF- $\beta$ 1 keine signifikante Änderung. Die unterschiedliche Wirksamkeit der Inhibitoren kann mit deren molekularen Wirkung zusammenhängen. SB-431542, SB-505124 und BI-4659 wurden in anderen Arbeiten u.a. als kompetitive Inhibitoren von ALK5-Rezeptoren identifiziert, welche durch die Interaktion mit der ATP-Bindungsstelle von ALK5-Rezeptoren deren Phosphorylierung und Aktivierung verhindern<sup>40,20,11</sup>. Aktivierte ALK5-Rezeptoren induzieren die Phosphorylierung von Smad2 und Smad3<sup>93</sup>. Die Ergebnisse der Versuche verdeutlichen, dass die pharmakologische Blockade des ALK5-Rezeptors unabhängig von einer externen Zufuhr von TGF- $\beta$ 1 die Phosphorylierung von Smad2 in A549-Zellen signifikant mindert. Dies weist darauf hin, dass A549-Zellen autokrin TGF- $\beta$ 1 sezernieren und somit in kultivierten A549-Zellen eine basale Smad2-Phosphorylierung zu finden ist (vgl. Abb. 5). SIS3 wurde von Jinnin *et al.* als ein spezifischer Inhibitor der Phosphorylierung von Smad3 identifiziert<sup>44</sup>. In dieser Arbeit wurde zu Beginn der Versuchsreihe zweimal versucht die Phosphorylierung von Smad3 in A549-Zellen zu erfassen. Jedoch konnte diese nicht ausreichend im Western Blot abgebildet werden, weshalb der Fokus auf die Phosphorylierung von Smad2 gelegt wurde. SIS3 wurde weiterhin zur Differenzierung zwischen einer ALK5-Rezeptor-Blockade und einer Inhibierung von phosphoryliertem Smad3 eingesetzt (siehe Kapitel 4.1.2). Der fehlende Einfluss von SIS3 auf die Phosphorylierung von Smad2 weist darauf hin, dass die Phosphorylierung von Smad2 unabhängig von der Phosphorylierung von Smad3 stattfindet.

Die TGF- $\beta$ 1-induzierte Lokalisationsänderung von Smad2/3 in A549-Zellen wurde darüber hinaus im Zuge dieser Arbeit immunhistochemisch untersucht. Hierbei befand sich das Smad2/3-Signal in unbehandelten A549-Zellen besonders im Cytoplasma, während das Smad2/3-Signal nach der Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 vermehrt im Zellkern detektiert wurde. In A549-Zellen, welche mit SB-505124 und TGF- $\beta$ 1 behandelt worden waren, wurde keine Verlagerung beobachtet. Die TGF- $\beta$ 1-induzierte Verlagerung von Smad2/3 wurde ebenfalls von Massagué *et al.* beobachtet. Es wurde eine Verlagerung von Smad2/3 in den Zellkern beschrieben, wo Smad2/3 mit Transkriptionsfaktoren interagieren können und so Einfluss auf die Genexpression haben<sup>77</sup>.

## 4.1.2 Umverteilung von EMT-Markern

### 4.1.2.1 E-Cadherin, N-Cadherin und $\beta$ -Catenin

Die Behandlung von A549-Zellen mit TGF- $\beta$ 1 führte in dieser Arbeit zu keiner signifikanten Änderung der E-Cadherin-Menge. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen von Chen *et al.*, die bei der Untersuchung von A549-Zellen eine TGF- $\beta$ 1-abhängige Änderung der Proteinmenge von E-Cadherin (und Vimentin) nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden beobachten konnten<sup>17</sup>.

Diese Diskrepanz könnte durch einen unterschiedlichen Versuchsaufbau von Chen *et al.* im Vergleich zu dem in dieser Arbeit begründet sein. Während Chen *et al.* eine Inkubationszeit von 48 Stunden verwendeten, wurde in dieser Arbeit im Rahmen von Pilotversuchen TGF- $\beta$ 1 24 bis 72 Stunden inkubiert. Diese Experimente wurden unterschiedlich häufig wiederholt, um die Auswirkungen der Inkubationszeiten auf die E-Cadherin-Menge im Rahmen von Pilotversuchen zu untersuchen. Zunächst wurden die Ergebnisse aller Versuche unabhängig ihrer jeweiligen Inkubationszeit gemittelt und ausgewertet. Hierdurch konnte die Stichprobenzahl erhöht werden. Aufgrund der hohen Spannweite der einzelnen Ergebnisse konnte mittels dem Einstichproben-t-Test keine signifikante TGF- $\beta$ 1-abhängige Änderung der E-Cadherin-Menge berechnet werden.

Im Kontrast zu Chen *et al.* konnten Jung *et al.* in Anlehnung zu dieser Arbeit keine TGF- $\beta$ 1-abhängige Änderung der E-Cadherin-Menge in Mammakarzinomzellen beobachten<sup>45</sup>. In renalen Zellen konnten Tian *et al.* ebenfalls keine TGF- $\beta$ 1-abhängige Änderung der E-Cadherin-Menge detektieren. Tian *et al.* beobachteten hierbei eine primäre Phosphorylierung von E-Cadherin und zeigten einen TGF- $\beta$ 1-induzierten Verlust der Zellkontakte sowie die Verlagerung von  $\beta$ -Catenin aus der Zellperipherie in den Nucleus<sup>124</sup>.

Die Ergebnisse von Tian *et al.* führen in Zusammenschau mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu der vorläufigen Aussage, dass der Abbau von E-Cadherin mit zuvor einhergehenden Prozessen zusammenhängt, die eine längere Zeit einnehmen als die hier verwendete Inkubationszeit. Diese Hypothese kann erklären, weshalb eine Abnahme der E-Cadherin-Menge hier nicht gemessen werden konnte. Eine zeitabhängige Veränderung der E-Cadherin-Menge in A549-Zellen konnten Kasai *et al.* in ihrer Arbeit nachweisen<sup>51</sup>. Zur statistischen Belegung dieser Hypothese wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Hierbei ergab sich ein Wert von -0,64, welcher einen hohen Zusammenhang zwischen der Inkubationszeitdauer und der E-Cadherin-Menge angibt. Das heißt, dass eine längere Inkubationszeit mit einer niedrigeren E-Cadherin-Menge

korreliert. Bei kritischer Betrachtung der einzelnen Werte, die zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten dienen, kann dieser jedoch auch durch einen Ausreißer bedingt sein (vgl. Abb. 9), was die ursprüngliche Hypothese wieder schwächen könnte. Anhand dieser Ergebnisse werden die Grenzen der statistischen Auswertung biochemischer Versuche deutlich. Obwohl im Mittel ein hoher Zusammenhang berechnet werden konnte, können Ausreißer gerade bei einer geringeren Versuchswiederholung den Durchschnittswert verfälschen. Insgesamt zeigt dies, dass eine Kontrolle aller vorkommenden Variablen häufig nicht möglich ist, sodass bei der statistischen Auswertung das Vorhanden- bzw. Nicht-Vorhandensein einer Signifikanz jeweils kritisch betrachtet werden muss. Dies wird auch beim berechneten Effekt von BI-4659 auf E-Cadherin deutlich. Es ergab sich eine signifikante Zunahme der E-Cadherin-Menge, die jedoch bei prüfender Betrachtung der einzelnen Ergebnisse und der entsprechenden Standardabweichung als anfechtbar erscheint.

Wie oben bereits kurz beschrieben, wurden A549-Zellen für die weiterführende Beurteilung des Einflusses von TGF- $\beta$ 1 auf die Lokalisation des E- und N-Cadherin- sowie  $\beta$ -Catenin-Signals mithilfe von immunocytochemischen Versuchen untersucht.

Hierbei wurde in den Kontrollzellen E-Cadherin und N-Cadherin in der Zellmembran detektiert. Das  $\beta$ -Catenin-Signal war an jenen Stellen der Zellmembran lokalisiert, an denen das E-Cadherin-Signal fehlte.

Die Abhängigkeit zwischen E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin kann durch den allgemeinen Zellaufbau erklärt werden.  $\beta$ -Catenin bildet u.a. die Verbindung von E-Cadherin zum Aktinzytoskelett. Gemeinsam bilden sie einen E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin-Komplex<sup>123</sup>. In der Zellmembran wird  $\beta$ -Catenin durch E-Cadherin stabilisiert. Cadherine können kontinuierlich abgebaut und wieder an der Zelloberfläche aufbereitet werden, sodass es zu einem fortlaufendem Auf- und Abbau von Cadherin/Catenin-Komplexen in Adhärenzverbindungen kommen kann<sup>137</sup>. Diese Dissoziation von E-Cadherin aus der Zellmembran kann z.B. durch die Calciumkonzentration reguliert werden. Calcium wird zur Aufrechterhaltung der Zellverbindung der Cadherine untereinander sowie für deren basalen Aktivität benötigt<sup>13</sup>. Durch den Abbau bzw. die Umlagerung von E-Cadherin wird  $\beta$ -Catenin im weiteren Verlauf eine nukleäre Translokation ermöglicht, wodurch dieses für den Wnt-Signalweg verfügbar wird, welcher die Zellpolarität kontrolliert und die Zellmigration beeinflusst<sup>91</sup>. Diese Umlagerung von E-Cadherin und die daraus resultierende Veränderung der Cadherin-Catenin-Interaktion kann ebenfalls in weiteren Karzinomzellen beobachtet werden<sup>84</sup>.

In dieser Arbeit bewirkte die Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 eine vermehrte Verlagerung von E-Cadherin aus der Zellmembran in das Cytoplasma, während das  $\beta$ -Catenin-Signal weiterhin an der Zellmembran verblieb. Durch die TGF- $\beta$ 1-Behandlung wurde zudem N-Cadherin verstärkt an der Zellmembran detektiert.

Eine Verlagerung von E-Cadherin in das Cytoplasma nach TGF- $\beta$ 1-Behandlung konnten auch Lv *et al.* in Mammakarzinomzellen beobachten<sup>70</sup>. Piek *et al.* konnten ebenfalls eine TGF- $\beta$ 1-induzierte Umgestaltung des Aktinzytoskletts durch die reduzierte Expression sowie Relokalisation von E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin in Mammakarzinomzellen detektieren<sup>103</sup>. Vogelmann *et al.* wiesen zudem eine TGF- $\beta$ 1-induzierte Dissoziation des E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin-Adhäsionskomplexes in Pankreaskarzinomzellen nach<sup>127</sup>, welche z.B. die in dieser Arbeit beobachtete Umlagerung des E-Cadherin-Signals in das Cytoplasma bedingen könnte. Diese Beobachtungen gehen ebenfalls mit den Ergebnissen von Janda *et al.* einher, die eine vermehrte lysosomale Degradierung von E-Cadherin im Rahmen der EMT beobachteten<sup>42</sup>. Palacios *et al.* zeigten außerdem, dass für den Transport in das Lysosom die Ubiquitinierung von E-Cadherin essentiell ist<sup>98</sup>.

Der Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die Cadherine kann durch dessen Einfluss auf die Calciumkonzentration erklärt werden. TGF- $\beta$  kann über die Hemmung der Sekretion von PTH aus den Nebenschilddrüsen die extrazelluläre Calciumkonzentration verringern<sup>117</sup>. Bei niedriger extrazellulärer Calciumkonzentration werden Cadherine durch Endozytose aus den Zellverbindungen entfernt<sup>50</sup>. Dieser Prozess kann auch im Rahmen der EMT beobachtet werden<sup>79</sup>.

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit und den ergänzenden Beiträgen der angegebenen Literatur lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 den Abbau von E-Cadherin aus der Zellmembran in A549-Zellen induziert, indem E-Cadherin zunächst ubiquitiniert und dann lysosomal abgebaut wird. Dieser Vorgang scheint insgesamt einen längeren Zeitraum einzunehmen, als in dieser Arbeit erfasst wurde. Er steht im Zusammenhang mit der EMT und führt zu einem vermehrten Abbau der Zelladhäsionskontakte, wodurch letztendlich die Migration der Tumorzellen gefördert wird.

Der in der Einleitung bereits beschriebene „Cadherin-Switch“ kann auch in den Versuchen dieser Arbeit beobachtet werden. N-Cadherin wurde in der Zellmembran der Kontrollzellen detektiert. TGF- $\beta$ 1 induzierte eine erhöhte N-Cadherin-Menge in der Zellmembran und bewirkte, wie oben beschrieben, die Dissoziation von E-Cadherin aus der Zellmembran, während  $\beta$ -Catenin dort verblieb. Einen Zusammenhang zwischen

erhöhter N-Cadherin-Menge und vermehrter Detektion von  $\beta$ -Cadherin konnte ebenfalls von Sadot *et al.* in Kolonkarzinomzellen gezeigt werden<sup>109</sup>. Eine erhöhte N-Cadherin-Menge wurde zudem in Lungen-, Mamma-, Urothel- und Pankreaskarzinomzellen detektiert. Sie steht im Zusammenhang mit einer Förderung der Tumorzellmigration<sup>142,18,66,87</sup> und ist mit einem verringertem Überleben der jeweils betroffenen Patientengruppen verbunden, wie in Tabelle 1 des Reviews von Mrozik *et al.* zusammengefasst worden ist<sup>86</sup>.

Die zeitgleiche Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 und SB-505124 führte zu keiner Verlagerung von E-Cadherin, N-Cadherin sowie  $\beta$ -Catenin. Daraus kann geschlossen werden, dass SB-505124 durch die Inhibierung des ALK5-Rezeptors den E-Cadherin/Catenin-Adhäsionskomplex in A549-Zellen stabilisieren kann.

TGF- $\beta$ 2-behandelte Zellen zeigten im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchung keine Änderung der Lokalisation des E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin-Signals. TGF- $\beta$ 2 scheint also im Gegensatz zu TGF- $\beta$ 1 keinen entscheidenden Einfluss auf die Lokalisation dieser Proteine in A549-Zellen zu nehmen.

#### **4.1.2.2 Weitere EMT-Markerproteine**

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von TGF- $\beta$ 1 und den oben genannten Inhibitoren auf die Proteinmenge und Lokalisation von Vimentin in A549-Zellen untersucht.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 eine signifikante Zunahme der Proteinmenge von Vimentin bewirkt, was auch mit den Ergebnissen von Chen *et al.* korreliert<sup>17</sup>. Die Behandlung mit SB-505124 bewirkte, im Gegensatz zu den weiteren untersuchten Inhibitoren, eine Minderung Vimentin-Menge, was den Schluss zulässt, dass dieser Inhibitor potenter auf die Vimentin-Menge wirkt als die weiteren untersuchten Inhibitoren. DaCosta Byfield *et al.* konnten bereits zeigen, dass SB-505124 im Vergleich zu SB-431542 potenter agiert<sup>20</sup>.

Die Abhängigkeit von TGF- $\beta$ 1 auf die Lokalisation und Anordnung von Vimentinfilamenten wurde zudem mithilfe einer immunhistochemischen Färbung analysiert. Hierbei wurden eindeutige TGF- $\beta$ 1-induzierte Strukturänderungen der Zellmorphologie beobachtet. Diese zeigten sich durch veränderte Vimentinfilamente, welche im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen länger erschienen. Die jeweilige Behandlung mit SB-505124 oder TGF- $\beta$ 2 bewirkte jeweils keine relevante Änderung des Vimentin-Signals.

Die immunocytochemische Analyse der Proteine Cytokeratin 7 und  $\beta$ 1-Integrin in A549-Zellen zeigte zudem, dass die Verteilung dieser Proteine in der Zelle durch eine TGF- $\beta$ 1-Behandlung verändert wird.

Eine TGF- $\beta$ 1-abhängige Änderung der Morphologie von Cytokeratinen wurde auch von Jung *et al.* beobachtet, welche mit einer höheren Zellmigration einherging<sup>45</sup>. Die Wechselwirkung von  $\beta$ 1-Integrin und TGF- $\beta$ 1 ist in dem Review von Margadant und Sonnenberg beschrieben worden<sup>73</sup>. Sie fassten zusammen, dass TGF- $\beta$ 1 die De-novo-Expression mehrerer Integrine, wie  $\alpha$ 5 $\beta$ 1,  $\alpha$ v $\beta$ 3,  $\alpha$ v $\beta$ 5 und  $\alpha$ v $\beta$ 6, induziert, die normalerweise in Epithelzellen nicht exprimiert werden. Hierdurch wird das migratorische und invasive Verhalten von Karzinomzellen verstärkt.

Bei der Behandlung mit SB-505124 und TGF- $\beta$ 1 wurden diese Änderungen in den untersuchten Proteinen nicht beobachtet. Eine TGF- $\beta$ 1-induzierte Änderung der Cytokeratin-Filamente konnte ebenfalls von Lv *et al.* im Mammakarzinomzellen beobachtet werden<sup>70</sup>.

Zusammenfassend legen Ergebnisse der durchgeführten Versuche nahe, dass eine erhöhte Konzentration an TGF- $\beta$ 1 in A549-Zellen vor allem Einfluss auf die Proteinmenge von mesenchymalen Markerproteinen hat, während die Proteinmenge epithelialer Marker wie z.B. E-Cadherin abhängig von der Stimulationsdauer nahezu unverändert bleibt. Epitheliale Markerproteine scheinen zunächst innerhalb der Zellen umverteilt zu werden, bevor diese degradiert werden. TGF- $\beta$ 1 scheint in A549-Zellen eine Umgestaltung des Cytoskeletts in Richtung eines mesenchymalen Phänotyps zu induzieren. Dieser Phänotyp kann eine Migration dieser Zellen fördern (siehe Kapitel 4.1.3).

### **4.1.3 Migrationsfähigkeit von A549-Zellen**

Die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen spielt eine wichtige Rolle im Kontext der EMT<sup>94</sup>. Die weiterführende Analyse in A549-Zellen wurde in dieser Arbeit mithilfe von Transwell-Migrationsassays durchgeführt, welche sich eignen um die gerichtete Zellmigration von kultivierten Zellen zu messen<sup>60</sup>.

Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigten sowohl TGF- $\beta$ 1- als auch TGF- $\beta$ 2-stimulierte A549-Zellen eine verstärkte gerichtete Migration. TGF- $\beta$ 1 förderte im Vergleich zu TGF- $\beta$ 2 die Zellmigration potenter (2,2- zu 1,5-fache Zunahme). Wick *et al.* identifizierten TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 als Induktoren der Zellmigration in Glioblastomzellen. Hierbei erwies sich TGF- $\beta$ 1 ebenfalls als potenterer Förderer der Zellmigration als TGF- $\beta$ 2<sup>132</sup>. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Kontrast zu den Ergebnissen von Gao *et al.*, die eine

gleich starke Potenz von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 auf die Zellmigration von stimulierten Ovarialkarzinomzellen in *scratch-wound assays* beobachten konnten<sup>26</sup>.

Die TGF- $\beta$ 1-induzierte Förderung der Zellmigration kann zum einen mit dem bereits diskutierten „Cadherin-Switch“ (siehe Kapitel 4.1.2.1), als auch zellmorphologischen Änderungen begründet sein (siehe Kapitel 4.1.2.2). Diese Ergebnisse korrelieren mit den bereits beschriebenen strukturellen Änderungen der Zellen, welche die Migration und Metastasierung von A549-Zellen fördern können.

Die TGF- $\beta$ 1-induzierte Migration von A549-Zellen konnte in dieser Arbeit durch den Einfluss von SB-431542 und BI-4659 vermindert werden, nicht jedoch durch SB-505124. Halder *et al.* konnten ebenfalls eine Inhibierung der TGF- $\beta$ 1-induzierten Zellmigration durch SB-431542 in A549-Zellen beobachten<sup>32</sup>. Ohne die zusätzliche Stimulation von TGF- $\beta$ 1 konnte jedoch kein signifikanter Einfluss von SB-431542, BI-4659 oder SB-505124 auf die Migration ermittelt werden.

Hieraus kann die vorläufige Aussage getroffen werden, dass die Inhibitoren erst mit einer erhöhten TGF- $\beta$ 1-Menge die Zellmigration beeinflussen. Chen *et al.* beobachteten eine Inhibierung der Migration von A549-Zellen im Transwell-Migrationsassay durch den *knockdown* von Smad2, unabhängig der Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1<sup>16</sup>. Dies deutet daraufhin, dass die eigentliche Aktivierung von Smad2 (durch TGF- $\beta$ 1) die Migrationsfähigkeit in A549-Zellen beeinflusst und durch einige ALK5-Inhibitoren vermindert werden kann.

## **4.2 Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die EMT in A549-Zellen**

TGF- $\beta$  kann die Genexpression der EMT-Transkriptionsfaktoren (EMT-TFs) Twist, ZEB1, Sip1, Slug und Snail beeinflussen<sup>81,24,115,78</sup>.

Der Einfluss der oben genannten EMT-TFs auf die EMT-Markerproteine Vimentin, Cytokeratin 7, E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin und N-Cadherin sowie auf ESRP1 und ESRP2 in A549-Zellen wurde in dieser Arbeit mithilfe von ektopen Expressionen untersucht.

Hierbei wurden in den jeweiligen Versuchsreihen hohe Schwankungen der Proteinmengen von E-Cadherin, N-Cadherin, ESRP1 und ESRP2 gemessen, sodass für diese Proteine kein signifikanter Einfluss der EMT-TFs ermittelt werden konnte.

Diese Schwankungen können durch unterschiedliche Ursachen bedingt gewesen sein. Dazu gehört z.B. die methodische Schwierigkeit A549-Zellen zu transferieren bzw. ein Plasmid in diese einzubringen. Die Transfektionseffizienz war eher niedrig und lag in den Versuchen bei ca. 10-20 %. Sie kann zum einen durch einen suboptimal verwendeten

Quotienten zwischen der DNA und der entsprechenden Transfektionsreagenz für die Zelllinie bedingt gewesen sein, aber auch mit einer möglichen zeitlich vorausgegangen Degradation der Plasmid-DNA zusammenhängen. Die schwierige Reproduzierbarkeit der einzelnen Ergebnisse kann außerdem mit der Veränderung der Zellen über den Versuchszeitraum durch das Passagieren der Zellkulturen zusammenhängen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass eine ungleiche Konfluenz der A549-Zellen für die jeweiligen Transfektionsversuche genutzt worden ist, welche zu den Schwankungen beigetragen haben könnte.

Dessen ungeachtet wurde durch den Einfluss von Twist und Snail eine reduzierte Cytokeratin-7-Menge in A549-Zellen beobachtet. Eine verringerte Cytokeratin-Menge konnte ebenfalls in Mammakarzinomzellen detektiert werden und korreliert darüber hinaus mit einem schlechteren Patientenüberleben<sup>128</sup>. Kanaji *et al.* beobachteten zudem, dass die Hemmung der Proteinexpression von Cytokeratin 7 in A549-Zellen zu einer mehr als 3-fach erhöhten Zellinvasivität führt<sup>48</sup>.

Die Transfektion von Sip1 und Twist führte in dieser Arbeit zu einer Abnahme der Proteinmenge von Vimentin. Denecker *et al.* zeigten, dass der *knockdown* von Sip1 wiederum in Melanozyten zu einer erhöhten Konzentration von Vimentin führt<sup>21</sup>. Sip1 konnte außerdem als Tumorsuppressorprotein identifiziert werden, dessen Abnahme in Zellen des malignen Melanoms und in HCC-Zelllinien beobachtet werden kann<sup>15,1</sup>.

In Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit detektierten Fan *et al.* eine Twist-induzierte Erhöhung der Konzentration an Vimentin, wodurch die EMT in Zervixkarzinomzellen gefördert wurde<sup>24</sup>. Wang *et al.* beobachteten ähnlich dazu eine Twist-induzierte EMT in Mammakarzinomzellen<sup>129</sup>.

Die unterschiedliche Wirkung von EMT-TFs in verschiedenen Zelllinien korreliert mit den Ergebnissen anderer Arbeiten. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Snail die Metastasierung in Mammakarzinomzellen fördert<sup>125</sup>, während es keinen Einfluss auf die Metastasierung in Pankreaskarzinomzellen nimmt<sup>144</sup>. ZEB1 hingegen bedingt die Metastasierung in Pankreaskarzinomzellen<sup>61</sup> und in Melanomzellen<sup>21</sup>, während für ZEB2 bzw. Sip1, welches aus der gleichen Familie wie ZEB1 stammt, tumorsuppressive Eigenschaften gefunden wurden<sup>15</sup>.

Die Ergebnisse der oben zitierten Arbeiten zeigen, dass EMT-TFs nicht spezifisch klassifizierbar sind und gewebespezifische Eigenschaften vorzuweisen scheinen<sup>12</sup>. Dies korreliert auch mit den Versuchsergebnissen dieser Arbeit und wird besonders bei der Wirkung von Twist auf A549-Zellen deutlich. Diese führte zu einer verringerten

Proteinmenge sowohl von Vimentin als auch Cytokeratin 7, also von einem mesenchyalem und epithelialem EMT-Markerprotein.

Zusammenfassend lässt sich insgesamt keine eindeutige bzw. pauschale Aussage machen, inwiefern bestimmte EMT-TFs (epitheliale oder mesenchymale) Markerproteine beeinflussen können. Hierbei scheinen vielfältige Faktoren zusammenzuwirken, die im Rahmen der jeweils durchgeführten Versuche nicht hinreichend erfasst werden konnten.

### 4.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von TGF- $\beta$ 1 eine wichtige Rolle im Zuge der Tumorprogression und EMT von Lungenadenokarzinomzellen der Zelllinie A549 spielt. Zur pharmakologischen Hemmung dieser Wirkung wurden *small-molecule*-Inhibitoren verwendet, welche den Smad-abhängigen TGF- $\beta$ 1-Signalweg hemmen können. Dies stellt jedoch eine Limitation der verwendeten Inhibitoren dar, da selbst bei dessen Hemmung die Smad-unabhängigen Signalwege weiterhin ablaufen können, wie Hahn *et al.* bei der Ausbildung von gastrointestinalen Adenomen beobachteten<sup>31</sup>. Um dies zu umgehen, müssten einzelne TGF- $\beta$ -Signalwege identifiziert werden, die gezielt für die Chemoprävention und Behandlung von Krebserkrankungen beim Menschen eingesetzt werden können<sup>126</sup>.

Nichtsdestotrotz eignen sich *small-molecule*-Inhibitoren im Allgemeinen aufgrund ihrer geringen Größe gut dafür in Tumorzellen gelangen. Sie werden daher auch im Rahmen von zielgerichteten Therapien von Krebsbehandlungen eingesetzt<sup>120</sup>. Jedoch sind die Inhibitoren durch den entstehenden Mutationsdruck, der durch die Blockade einer bestimmten Kinase in den Tumorzellen entsteht, häufig nicht lange in der Zelle wirksam<sup>140</sup>. Um dies zu vermeiden, können verschiedene Inhibitorarten miteinander kombiniert werden.

In Tierversuchen konnte eine Kombination von TGF- $\beta$ 1-Inhibitoren mit unterschiedlichen Immuncheckpoint-Therapien die Effektivität der Tumor-Immuntherapie verbessern<sup>116,37</sup>. Außerdem wurde in Mausmodellen mit kolorektalem Karzinom die Tumorlast durch die Verbindung aus der Blockade der PD-1/PD-L1-Achse und der Inhibierung von TGF- $\beta$  gesenkt<sup>121</sup>. Die IL2-abhängige T-Zellproliferation kann zudem mithilfe von TGF- $\beta$ 1 inhibiert werden<sup>54</sup>. Eine Blockade des TGF- $\beta$ -Signalwegs innerhalb von T-Helferzellen kann zudem einen weiteren Schritt zur Inhibierung des

Tumormikromilieus darstellen. Jedoch sind diese Therapien ebenfalls häufig mit der Bildung von Resistenzen verbunden<sup>68</sup>.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben nimmt TGF- $\beta$ 1 im Zusammenhang mit der Kanzerogenese eine duale Rolle ein. Dies stellt die Entwicklung zielgerichteter Therapien zur Blockade des TGF- $\beta$ -Signalwegs, gerade im Hinblick auf unspezifische Auswirkungen bzw. Nebenwirkungen, vor eine zusätzliche Herausforderung.

Pardali *et al.* zeigten, dass die Inhibierung des TGF- $\beta$ -Signalwegs zu Nebenwirkungen innerhalb des kardiovaskulären Systems führt<sup>100</sup>. Ikeuchi *et al.* detektierten in diesem Zusammenhang erhöhte Mengen an TGF- $\beta$ 1 in Myokardzellen nach einem stattgefundenem Myokardinfarkt, was auf dessen Bedeutung im Rahmen des Neuaufbaus von untergegangenem Gewebe hindeutet<sup>38</sup>. Im Rahmen von präklinischen Studien wurde eine Kardiotoxizität nach der Blockade des TGF- $\beta$ -Signalwegs beobachtet, die sich durch eine erhöhte Blutungsfrequenz und Läsionen der Herzklappen ausdrückte<sup>4</sup>.

In einer klinischen Studie konnte zudem festgestellt werden, dass TGF- $\beta$ 1-Inhibitoren dermatotoxisch wirken und zur Entwicklung von Keratokanthomen bzw. Plattenepithelkarzinomen beitragen<sup>83</sup>. TGF- $\beta$ 1 inhibiert durch die Hemmung von c-myc u.a. das Wachstum von Keratinozyten<sup>104</sup>.

Um die Nebenwirkungen einer zielgerichteten Anti-TGF- $\beta$ 1-Therapie möglichst minimal zu halten, sollten lediglich Patientengruppen mit solch einer Therapie behandelt werden, welche eine erhöhte TGF- $\beta$ 1-Konzentration aufweisen. Um eine Behandlung sicherer und effektiver zu gestalten, wurden verschiedene Ansätze in präklinischen Studien erprobt. Die Kardiotoxizität der Anti-TGF- $\beta$ 1-Therapie könnte beispielsweise durch periodische Dosierung von ALK5-Rezeptor-Inhibitoren verringert werden<sup>59</sup>.

Eine weitere Möglichkeit Nebenwirkungen zu vermeiden kann in der Entwicklung zielgerichteter Therapien liegen, welche die dichotome Rolle von TGF- $\beta$ 1 im Hinblick auf die Kanzerogenese einschränken können. Der Wechsel von einer tumorsuppressiven zur prometastatischen Wirkung von TGF- $\beta$ 1 kann z.B. durch die Änderung des Genexpressionsprofils diverser kontextabhängiger Determinanten erklärt werden<sup>139</sup>. Diese Determinanten können die Liganden- bzw. Rezeptor-Interaktion, den Smad-Komplex oder die Zellantwort beeinflussen<sup>139</sup>, wodurch sie ebenfalls ein mögliches Ziel bei der Entwicklung zielgerichteter Therapien darstellen.

PSPC1 (*paraspeckle component 1*) ist ein Protein, welches unterschiedliche Ebenen beeinflussen kann<sup>139</sup>. Es ist eines von drei Hauptproteinen aus denen Paraspeckles bestehen. Paraspeckles kommen im Nucleus vor und sind unregelmäßig geformte 0,5-1

µm große Kompartimente. Sie können die Genexpression durch die nukleäre Aufbewahrung von RNA beeinflussen<sup>25</sup>. Eine erhöhte Proteinmenge an PSPC1 korreliert sowohl mit fortgeschrittenen Stadien von Brust-, Lungen- und Lebertumorzellen als auch mit einer erhöhten Menge an mesenchymalen EMT-Markerproteinen und den EMT-Transkriptionsfaktoren Snail, Slug und Twist in Lungenkrebszellen<sup>138</sup>. Insgesamt kann PSPC1 also einen Biomarker darstellen, welcher als möglicher Angriffspunkt zielgerichteter Krebstherapien verwendet werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die pharmakologische Hemmung des TGF-β-Signalwegs einen wichtigen Ansatz zur Weiterentwicklung zielgerichteter Therapien darstellt. Die in dieser Arbeit untersuchten *small-molecule*-Inhibitoren können zur Erweiterung der bereits bestehenden Therapien von Lungenkarzinomen beitragen. Eine Möglichkeit deren Effektivität zu steigern, könnte in der Kombination mit bereits etablierten Therapieformen liegen.

Bevor die verwendeten Inhibitoren im klinischen Alltag angewendet werden können, müssten diese zunächst in weiteren Zelllinien untersucht werden. Darüber hinaus hängt deren Einsatz v.a. von der Möglichkeit der Reduktion des eventuellen Auftretens der beschriebenen Nebenwirkungen und der Blockade von Smad-unabhängigen Signaltransduktionswegen ab.

## 5 Zusammenfassung

Der TGF- $\beta$ -Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Kanzerogenese von Tumorzellen. In zahlreichen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten TGF- $\beta$ 1-Konzentration, der epithelialen-mesenchymalen Transition und der daraus folgenden Metastasierung von Tumorzellen detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung einer erhöhten TGF- $\beta$ 1-Konzentration und dessen Inhibierung durch die *small-molecule*-Inhibitoren SB-431542, SB-505124, BI-4659 und SIS3 auf die Proteinmenge, den Phänotyp und die Migrationsfähigkeit von A549-Zellen untersucht.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine erhöhte TGF- $\beta$ 1-Konzentration zur Vermehrung von mesenchymalen Markerproteinen wie z.B. Vimentin führt, während die Wirkung auf epitheliale Markerproteine wie z.B. E-Cadherin v.a. von der Stimulationsdauer mit TGF- $\beta$ 1 abhängt.

Die untersuchten *small-molecule*-Inhibitoren konnten den Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf A549-Zellen einschränken. Hierbei zeigten sich jedoch die ALK5-Inhibitoren SB-431542, SB-505124 und BI-4659 potenter als die Inhibierung der Phosphorylierung von Smad3 durch SIS3. Es wurde deutlich, dass die Phosphorylierung von Smad2 ausreicht, um TGF- $\beta$ 1-induzierte Änderungen der Proteinmengen von EMT-Markerproteinen zu bewirken.

Mithilfe der Immunfluoreszenz wurde der Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf den Phänotyp der A549-Zellen untersucht. Hierbei konnte beobachtet werden, dass eine erhöhte Konzentration an TGF- $\beta$ 1 zu deutlichen Änderungen der Zellmorphologie und zu Umverteilung von diversen Proteinen in A549-Zellen führt, wodurch die Zellen insgesamt einen mesenchymalen Phänotyp annehmen.

Darüber hinaus wurde die Wirkung der Transkriptionsfaktoren Twist, ZEB1, Sip1, Slug und Snail auf die Proteinmenge von epithelialen und mesenchymalen Markerproteinen untersucht. Wie bereits in der Literatur beschrieben, zeigte sich auch hier die erschwerte Reproduzierbarkeit einzelner Ergebnisse, sodass kein eindeutiger Einfluss der untersuchten Transkriptionsfaktoren auf die Expression der jeweiligen Markerproteine in den A549-Zellen erfasst werden konnte.

Bei kritischer Betrachtung der durchgeführten Auswertungen wurden zudem die Grenzen der statistischen Beurteilbarkeit von Western Blot basierten Proteinanalysen deutlich.

## 6 Abstract

The TGF- $\beta$  signaling pathway plays a crucial role in the carcinogenesis of tumor cells. Numerous studies have shown a correlation between increased TGF- $\beta$ 1 levels, the epithelial-mesenchymal transition, and the subsequent metastasis of tumor cells.

In the present study, the effect of an increased TGF- $\beta$ 1 concentration and its inhibition by the small molecule inhibitors SB-431542, SB-505124, BI-4659 and SIS3 was examined on the protein amount, phenotype, and migration ability of A549 cells.

Here increased TGF- $\beta$ 1 levels lead to an increase of mesenchymal marker proteins such as vimentin, while the effect on epithelial marker proteins such as E-Cadherin depended primarily on the duration of TGF- $\beta$ 1 treatment.

The small molecule inhibitors used here were able to limit the influence of TGF- $\beta$ 1 on A549 cells. However, the ALK5 inhibitors SB-431542, SB-505124 and BI-4659 were more potent than the inhibition of Smad3 phosphorylation by SIS3. It became clear that phosphorylation of Smad2 is sufficient to cause TGF- $\beta$ 1-induced changes of the protein levels of EMT marker proteins.

The influence of TGF- $\beta$ 1 on the phenotype was examined using immunofluorescence. It was observed that higher TGF- $\beta$ 1 levels lead to significant changes in cell morphology and distribution of various proteins in A549 cells, which overall promote a mesenchymal phenotype.

In addition, the effect of the transcription factors Twist, ZEB1, Sip1, Slug and Snail on the protein levels of epithelial and mesenchymal marker proteins was examined. As already described in former studies the experiments carried out in this study showed considerable disparities between each other, so that no clear influence of the examined transcription factors could be determined on the expression of the respective marker proteins in the A549 cells .

When individual results were critically examined, the limits of the statistical evaluation of Western Blot based protein biochemical experiments became clear.

## Abkürzungsverzeichnis

ALK	<i>activin receptor-like kinase</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BMP	<i>bone morphogenic protein</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
CMF-PBS	<i>Calcium and magnesium free phosphate buffered saline</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4,6-Diamindin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
ESRP	<i>epithelial splicing regulatory proteins</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDF	<i>growth and differentiation factor</i>
h	Stunde, Stunden
HCC	hepatozelluläres Karzinom
IF	Immunfluoreszenz
kDa	Kilo-Dalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
M	Molar

mk	monoklonal
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MG	Molekulargewicht
NSCLC	<i>Non Small Cell Lung Cancer</i>
P-	Phospho-
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
pk	polyklonal
PSPC	<i>paraspeckle component 1</i>
PTH	Parathormon
SCLC	<i>Small Cell Lung Cancer</i>
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacryamid- Gelelektrophorese
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween® 20</i>
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylendiamin
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
WB	Western Blot
Wnt	<i>wingless and Int-1</i>
ZEB	<i>zinc finger E-box-binding homeobox</i>

## Literaturverzeichnis

1. Acun T, Oztas E, Yagci T, Yakicier MC. SIP1 is downregulated in hepatocellular carcinoma by promoter hypermethylation. *BMC Cancer*. 2011;11(1):223. doi:10.1186/1471-2407-11-223
2. Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGF $\beta$  signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(10):790-811. doi:10.1038/nrd3810
3. Albers RE, Selesniemi K, Natale DRC, Brown TL. TGF- $\beta$  induces Smad2 Phosphorylation, ARE Induction, and Trophoblast Differentiation. *IJSC*. 2018;11(1):111-120. doi:10.15283/ijsc17069
4. Anderton MJ, Mellor HR, Bell A, et al. Induction of Heart Valve Lesions by Small-Molecule ALK5 Inhibitors. *Toxicol Pathol*. 2011;39(6):916-924. doi:10.1177/0192623311416259
5. Araki K, Shimura T, Suzuki H, et al. E/N-cadherin switch mediates cancer progression via TGF- $\beta$ -induced epithelial-to-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Cancer*. 2011;105(12):1885-1893. doi:10.1038/bjc.2011.452
6. Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, et al. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Published online 2016. doi:10.17886/rkipubl-2016-014
7. Barriere G, Fici P, Gallerani G, Fabbri F, Rigaud M. Epithelial Mesenchymal Transition: a double-edged sword. *Clinical and Translational Medicine*. 2015;4(1). doi:10.1186/s40169-015-0055-4
8. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. *Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg)*. Published online 2016. doi:10.25646/8353
9. Bierie B, Moses HL. TGF $\beta$ : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(7):506-520. doi:10.1038/nrc1926
10. Blobe GC, Schieman WP, Lodish HF. Role of Transforming Growth Factor  $\beta$  in Human Disease. *N Engl J Med*. 2000;342(18):1350-1358. doi:10.1056/NEJM200005043421807
11. Boehringer Ingelheim International. Alk5 inhibitor | BI-4659 | opnMe | Boehringer Ingelheim. opnme.com. Published May 8, 2018. <https://opnme.com/molecules/alk5-inhibitor-bi-4659>
12. Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(2):128-134. doi:10.1038/nrc.2017.118
13. Cailliez F, Lavery R. Cadherin Mechanics and Complexation: The Importance of Calcium Binding. *Biophysical Journal*. 2005;89(6):3895-3903. doi:10.1529/biophysj.105.067322
14. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, et al. Dependency of Colorectal Cancer on a TGF- $\beta$ -Driven Program in Stromal Cells for Metastasis Initiation. *Cancer Cell*. 2012;22(5):571-584. doi:10.1016/j.ccr.2012.08.013
15. Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, et al. A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell*. 2013;24(4):466-480. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.018
16. Chen T, Zhu J, Cai T, et al. Suppression of non-small cell lung cancer migration and invasion by hsa-miR-486-5p via the TGF- $\beta$ /SMAD2 signaling pathway. *J Cancer*. 2019;10(24):6014-6024. doi:10.7150/jca.35017
17. Chen XF, Zhang HJ, Wang HB, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human lung cancer cells via PI3K/Akt and MEK/Erk1/2 signaling pathways. *Molecular Biology Reports*. 2012;39(4):3549-3556. doi:10.1007/s11033-011-1128-0
18. Choi Y, Lee HJ, Jang MH, et al. Epithelial-mesenchymal transition increases

- during the progression of in situ to invasive basal-like breast cancer. *Human Pathology*. 2013;44(11):2581-2589. doi:10.1016/j.humpath.2013.07.003
19. Colak S, ten Dijke P. Targeting TGF- $\beta$  Signaling in Cancer. *Trends in Cancer*. 2017;3(1):56-71. doi:10.1016/j.trecan.2016.11.008
  20. DaCosta Byfield S, Major C, Laping NJ, Roberts AB. SB-505124 Is a Selective Inhibitor of Transforming Growth Factor- $\beta$  Type I Receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol*. 2004;65(3):744. doi:10.1124/mol.65.3.744
  21. Denecker G, Vandamme N, Akay Ö, et al. Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death Differ*. 2014;21(8):1250-1261. doi:10.1038/cdd.2014.44
  22. Domvri K, Zarogoulidis P, Darwiche K, et al. Molecular Targeted Drugs and Biomarkers in NSCLC, the Evolving Role of Individualized Therapy. *J Cancer*. 2013;4(9):736-754. doi:10.7150/jca.7734
  23. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature Medicine*. 1999;5(12):1365-1369. doi:10.1038/70932
  24. Fan Q, Qiu MT, Zhu Z, et al. Twist induces epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinogenesis by regulating the TGF- $\beta$ /Smad3 signaling pathway. *Oncology Reports*. 2015;34(4):1787-1794. doi:10.3892/or.2015.4143
  25. Fox AH, Lamond AI. Paraspeckles. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010;2(7):a000687-a000687. doi:10.1101/cshperspect.a000687
  26. Gao J, Zhu Y, Nilsson M, Sundfeldt K. TGF- $\beta$  isoforms induce EMT independent migration of ovarian cancer cells. *Cancer Cell Int*. 2014;14(1):72. doi:10.1186/s12935-014-0072-1
  27. Garrison K, Hahn T, Lee WC, Ling LE, Weinberg AD, Akporiaye ET. The small molecule TGF- $\beta$  signaling inhibitor SM16 synergizes with agonistic OX40 antibody to suppress established mammary tumors and reduce spontaneous metastasis. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(4):511-521. doi:10.1007/s00262-011-1119-y
  28. Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, et al. Prevention, Diagnosis, Therapy, and Follow-up of Lung Cancer. *Pneumologie*. 2011;65(01):39-59. doi:10.1055/s-0030-1255961
  29. Gómez-Gil V. Therapeutic Implications of TGF $\beta$  in Cancer Treatment: A Systematic Review. *Cancers*. 2021;13(3):379. doi:10.3390/cancers13030379
  30. Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, Gold LI, Arrick BA. Immunohistochemical Staining for Transforming Growth Factor  $\beta_1$  Associates with Disease Progression in Human Breast Cancer. *Cancer Res*. 1992;52(24):6949.
  31. Hahn JN, Falck VG, Jirik FR. Smad4 deficiency in T cells leads to the Th17-associated development of premalignant gastroduodenal lesions in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(10):4030-4042. doi:10.1172/JCI45114
  32. Halder SK, Beauchamp RD, Datta PK. A Specific Inhibitor of TGF- $\beta$  Receptor Kinase, SB-431542, as a Potent Antitumor Agent for Human Cancers. *Neoplasia*. 2005;7(5):509-521. doi:10.1593/neo.04640
  33. Hao Y, Baker D, ten Dijke P. TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *IJMS*. 2019;20(11):2767. doi:10.3390/ijms20112767
  34. Hasegawa Y, Takanashi S, Kanehira Y, Tsushima T, Imai T, Okumura K. Transforming growth factor- $\beta_1$  level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2001;91(5):964-971. doi:10.1002/1097-0142(20010301)91:5<964::AID-CNCR1086>3.0.CO;2-O
  35. Heldin CH, Moustakas A. Signaling Receptors for TGF- $\beta$  Family Members. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(8):a022053. doi:10.1101/cshperspect.a022053
  36. Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE. Lung cancer. *The Lancet*.

- 2000;355(9202):479-485. doi:10.1016/S0140-6736(00)82038-3
37. Holmgaard RB, Schaer DA, Li Y, et al. Targeting the TGF $\beta$  pathway with galunisertib, a TGF $\beta$ RI small molecule inhibitor, promotes anti-tumor immunity leading to durable, complete responses, as monotherapy and in combination with checkpoint blockade. *J Immunotherapy Cancer*. 2018;6(1):47. doi:10.1186/s40425-018-0356-4
  38. Ikeuchi M, Tsutsui H, Shiomi T, et al. Inhibition of TGF- $\beta$  signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovascular Research*. 2004;64(3):526-535. doi:10.1016/j.cardiores.2004.07.017
  39. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Frontiers in Oncology*. 2017;7. doi:10.3389/fonc.2017.00193
  40. Inman GJ, Nicolás FJ, Callahan JF, et al. SB-431542 Is a Potent and Specific Inhibitor of Transforming Growth Factor- $\beta$  Superfamily Type I Activin Receptor-Like Kinase (ALK) Receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol*. 2002;62(1):65. doi:10.1124/mol.62.1.65
  41. Internet-Redaktion des Krebsinformationsdienstes. Zielgerichtete Krebstherapie: Das Tumorwachstum punktgenau hemmen. krebsinformationsdienst.de. <https://www.krebsinformationsdienst.de/behandlung/gezielte-krebstherapie.php>
  42. Janda E, Nevolo M, Lehmann K, Downward J, Beug H, Grieco M. Raf plus TGF $\beta$ -dependent EMT is initiated by endocytosis and lysosomal degradation of E-cadherin. *Oncogene*. 2006;25(54):7117-7130. doi:10.1038/sj.onc.1209701
  43. Janji B, Melchior C, Gouon V, Vallar L, Kieffer N. Autocrine TGF- $\beta$ -regulated expression of adhesion receptors and integrin-linked kinase in HT-144 melanoma cells correlates with their metastatic phenotype. *Int J Cancer*. 1999;83(2):255-262. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19991008)83:2<255::AID-IJC18>3.0.CO;2-X
  44. Jinnin M, Ihn H, Tamaki K. Characterization of SIS3, a Novel Specific Inhibitor of Smad3, and Its Effect on Transforming Growth Factor- $\beta$ 1-Induced Extracellular Matrix Expression. *Mol Pharmacol*. 2006;69(2):597-607. doi:10.1124/mol.105.017483
  45. Jung H, Kim B, Moon BI, Oh ES. Cytokeratin 18 is necessary for initiation of TGF- $\beta$ 1-induced epithelial–mesenchymal transition in breast epithelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2016;423(1):21-28. doi:10.1007/s11010-016-2818-7
  46. Jung HY, Fattet L, Yang J. Molecular Pathways: Linking Tumor Microenvironment to Epithelial–Mesenchymal Transition in Metastasis. *Clin Cancer Res*. 2015;21(5):962-968. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3173
  47. Kalluri R. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1417-1419. doi:10.1172/JCI39675
  48. Kanaji N. Cytokeratins negatively regulate the invasive potential of lung cancer cell lines. *Oncol Rep*. Published online June 23, 2011. doi:10.3892/or.2011.1357
  49. Karim SM, Zekri J. Chemotherapy for small cell lung cancer: a comprehensive review. *Oncol Rev*. 2012;6(1):4. doi:10.4081/oncol.2012.e4
  50. Kartenbeck J, Schmelz M, Franke WW, Geiger B. Endocytosis of junctional cadherins in bovine kidney epithelial (MDBK) cells cultured in low Ca<sup>2+</sup> ion medium. *Journal of Cell Biology*. 1991;113(4):881-892. doi:10.1083/jcb.113.4.881
  51. Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. TGF- $\beta$ 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res*. 2005;6(1):56. doi:10.1186/1465-9921-6-56
  52. Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. TGF- $\beta$  signaling and epithelial–mesenchymal transition in cancer progression. *Current Opinion in Oncology*. 2013;25(1):76-84. doi:10.1097/CCO.0b013e32835b6371
  53. Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, et al. Smad7 Binds to Smurf2 to Form an E3 Ubiquitin Ligase that Targets the TGF $\beta$  Receptor for Degradation. *Molecular Cell*. 2000;6(6):1365-1375. doi:10.1016/S1097-2765(00)00134-9

54. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, et al. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *Journal of Experimental Medicine*. 1986;163(5):1037-1050. doi:10.1084/jem.163.5.1037
55. Kim JH, Jang YS, Eom KS, et al. Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition of A549 Cells. *J Korean Med Sci*. 2007;22(5):898-904. doi:10.3346/jkms.2007.22.5.898
56. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & development*. 1994;8(2):133-146.
57. Kitagawa K, Murata A, Matsuura N, et al. Epithelial-mesenchymal transformation of a newly established cell line from ovarian adenocarcinoma by transforming growth factor- $\beta$ 1. *Int J Cancer*. 1996;66(1):91-97. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19960328)66:1<91::AID-IJC16>3.0.CO;2-E
58. Korpál M, Yan J, Lu X, Xu S, Lerit DA, Kang Y. Imaging transforming growth factor- $\beta$  signaling dynamics and therapeutic response in breast cancer bone metastasis. *Nat Med*. 2009;15(8):960-966. doi:10.1038/nm.1943
59. Kovacs RJ, Maldonado G, Azaro A, et al. Cardiac Safety of TGF- $\beta$  Receptor I Kinase Inhibitor LY2157299 Monohydrate in Cancer Patients in a First-in-Human Dose Study. *Cardiovasc Toxicol*. 2015;15(4):309-323. doi:10.1007/s12012-014-9297-4
60. Kramer N, Walzl A, Unger C, et al. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2013;752(1):10-24. doi:10.1016/j.mrrev.2012.08.001
61. Krebs AM, Mitschke J, Lasierra Losada M, et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat Cell Biol*. 2017;19(5):518-529. doi:10.1038/ncb3513
62. Kumar S, Guleria R, Mohan A, Singh V, Bharti AC, Das BC. Efficacy of Plasma TGF- $\beta$ 1 Level in Predicting Therapeutic Efficacy and Prognosis in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Investigation*. 2011;29(3):202-207. doi:10.3109/07357907.2010.543208
63. Lamouille S, Connolly E, Smyth JW, Akhurst RJ, Derynck R. TGF- $\beta$ -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *Journal of Cell Science*. 2012;125(5):1259-1273. doi:10.1242/jcs.095299
64. Lamouille S, Derynck R. Cell size and invasion in TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *Journal of Cell Biology*. 2007;178(3):437-451. doi:10.1083/jcb.200611146
65. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(3):178-196. doi:10.1038/nrm3758
66. Lascombe I, Clairotte A, Fauconnet S, et al. N-Cadherin as a Novel Prognostic Marker of Progression in Superficial Urothelial Tumors. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(9):2780-2787. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2387
67. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 2.1, 2022, AWMF-Registernummer: 020/007OL. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/lungenkarzinom/>
68. Li S, Liu M, Do MH, et al. Cancer immunotherapy via targeted TGF- $\beta$  signalling blockade in TH cells. *Nature*. 2020;587(7832):121-125. doi:10.1038/s41586-020-2850-3
69. Liu S, Ren J, ten Dijke P. Targeting TGF $\beta$  signal transduction for cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther*. 2021;6(1):8. doi:10.1038/s41392-020-00436-9

70. Lv ZD, Kong B, Li JG, et al. Transforming growth factor- $\beta$  1 enhances the invasiveness of breast cancer cells by inducing a Smad2-dependent epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncology Reports*. 2013;29(1):219-225. doi:10.3892/or.2012.2111
71. Maeda M, Johnson KR, Wheelock MJ. Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *Journal of Cell Science*. 2005;118(5):873-887. doi:10.1242/jcs.01634
72. Maier A, Peille AL, Vuaroqueaux V, Lahn M. Anti-tumor activity of the TGF- $\beta$  receptor kinase inhibitor galunisertib (LY2157299 monohydrate) in patient-derived tumor xenografts. *Cell Oncol*. 2015;38(2):131-144. doi:10.1007/s13402-014-0210-8
73. Margadant C, Sonnenberg A. Integrin-TGF- $\beta$  crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Reports*. 2010;11(2):97-105. doi:10.1038/embor.2009.276
74. Massagué J. TGF $\beta$  in Cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-230. doi:10.1016/j.cell.2008.07.001
75. Massagué J. TGF- $\beta$  signal transduction. *Annual review of biochemistry*. 1998;67:753-791. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.753
76. Massagué J. TGF $\beta$  Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell*. 2000;103(2). doi:0.1016/s0092-8674(00)00121-5
77. Massagué J. TGF $\beta$  signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(10):616-630. doi:10.1038/nrm3434
78. Medici D, Hay ED, Olsen BR. Snail and Slug Promote Epithelial-Mesenchymal Transition through  $\beta$ -Catenin-T-Cell Factor-4-dependent Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 3. Bronner-Fraser M, ed. *MBoC*. 2008;19(11):4875-4887. doi:10.1091/mbc.e08-05-0506
79. Miller JR, McClay DR. Characterization of the Role of Cadherin in Regulating Cell Adhesion during Sea Urchin Development. *Developmental Biology*. 1997;192(2):323-339. doi:10.1006/dbio.1997.8740
80. Mittal V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2018;13(1):395-412. doi:10.1146/annurev-pathol-020117-043854
81. Miyazono K. Transforming growth factor- $\beta$  signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad, Ser B*. 2009;85(8):314-323. doi:10.2183/pjab.85.314
82. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(5):a021873. doi:10.1101/cshperspect.a021873
83. Morris JC, Tan AR, Olencki TE, et al. Phase I Study of GC1008 (Fresolimumab): A Human Anti-Transforming Growth Factor-Beta (TGF $\beta$ ) Monoclonal Antibody in Patients with Advanced Malignant Melanoma or Renal Cell Carcinoma. *PLOS ONE*. 2014;9(3):e90353. doi:10.1371/journal.pone.0090353
84. Mosesson Y, Mills GB, Yarden Y. Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(11):835-850. doi:10.1038/nrc2521
85. Moustakas A, Heldin CH. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Science*. 2007;98(10):1512-1520. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00550.x
86. Mrozek KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):939. doi:10.1186/s12885-018-4845-0
87. Nakajima S, Doi R, Toyoda E, et al. N-Cadherin Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(12):4125-4133. doi:10.1158/1078-0432.CCR-0578-03

88. Nakao A. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *The EMBO Journal*. 1997;16(17):5353-5362. doi:10.1093/emboj/16.17.5353
89. Nakao A, Afrakhte M, Morn A, et al. Identification of Smad7, a TGFβ-inducible antagonist of TGF-β signalling. *Nature*. 1997;389(6651):631-635. doi:10.1038/39369
90. Neel JC, Humbert L, Lebrun JJ. The Dual Role of TGFβ in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *ISRN Molecular Biology*. 2012;2012:1-28. doi:10.5402/2012/381428
91. Nelson WJ. Convergence of Wnt, -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science*. 2004;303(5663):1483-1487. doi:10.1126/science.1094291
92. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, et al. Targeting the TGFβ pathway for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*. 2015;147:22-31. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.001
93. Nickel J, ten Dijke P, Mueller TD. TGF-β family co-receptor function and signaling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2018;50(1):12-36. doi:10.1093/abbs/gmx126
94. Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. *Int J Dev Biol*. 2009;53(8-9-10):1541-1547. doi:10.1387/ijdb.072410mn
95. Nieto MA, Huang RYJ, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell*. 2016;166(1):21-45. doi:10.1016/j.cell.2016.06.028
96. Oft M, Pelf J, Rudaz C. TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes & development*. 1996;(10):2462-2477. doi:10.1101/gad.10.19.2462
97. Ostapoff KT, Cenik BK, Wang M, et al. Neutralizing Murine TGFβR2 Promotes a Differentiated Tumor Cell Phenotype and Inhibits Pancreatic Cancer Metastasis. *Cancer Res*. 2014;74(18):4996-5007. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1807
98. Palacios F, Tushir JS, Fujita Y, D'Souza-Schorey C. Lysosomal Targeting of E-Cadherin: a Unique Mechanism for the Down-Regulation of Cell-Cell Adhesion during Epithelial to Mesenchymal Transitions. *MCB*. 2005;25(1):389-402. doi:10.1128/MCB.25.1.389-402.2005
99. Panis C, Herrera AC, Victorino VJ, Aranome AMF, Cecchini R. Screening of Circulating TGF-β Levels and Its Clinicopathological Significance in Human Breast Cancer. *Anticancer Res*. 2013;33(2):737.
100. Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling by members of the TGF-β family in vascular morphogenesis and disease. *Trends in Cell Biology*. 2010;20(9):556-567. doi:10.1016/j.tcb.2010.06.006
101. Paz-Ares L, Ciuleanu TE, Cobo M, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2021;22(2):198-211. doi:10.1016/S1470-2045(20)30641-0
102. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007;7(6):415-428. doi:10.1038/nrc2131
103. Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, Dijke P ten. TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *Journal of Cell Science*. 1999;112(24):4557-4568. doi:10.1242/jcs.112.24.4557
104. Pietenpol JA, Holt JT, Stein RW, Moses HL. Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87(10):3758-3762. doi:10.1073/pnas.87.10.3758

105. Portella G, Cumming S, Liddell J, et al. Transforming growth factor beta is essential for spindle cell conversion of mouse skin carcinoma in vivo: implications for tumor invasion. *Cell Growth Differ.* 1998;9(5):393-404.
106. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater. *JCO.* 2019;37(7):537-546. doi:10.1200/JCO.18.00149
107. Riely GL. What, When, and How of Biomarker Testing in Non-Small Cell Lung Cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2017;15(5S):686-688. doi:10.6004/jnccn.2017.0073
108. Ryan MB, Corcoran RB. Therapeutic strategies to target RAS-mutant cancers. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(11):709-720. doi:10.1038/s41571-018-0105-0
109. Sadot E, Simcha I, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Geiger B. Inhibition of  $\beta$ -catenin-mediated transactivation by cadherin derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1998;95(26):15339-15344. doi:10.1073/pnas.95.26.15339
110. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology.* 2005;21(1):1-26. doi:10.1007/s10565-005-0085-6
111. Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science.* 2011;121(6):233-251. doi:10.1042/CS20110086
112. Scheel AH, Ansén S, Schultheis AM, et al. PD-L1 expression in non-small cell lung cancer: Correlations with genetic alterations. *OncolImmunology.* 2016;5(5):e1131379. doi:10.1080/2162402X.2015.1131379
113. Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC, et al. Prädiktive PD-L1-Immunhistochemie beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom: Aktueller Stand und Erfahrungen der ersten deutschen Harmonisierungsstudie. *Pathologe.* 2016;37(6):557-567. doi:10.1007/s00292-016-0189-1
114. Schrank Z, Chhabra G, Lin L, et al. Current Molecular-Targeted Therapies in NSCLC and Their Mechanism of Resistance. *Cancers.* 2018;10(7):224. doi:10.3390/cancers10070224
115. Seetharamu N, Preeshagul I, Sullivan K. New PD-L1 inhibitors in non-small cell lung cancer - impact of atezolizumab. *LCTT.* 2017;Volume 8:67-78. doi:10.2147/LCTT.S113177
116. Sow H, Ren J, Camps M, Ossendorp F, ten Dijke P. Combined Inhibition of TGF- $\beta$  Signaling and the PD-L1 Immune Checkpoint Is Differentially Effective in Tumor Models. *Cells.* 2019;8(4):320. doi:10.3390/cells8040320
117. Sowa H, Kaji H, Kitazawa R, et al. Menin Inactivation Leads to Loss of Transforming Growth Factor  $\beta$  Inhibition of Parathyroid Cell Proliferation and Parathyroid Hormone Secretion. *Cancer Research.* 2004;64(6):2222-2228. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3334
118. 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: A Cancer Journal for Clinicians.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
119. Targeted Cancer Therapies Fact Sheet - National Cancer Institute. Published December 3, 2021. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet>
120. Targeted Therapy for Cancer - NCI. Published August 15, 2014. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies>
121. Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Stork D, et al. TGF $\beta$  drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature.* 2018;554(7693):538-543.

doi:10.1038/nature25492

122. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511(7511):543-550. doi:10.1038/nature13385
123. Tian X, Liu Z, Niu B, et al. E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Complex and the Epithelial Barrier. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011;2011:1-6. doi:10.1155/2011/567305
124. Tian YC, Fraser D, Attisano L, Phillips AO. TGF- $\beta$  1 -mediated alterations of renal proximal tubular epithelial cell phenotype. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2003;285(1):F130-F142. doi:10.1152/ajprenal.00408.2002
125. Tran HD, Luitel K, Kim M, Zhang K, Longmore GD, Tran DD. Transient SNAI1 Expression Is Necessary for Metastatic Competence in Breast Cancer. *Cancer Research*. 2014;74(21):6330-6340. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0923
126. Ungefroren H. Blockade of TGF- $\beta$  signaling: a potential target for cancer immunotherapy? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2019;23(8):679-693. doi:10.1080/14728222.2019.1636034
127. Vogelmann R, Nguyen-Tat MD, Giehl K, Adler G, Wedlich D, Menke A. TGF $\beta$ -induced downregulation of E-cadherin-based cell-cell adhesion depends on PI3-kinase and PTEN. *Journal of cell science*. 2005;118(20):4901-4912.
128. Vora HH, Patel NA, Rajvik KN, et al. Cytokeratin and Vimentin Expression in Breast Cancer. *Int J Biol Markers*. 2009;24(1):38-46. doi:10.1177/172460080902400106
129. Wang Y, Liu J, Ying X, Lin PC, Zhou BP. Twist-mediated Epithelial-mesenchymal Transition Promotes Breast Tumor Cell Invasion via Inhibition of Hippo Pathway. *Sci Rep*. 2016;6(1):24606. doi:10.1038/srep24606
130. Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. Garland science; 2013.
131. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *Journal of Cell Science*. 2008;121(6):727-735. doi:10.1242/jcs.000455
132. Wick W, Platten M, Weller M. Glioma Cell Invasion: Regulation of Metalloproteinase Activity by TGF- $\beta$ . *Journal of Neuro-Oncology*. 2001;53(2):177-185. doi:10.1023/A:1012209518843
133. Xie F, Ling L, van Dam H, Zhou F, Zhang L. TGF- $\beta$  signaling in cancer metastasis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2018;50(1):121-132. doi:10.1093/abbs/gmx123
134. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*. 2009;19(2):156-172. doi:10.1038/cr.2009.5
135. Yang B, Bai J, Shi R, et al. TGFB2 serves as a link between epithelial-mesenchymal transition and tumor mutation burden in gastric cancer. *International Immunopharmacology*. 2020;84:106532. doi:10.1016/j.intimp.2020.106532
136. Yao Z, Fenoglio S, Gao DC, et al. TGF- IL-6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(35):15535-15540. doi:10.1073/pnas.1009472107
137. Yap AS, Crampton MS, Hardin J. Making and breaking contacts: the cellular biology of cadherin regulation. *Current Opinion in Cell Biology*. 2007;19(5):508-514. doi:10.1016/j.ceb.2007.09.008
138. Yeh HW, Hsu EC, Lee SS, et al. PSpC1 mediates TGF- $\beta$ 1 autocrine signalling and Smad2/3 target switching to promote EMT, stemness and metastasis. *Nat Cell Biol*. 2018;20(4):479-491. doi:10.1038/s41556-018-0062-y
139. Yeh HW, Lee SS, Chang CY, Lang YD, Jou YS. A New Switch for TGF $\beta$  in Cancer. *Cancer Res*. 2019;79(15):3797-3805. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-2019

140. Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(1):28-39. doi:10.1038/nrc2559
141. Zhang W, Yuan J, Yang Y, et al. Monomeric type I and type III transforming growth factor- $\beta$  receptors and their dimerization revealed by single-molecule imaging. *Cell Res*. 2010;20(11):1216-1223. doi:10.1038/cr.2010.105
142. Zhang X, Liu G, Kang Y, Dong Z, Qian Q, Ma X. N-Cadherin Expression Is Associated with Acquisition of EMT Phenotype and with Enhanced Invasion in Erlotinib-Resistant Lung Cancer Cell Lines. Rota R, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e57692. doi:10.1371/journal.pone.0057692
143. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell Res*. 2009;19(1):128-139. doi:10.1038/cr.2008.328
144. Zheng X, Carstens JL, Kim J, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*. 2015;527(7579):525-530. doi:10.1038/nature16064

# Anhang

## Nutzungsgenehmigung zur Verwendung von Abbildung 1

**Von:** Krebsdaten Dadokre@rki.de  
**Betreff:** AW: Verwendung Abbildung  
**Datum:** 7. März 2023 um 10:14  
**An:** zahra.s.pirzad@med.uni-giessen.de



Sehr geehrte Frau Pirzad,

vielen Dank für Ihre Anfrage.  
Selbstverständlich können Sie die Abbildung für Ihre Arbeit unter Angabe der Quelle nutzen. Sollten Sie die Grafik in Druckauflösung benötigen, geben Sie uns einfach kurz Bescheid.

Alles Gute für Ihre Dissertation!

Mit freundlichen Grüßen  
i.A.  
Ina Schönfeld

\*\*\*\*\*

Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) am Robert Koch-Institut

[www.krebsdaten.de](http://www.krebsdaten.de)  
Soziale Medien und Newsletter: [www.rki.de/socialmedia](http://www.rki.de/socialmedia)

Das Robert Koch-Institut ist ein Bundesinstitut im  
Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Gesundheit

-----Ursprüngliche Nachricht-----  
Von: kontakt-rki@noreply.bund.de <kontakt-rki@noreply.bund.de>  
Gesendet: Sonntag, 5. März 2023 16:56  
An: Krebsdaten <Dadokre@rki.de>  
Betreff: Verwendung Abbildung

Name: Zahra Pirzad  
Institution: Molekulare Onkologie Justus-Liebig-Universität Gießen  
Bericht: berichtkeinen  
Straße:  
PLZ:  
Ort:  
E-Mail: [zahra.s.pirzad@med.uni-giessen.de](mailto:zahra.s.pirzad@med.uni-giessen.de)  
Betreff: Verwendung Abbildung

Sehr geehrte Damen und Herren,

ich bin arbeite derzeit an meiner Dissertation zum Thema metastasierter Lungenkarzinomen. Hierfür würde ich in meiner Einleitung gerne Abbildung 3.12.5 aus "Krebs in Deutschland 2017/2018" nutzen und bitte daher um die entsprechende Einwilligung.

Vielen Dank

Mit freundlichen Grüßen  
Zahra Pirzad

## Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir auf dem Weg zum Abschluss dieser Arbeit geholfen haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Menke für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des spannenden, anschaulichen und aktuellen Themas dieser Arbeit. Vielen Dank auch bei der Unterstützung aller aufgetretenen Fragen, Schwierigkeiten und Denkanstößen, die besonders zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich ebenfalls bei der Arbeitsgruppe Menke/Giehl für das angenehme Arbeiten und den wissenschaftlichen Austausch miteinander.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Freundinnen bedanken, die mich teilweise schon seit meiner Schulzeit begleiten, mich jederzeit unterstützt haben und immer für mich da waren.

Zum Schluss danke ich insbesondere meiner Mutter, die nicht nur während meines Studiums, sondern auch in allen anderen Lebenslagen immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir emotionalen Rückhalt, Stärke und Ausdauer gibt.