

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

M.Sc. Rebecca Weber

aus: Homburg

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 2018

Die Regulation der Glycodelin-Expression im Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom

Gutachter: Prof. Dr. Peter Angel

Prof. Dr. Holger Sültmann

Erklärung

Erklärung gemäß § 8 Abs. 3 Buchstabe c) und d) der Promotionsordnung der Universität Heidelberg für die Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät:

Hiermit erkläre ich, dass

c) ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

d) ich kein Prüfungsverfahren an einer anderen Stelle beantragt, beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderer Form nicht anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Weinheim, den 19. Oktober 2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Lungenkarzinom	1
1.2	Deregulierte Signalwege im NSCLC.....	2
1.3	Glycodelin und seine Funktion in der Reproduktion.....	4
1.4	Glycodelin in Tumorerkrankungen.....	6
1.5	Einfluss von Glycodelin auf die Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen.....	8
1.6	Immunmodulatorische Effekte von Glycodelin.....	9
1.7	Regulation der Glycodelin-Expression.....	10
2	Zielsetzung der Arbeit.....	13
3	Material und Methoden	15
3.1	Material	15
3.1.1	Puffer und Lösungen	24
3.1.2	Medien zur Kultivierung bakterieller Zellen	26
3.1.3	Medien zur Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	26
3.1.4	Bakterienstamm und Zelllinien.....	27
3.1.5	Referenz-RNA.....	28
3.2	Methoden	28
3.2.1	Patientenproben	28
3.2.2	Zellbiologische Methoden.....	29
3.2.3	Biochemische Methoden	33
3.2.4	Molekularbiologische Methoden	36
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Die <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression wird durch die Signalweginduktoren LPA, PMA, EGF, HB-EGF und TGF- β stimuliert	41
4.2	Intrazelluläre Signalwege unter Beteiligung von PKC, AKT und RAF/MEK beeinflussen die <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression.....	48
4.3	Die Induktion der <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression durch die Transkriptionsfaktoren JUNB, NF κ B1 und STAT3.....	55

4.4	Interaktionen zwischen Signalweginduktoren, intrazellulären Signalwegen und Transkriptionsfaktoren im Hinblick auf die <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression	60
4.5	Die Regulation der <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression in Tumorgewebe	67
5	Diskussion	71
5.1	Die Regulation der <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression im Zellkultursystem	71
5.2	Die Regulation der <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression in Patientengeweben ist vergleichbar mit dem Zellkultursystem	78
5.3	Glycodelin als ein mögliches Zielmolekül in der Behandlung von NSCLC.....	79
5.4	Schlussfolgerung	81
5.5	Ausblick	82
6	Literaturverzeichnis.....	85
7	Appendix	95
7.1	Ergänzende Informationen.....	95
7.2	Abkürzungen	97
8	Publikationen	103
9	Erklärung zur Beteiligung Dritter.....	105
10	Danksagung	107

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: EGFR-induzierte Signalkaskaden.....	3
Abbildung 1.2: Funktionen von Glycodelin in der Reproduktion	6
Abbildung 1.3: Übersicht über bisher postulierte Regulatoren der Glycodelin-Expression	11
Abbildung 4.1: Zeitabhängige Induktion der Glycodelin-Expression durch PMA.....	42
Abbildung 4.2: Hohe hCG-Konzentrationen stimulieren die <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression und führen zu einer veränderten Struktur des Zellverbandes	43
Abbildung 4.3: Die Signalweginduktoren LPA, PMA, EGF und HB-EGF induzieren die <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression.....	44
Abbildung 4.4: TGF- β ist ein Induktor der <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression	48
Abbildung 4.5: Übersicht über untersuchte Regulatoren der <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression und die im Folgenden adressierten Signalwege.....	49
Abbildung 4.6: Die <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression wird durch die Inhibierung von PKC, AKT und RAF/MEK beeinflusst.....	51
Abbildung 4.7: AKT ist in H1975-Zellen stärker aktiviert als in 2106T-Zellen.....	52
Abbildung 4.8: Der EGFR-TKI vermindert die Glycodelin-Expression ausschließlich auf Proteinebene	53
Abbildung 4.9: Übersicht über analysierte Regulatoren der <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression und die als nächstes adressierten Transkriptionsfaktoren.....	55
Abbildung 4.10: Das <i>Silencing</i> von <i>JUNB</i> reprimiert die <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression	57
Abbildung 4.11: Der <i>Knock-down</i> von <i>NFκB1</i> reduziert die <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression	58
Abbildung 4.12: Die <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression wird durch <i>Silencing</i> von <i>STAT3</i> supprimiert.....	59
Abbildung 4.13: Übersicht über untersuchte Regulatoren der <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression und mögliche Interaktionen	60
Abbildung 4.14: Zeitabhängige Stimulation der PKC-Aktivität durch PMA.....	61
Abbildung 4.15: LPA-, PMA-, EGF- und HB-EGF induzieren Glycodelin-Expression PKC- abhängig.....	63
Abbildung 4.16: Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges sowie der Transkriptionsfaktoren JUNB, NF κ B, Smad2 und STAT3 durch verschiedene Induktoren.....	65
Abbildung 4.17: LPA, EGF und HB-EGF induzieren den PI3K/AKT-Signalweg ohne die Glycodelin-Expression zu beeinflussen.....	66

Abbildung 5.1: Zusammenfassende Übersicht über untersuchte Regulatoren der
PAEP/Glycodelin-Expression 78

Abbildung 7.1: Der EGFR-TKI beeinflusst die Sekretion von Glycodelin nicht 96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Chemikalien	15
Tabelle 3.2: Reagenzien, Lösungen, Medien und Puffer	16
Tabelle 3.3: siRNAs	17
Tabelle 3.4: Signalweginduktoren	17
Tabelle 3.5: Signalwegmodulatoren	18
Tabelle 3.6: Primärantikörper	19
Tabelle 3.7: Sekundärantikörper	20
Tabelle 3.8: Größenstandards	20
Tabelle 3.9: Kommerzielle Reaktions- und Nachweissysteme	20
Tabelle 3.10: <i>Primer</i>	21
Tabelle 3.11: Materialien	22
Tabelle 3.12: Geräte	22
Tabelle 3.13: Analyse- <i>Software</i> und Webseiten	23
Tabelle 3.14: Zusammensetzung des Trenngels	34
Tabelle 3.15: Zusammensetzung des Sammelgels	34
Tabelle 4.1: Informationen zu differentiell exprimierten Genen (Faktor < -1,5 oder > 1,5) nach der Behandlung mit LPA, PMA, EGF und HB-EGF	45
Tabelle 4.2: <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> (IPA) vorgeschalteter Regulatoren, die eine erhöhte <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression in NSCLC-Zellen beeinflussen	46
Tabelle 4.3: Zusammenfassende Darstellung der bisherigen Ergebnisse	54
Tabelle 4.4: Patienten- und Tumorcharakteristika	68
Tabelle 4.5: Informationen zu differentiell exprimierten Genen (Faktor < -1,5 oder > 1,5) in NSCLC-Gewebe mit hoher <i>PAEP</i> -Expression	69
Tabelle 4.6: <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> (IPA) vorgeschalteter Regulatoren in NSCLC- Gewebe mit hoher <i>PAEP</i> -Expression	69
Tabelle 7.1: <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> (IPA) zu Krankheiten und biologischen Funktionen in NSCLC-Zellen mit einer erhöhten <i>PAEP</i> /Glycodelin-Expression	96

Zusammenfassung

Glycodelin (Genname: *progesterone associated endometrial protein, PAEP*) wurde initial als ein Immunsuppressor während der Implantation des Embryos und in der Schwangerschaft beschrieben. Heute ist dessen Expression ebenfalls in unterschiedlichen Tumorerkrankungen wie unter anderem dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (*non-small cell lung cancer, NSCLC*), einer Form des Lungenkarzinoms, bekannt. In dieser Karzinomart wurde Glycodelin nicht nur als ein möglicher Verlaufsmarker beschrieben, sondern auch als potentiell Zielmolekül zukünftiger Immuntherapien. Signalwege, welche die *PAEP*/Glycodelin-Expression in Tumorerkrankungen regulieren, sind bislang weitestgehend unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss einiger Signalweginduktoren, nachgeschalteter Signalwege und Transkriptionsfaktoren auf die Regulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression untersucht. Als Modell hierfür wurde eine Adenokarzinom (*adenocarcinoma, ADC*)- sowie eine Plattenepithelkarzinom (*squamous cell carcinoma, SQCC*)-Zelllinie verwendet und anschließend die Ergebnisse in NSCLC-Patientengewebe validiert.

Die Expression von *PAEP*/Glycodelin wurde hauptsächlich durch die kanonische TGF- β -Signalkaskade in SQCC-Zellen sowie durch den PKC-Signalweg in beiden Zelllinien induziert. Eine etwas schwächere Stimulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression wurde mit dem MEK/ERK-Signalweg assoziiert. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren JUNB und STAT3 folgte auf eine Stimulation der PKC- und MEK/ERK-Signalkaskade, während NF κ B ausschließlich durch eine starke Induktion der PKC stimuliert wurde. Der PI3K/AKT-Signalweg inhibierte die Expression von *PAEP*/Glycodelin in ADC-Zellen mit aktivierenden *EGFR*- sowie *PIK3CA*-Mutationen und lässt diesbezüglich einen antagonistischen Einfluss gegenüber den anderen untersuchten Signalwegen folgern. Die Validierung dieser Ergebnisse in NSCLC-Patientenproben ergab eine hohe Übereinstimmung mit den *in vitro* Daten.

Verschiedene zugelassene oder in aktuellen Studien verwendete NSCLC-Medikamente hemmen den MEK/ERK- sowie den PI3K/AKT-Signalweg. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass die Inhibierung spezifischer Signalwege in NSCLC-Patienten die Expression von Glycodelin und damit dessen immunsuppressive Wirkung mutationsbedingt beeinflusst. Darüber hinaus ermöglichen Kenntnisse über die Regulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression weitere therapeutische Strategien, um die Immunabwehr von NSCLC-Tumoren zu schwächen.

Abstract

Glycodelin (gene name: *progesterone associated endometrial protein, PAEP*) was initially described as an immune system suppressor during the implantation of the embryo and in pregnancy. Today it is also known to be expressed in several cancers including the lung cancer subtype non-small cell lung cancer (NSCLC). In this cancer type glycodelin was described not only as a follow-up biomarker, but also as a potential target for future immunotherapies. Signaling pathways that regulate *PAEP*/Glycodelin-expression in cancer are mostly unknown so far. In this thesis, the influence of several pathway inducers, downstream pathways and transcription factors on the regulation of *PAEP*/Glycodelin-expression was investigated. To this end, an adenocarcinoma (ADC)- and a squamous cell carcinoma (SQCC)-cell line were used and the results were validated in NSCLC-patient tissues afterwards.

The expression of *PAEP*/Glycodelin was notably induced by the canonical TGF- β -signaling cascade in SQCC cells and the PKC-pathway in both cell lines. Stimulated *PAEP*/Glycodelin-expression was also associated with the MEK/ERK-pathway to a lesser extent. Activation of the transcription factors JUNB and STAT3 followed the stimulation of the PKC- and MEK/ERK-signaling cascade, while stimulation of NF κ B required a strong PKC-activity. Furthermore, the PI3K/AKT-pathway repressed the expression of *PAEP*/Glycodelin in ADC-cells with activating *EGFR*- and *PIK3CA*-mutations and an antagonizing effect towards the other investigated signaling cascades is suggested here. These in vitro data were confirmed principally by analyses of NSCLC-patient tissues.

The MEK/ERK- and the PI3K/AKT-pathway are inhibited by different NSCLC-drugs, which were approved or investigated in current studies. Results of this thesis suggest that the inhibition of specific signaling pathways modulate the expression of glycodelin and its immunosuppressive function in NSCLC-patients depending on their particular mutations. Furthermore, insights into the regulation of *PAEP*/Glycodelin-expression give hints for further therapeutic strategies to weaken the immune defense of NSCLC-tumors.

1 Einleitung

1.1 Das Lungenkarzinom

Das Lungenkarzinom zählt mit 1,8 Millionen diagnostizierten Fällen im Jahr 2012 nicht nur zu den am meisten verbreiteten Krebsarten, sondern ist auch die häufigste krebsbedingte Todesursache weltweit [1]. Der hauptsächliche Auslöser ist das aktive Rauchen von Tabak, jedoch können auch Nichtraucher durch die dauerhafte Aufnahme von Zigarettenrauch am Lungenkarzinom erkranken [2, 3]. Weitere Risikofaktoren sind Radon [4], Asbest [5, 6] und Luftverschmutzungen in Form von beispielsweise hohen Feinstaubbelastungen [7, 8]. Da bei Verwandten ersten Grades eines Lungenkarzinompatienten das Risiko einer Erkrankung 1,51-fach erhöht ist, scheinen ebenfalls erbliche Faktoren bei der Entstehung dieser Krankheit Einfluss zu nehmen [9]. Allerdings sind genetische Ursachen für diese erblichen Faktoren bis heute weitestgehend ungeklärt.

Histologisch können Bronchialtumore in kleinzellige Lungenkarzinome (*small cell lung cancer*, SCLC) und nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) klassifiziert werden, wobei 80 % aller Patienten mit einem primären Lungentumor an NSCLC leiden [10]. Subtypen des NSCLC sind das Adenokarzinom (*adenocarcinoma*, ADC), das Plattenepithelkarzinom (*squamous cell carcinoma*, SQCC) sowie das großzellige Karzinom (*large cell carcinoma*, LCC). Letzteres kommt nur selten vor und spielt damit eine eher untergeordnete Rolle.

Diese Subklassifizierung bestimmt die Wahl der Therapie, denn das Ansprechen von ADC und SQCC auf eingesetzte Medikamente ist unterschiedlich. Neben der klassischen Chemotherapie werden heute zudem Medikamente verwendet, die zielgerichtet gegen Tumore mit spezifischen Mutationen oder Translokationen wirken. Grundlage für die Medikation mit einem entsprechenden Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) sind Mutationen im *epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor* (*epidermal growth factor receptor*, *EGFR*) [11] sowie *anaplastische Lymphomkinase* (*anaplastic lymphoma kinase*, *ALK*)- oder *ROS Protoonkogen 1* (*ROS1*)-Translokationen [12-16], welche vorwiegend in ADCs vorkommen. Bekannte Inhibitoren dieser Art sind Gefitinib und Erlotinib. Die Behandlungsergebnisse konnten damit erheblich verbessert werden: Beispielsweise sprachen 73,7 % der NSCLC-Patienten mit *EGFR*-Mutationen auf eine Behandlung mit dem TKI Gefitinib an, wohingegen die Ansprechrate für eine Standardchemotherapie (Carboplatin-Paclitaxel) bei 30,7 % lag.

Dabei waren die Nebenwirkungen durch Gefitinib schwächer ausgeprägt als bei einer Therapie mit Carboplatin-Paclitaxel [14].

Als ein vielversprechender, neuer Ansatz in der Therapie von ADC- und SQCC-Patienten wird die Entwicklung von Immuncheckpointinhibitoren beschrieben. Derzeit werden Inhibitoren für den T-Zellrezeptor programmierter Zelltod 1 (*programmed death-1*, PD-1), aber auch für den entsprechenden tumorzellassozierten Liganden programmierter Zelltod-Ligand 1 (*programmed death-ligand-1*, PD-L1) eingesetzt. Dabei wird die Interaktion zwischen T-Zellen und Tumorzellen beeinflusst [17]. T-Zellen werden durch die Bindung dieser Liganden an ihre Rezeptoren gehemmt [18]. Der Tumor nutzt diesen Mechanismus und entgeht durch die Expression spezifischer Liganden der immunologischen Abwehrreaktion des Körpers. Der Einsatz von Immuncheckpointinhibitoren soll die T-Zellinhibierung unterdrücken und die Immunantwort gegen den Tumor unterstützen. Für den PD-1-Antikörper Pembrolizumab wurde beispielsweise in einer Studie mit NSCLC-Patienten, deren Tumorzellen eine PD-L-Expression von mindestens 50 % aufwiesen, eine bessere Ansprechrate (44,8 %) sowie geringere Nebenwirkungen (73,4 %) als bei einer platinbasierten Chemotherapie (27,8 % und 90 % jeweils) gezeigt. Zudem waren die Patienten in der Pembrolizumab-Gruppe mit einem progressionsfreien Überleben von 10,3 Monaten deutlich länger stabil als diejenigen in der Chemotherapie-Gruppe mit 6 Monaten [19].

Trotz des Fortschrittes in der Entwicklung neuer Medikamente für die Behandlung des NSCLC ist die Mortalitätsrate nach wie vor hoch. Aufgrund dessen ist die Forschung hinsichtlich einer zuverlässigeren Früherkennung sowie einer effektiveren Therapie erforderlich.

1.2 Deregulierte Signalwege im NSCLC

Verschiedene Mutationen in NSCLC-Tumoren bedingen die Deregulation unterschiedlicher Signalwege. *EGFR*-Mutationen kommen hauptsächlich im ADC vor und sind mit 14 % relativ häufig [20]. Innerhalb der Tyrosinkinase (TK)-Domäne dieses *EGFR*-Gens können aktivierende Mutationen in vier Exons (18 – 21) auftreten. Mit circa 90 % sind dabei Deletionen in Exon 19 (del19) und die Punktmutation mit einer Substitution von Leucin zu Arginin an der Position 858 (L858R) am häufigsten [21]. Diese Mutationen aktivieren den Rezeptor ligandenunabhängig, wodurch folgende nachgeschaltete Signalkaskaden stimuliert werden: Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase (MEK)/Extrazellulär-signalregulierte Kinase (ERK), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (AKT)

sowie Signaltransduktor und Aktivator der Transkription (STAT) (Abbildung 1.1). Daraus resultiert eine gesteigerte Proliferation, Angiogenese, Metastasierung sowie eine reduzierte Apoptose [22], wodurch das Tumorwachstum begünstigt wird. Wie bereits erwähnt, werden Tumore mit *EGFR*-Mutationen zielgerichtet mit TKIs behandelt. EGFR-TKIs konkurrieren mit ATP an der ATP-Bindestelle des EGFR und inhibieren dadurch dessen TK-Aktivität [23]. Im Vergleich zum Wildtyp des Rezeptors haben die TKIs eine höhere Affinität für die Bindung an mutierte EGFRs. Im Laufe der Zeit entwickeln allerdings viele Patienten eine Resistenz gegen die TKIs [24, 25], die häufig durch eine Substitution von Threonin zu Methionin an der Position 790 (T790M) bedingt wird [26]. Die Bindeaffinität der TK-Domäne für ATP wird dadurch erhöht sowie gleichzeitig für reversible EGFR-TKIs vermindert [27]. Aufgrund dessen wurden spezifisch dafür Medikamente wie der irreversible EGFR-TKI Osimertinib (AZD9291) entwickelt.

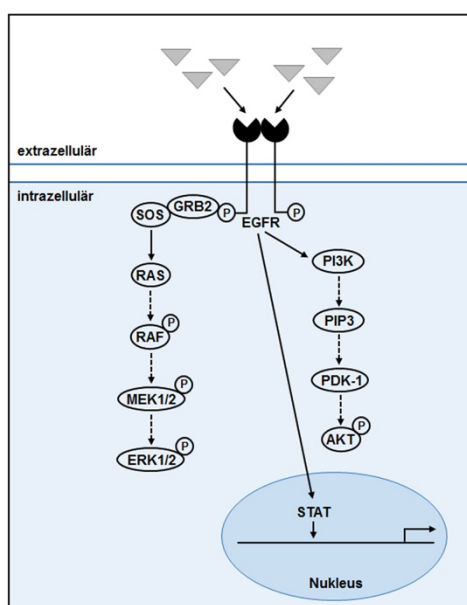


Abbildung 1.1: EGFR-induzierte Signalkaskaden

Die schematische Darstellung zeigt Signalwege, welche dem EGFR nachgeschaltet sind.

Eine Fusion des *echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4)* und des *ALK*-Gens wurde in circa 7 % der NSCLCs detektiert [28]. Hierbei entsteht ein Fusionsprotein, das die Eigenschaft einer TK aufweist. Wie in den meisten Patienten mit einer *EGFR*-Mutation führt diese Fusion somit ebenfalls zu einer Aktivierung des MEK/ERK-, PI3K/AKT- und STAT-Signalweges [29], weshalb entsprechend diagnostizierte Patienten auch mit TKIs behandelt werden.

In 20 % der NSCLCs werden *Kirsten Ratten-Sarkom-Homolog (KRAS)*-Mutationen detektiert, wobei hauptsächlich ADCs und Raucher betroffen sind. Hingegen eher selten sind die *B rapidly accelerated fibrosarcoma (BRAF)*-Mutationen mit 0 – 3 % aller Lungenkarzinomfälle [30]. Sowohl KRAS als auch BRAF sind Komponenten der MEK/ERK-Signalkaskade, welche im Fall einer Mutation oftmals aktiviert wird. Eine zielgerichtete Therapie für KRAS-mutierte Karzinome ist bisher nicht verfügbar. Allerdings zeigen präklinische Studien eine vielversprechende Aktivität des Inhibitors ARS-853, der selektiv KRAS (Substitution von Glycin zu Cystein an der Position 12, G12C) sowie dessen nachgeschaltete Signalwege hemmt [31]. Seit 2017 ist eine Therapiekombination für NSCLC-Patienten mit einer *BRAF*-Mutation mit einer Substitution von Thymin zu Adenin an der Position 1799 (Substitution von Valin zu Glutaminsäure an der Position 600, V600E) zugelassen, die genau diesen Signalweg adressiert. Dabei wird ein BRAF-Inhibitor (Dabrafenib) mit einem MEK-Inhibitor (Trametinib) kombiniert.

Des Weiteren kann eine Mutation des Gens *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA)* den PI3K/AKT-Signalweg deregulieren. Sie ist mit circa 4 % innerhalb der NSCLC-Fälle nicht sehr häufig und betrifft vor allem Patienten mit einem SQCC [32]. Studien bezüglich der Wirkung des PI3K-Inhibitors Burparlisib (BKM120) in NSCLC-Patienten zeigten bisher keine vielversprechenden Ergebnisse [33].

Die durch diverse molekulare Alterationen ausgelöste Deregulation von Signalwegen beeinflusst unter anderem die nachgeschaltete Expression unterschiedlicher Gene und damit auch die Quantität von Proteinen, welche unterschiedliche Funktionen innerhalb der Zelle erfüllen.

1.3 Glycodelin und seine Funktion in der Reproduktion

In den Jahren zwischen 1977 und 1987 wurde ein Protein von mehreren Forschern im Reproduktionstrakt identifiziert und mit diversen Namen beschrieben: *Placental α -globulin* [34], *chorionic α 2-microglobulin* [35], *α -uterine protein* [36], *placental protein 14 (PP14)* [37], *progestogen-dependent endometrial protein (PEP)* [38, 39], *pregnancy-associated endometrial α 2-globulin (α 2-PEG)* [40] und *human β -lactoglobulin homolog* [41] [42]. Heute hat sich der Gennamen *Progesteron-assoziiertes endometriales Protein (progesterone associated endometrial protein, PAEP)* [43] durchgesetzt, wobei das entsprechende Protein als Glycodelin [44] bezeichnet wird. Glycodelin ist ein Glykoprotein der Lipocalin-Familie, deren Mitglieder oftmals als Transporter hydrophober Liganden dienen [45]. Innerhalb dieser Familie weist die Sequenz von Glycodelin eine starke

Homologie mit β -Lactoglobulin auf [41]. Dieses tierische Ortholog wurde beispielsweise für Pferde, Ruminanten [41] und höhere Primaten [46] beschrieben, kommt jedoch nicht bei Ratten oder Mäusen vor. Die bisher beschriebenen vier verschiedenen Isoformen von Glycodelin unterscheiden sich bezüglich ihrer Glycosylierung sowie ihrer Funktion (Abbildung 1.2).

Glycodelin S kommt im Seminalplasma vor [47] und bindet nach einer Ejakulation in die Vagina an die Spermien. Dadurch wird der Efflux von Cholesterol reduziert und die Kapazitation der Spermien inhibiert [48]. Migrieren die Spermien anschließend durch den Zervixschleim, wird Glycodelin S deglycosyliert und damit die Bindung aufgehoben [49].

Eine weitere Isoform, Glycodelin A, wird im Endometrium synthetisiert [50] und in die Uterushöhle [51] sowie die Amnionflüssigkeit [47] sezerniert [52]. Ein Austausch von Glycodelin S zu A löst die Kapazitation der Spermien aus. Glycodelin A inhibiert während der Fertilisation die Bindung der Spermien an die Zona Pellucida der Oocyte [53]. Des Weiteren agiert Glycodelin A immunsuppressiv [49], wodurch das maternale Immunsystem unterdrückt [54] und folglich die Implantation des Embryos unterstützt wird. Dementsprechend wird Glycodelin A während dieser Phase vermehrt exprimiert [55] und steigt im Laufe der Schwangerschaft zunächst kontinuierlich an [56]. Auch im ovulatorischen Zyklus spielt Glycodelin A eine Rolle. Hier erreicht es den höchsten Gehalt in der späten Lutealphase, ist allerdings im Zeitraum der Ovulation nur sehr gering vorhanden [57]. Mit Eintritt in die Postmenopause minimiert sich ebenfalls die Expression von Glycodelin A.

Glycodelin F, welches im Oviduct exprimiert wird, inhibiert die Progesteron-induzierte Akrosomreaktion der Spermien [58]. Darüber hinaus supprimiert es, ähnlich wie Glycodelin A, die Bindung der Spermien an die Zona Pellucida der Oocyten [58].

Die beiden Isoformen Glycodelin A und -F werden von den Kumuluszellen in Glycodelin C umgewandelt, wodurch die Bindung der Spermien an die Zona Pellucida der Oocyte unterstützt wird [59].

Die verschiedenen Funktionen von Glycodelin in der Reproduktion lassen die Bedeutsamkeit dieses Proteins erahnen. In der Tat werden geringe Glycodelin-Mengen mit habituellen Aborten [60, 61] und ungeklärter Fruchtbarkeit [62] in Zusammenhang gebracht.

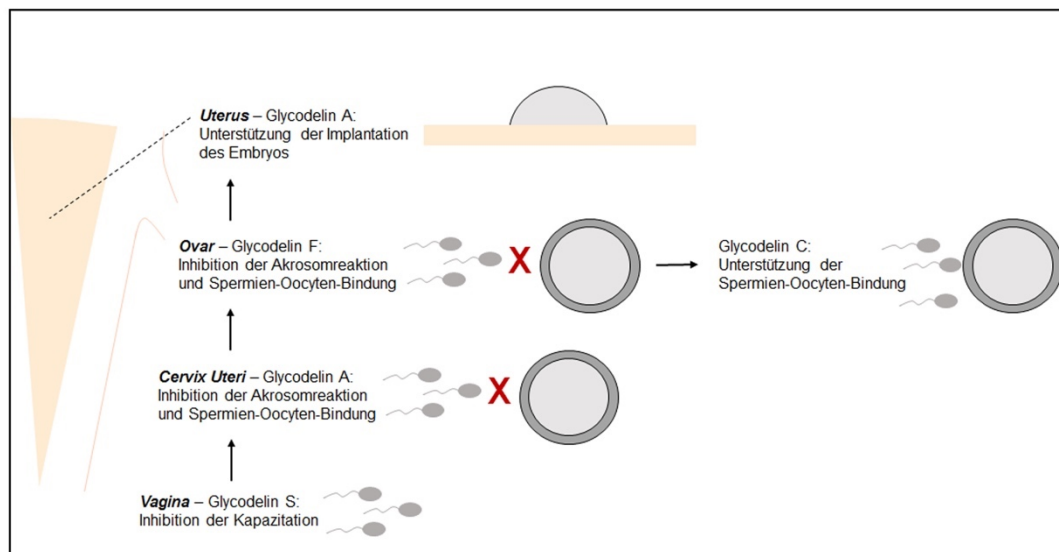


Abbildung 1.2: Funktionen von Glycodelin in der Reproduktion

Die Rolle der verschiedenen Glycodelin-Isoformen im weiblichen Genitaltrakt ist schematisch dargestellt. Modifiziert nach [52].

1.4 Glycodelin in Tumorerkrankungen

Zusätzlich zu seiner ursprünglich entdeckten Funktion in der Reproduktion wurde *PAEP*/Glycodelin ebenfalls in unterschiedlichen Tumorerkrankungen detektiert. Sowohl in hormonassoziierten Tumoren bei Frauen wie dem Mamma- [63], dem Endometrium- [64], dem Ovarial- [65] sowie dem Zervixkarzinom [66] als auch in nicht geschlechtsspezifischen Tumorentitäten wie dem biphasischen Synovialsarkom [67], dem Melanom [68], dem malignen Pleuramesotheliom [69] und dem Lungenkarzinom [70, 71] konnte eine Expression von *PAEP*/Glycodelin bisher nachgewiesen werden. Allerdings bestehen in der Literatur Diskrepanzen hinsichtlich des Einflusses der Gen- beziehungsweise (bzw.) Proteinexpression auf die Malignität und das Überleben innerhalb der verschiedenen Tumorarten. Die diesbezüglich am meisten untersuchten Krebsarten betreffen das Mamma-, das Endometrium-, das Ovarial- und das Lungenkarzinom.

Bereits innerhalb des Mammakarzinoms scheint die Bedeutung von Glycodelin bezüglich der Malignität des Tumors zu variieren. Hautala et al. zeigten, dass in einer sporadischen Erkrankung die Glycodelin-Expression mit weniger aggressiven Eigenschaften wie unter anderem einer niedrigeren Proliferationsrate einhergeht [72]. Im Gegensatz dazu war das Vorkommen von Glycodelin in familiären nicht-*BRCA1/2* mutierten Brusttumoren mit einem schlechteren Krankheitsverlauf verknüpft [72]. Weitere Studien detektierten eine höhere

Glycodelin-Expression in karzinogenem Brustgewebe ohne Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu Tumoren mit Lymphknotenmetastasen [73, 74].

Bei Patienten mit einem Endometriumkarzinom wurde eine höhere Expression von *PAEP*/Glycodelin in Tumorgewebe als in Normalgewebe gezeigt [75, 76]. Dabei wurde Glycodelin A als ein Marker für ein kürzeres Überleben postuliert, was in Zusammenhang mit der immunsuppressiven Eigenschaft von Glycodelin A gestellt wurde [76].

Verschiedene Studien, welche die Glycodelin-Expression von Patienten mit Ovarialkarzinomen untersuchten, kamen zu kontroversen Ergebnissen. Richter et al. fanden keinen Unterschied in der Expression von Glycodelin A zwischen Patienten mit einem Ovarialkarzinom und einer Kontrollgruppe, die allerdings sowohl Patienten mit benignen als auch malignen Erkrankungen beinhaltete [77]. Auch in Zystenflüssigkeiten von Patienten mit benignen, semimalignen und malignen Tumoren waren keine deutlichen Differenzen erkennbar [78]. Dagegen postulierten Scholz et al. eine erhöhte Glycodelin-Konzentration im Serum von Patienten mit benignen gegenüber malignen Ovarialkarzinomen [79]. Einige Studien zeigten auch eine erhöhte Glycodelin-Expression in Ovarialkarzinomen verglichen zu benignen oder gesunden Kontrollen [75, 80]. Darüber hinaus finden sich in der Literatur ebenso widersprüchliche Angaben bezüglich der Korrelation von Glycodelin und dem Überleben von Patienten mit einem Ovarialkarzinom. Zum einen wird Glycodelin mit einer schlechteren Überlebensprognose assoziiert [79], zum anderen zeigte eine weitere Studie den Zusammenhang der Glycodelin-Expression und einer verbesserten 10-Jahresüberlebensrate [81].

In Lungentumoren wurde im Vergleich zu korrespondierendem Normalgewebe ein erhöhter *PAEP*/Glycodelin-Gehalt detektiert [70, 71]. Während in weiblichen NSCLC-Patienten mit erhöhter *PAEP*-Expression die Überlebensrate reduziert war, blieben männliche Patienten davon eher unbeeinflusst. Zusätzlich konnte das Protein im Serum von Patienten mit NSCLC detektiert werden, wobei die Glycodelin-Mengen mit einer Wiedererkrankung und Metastasierung korrelierten [71, 82]. Dieser Zusammenhang befähigt Glycodelin als ein Biomarker, der in der klinischen Überwachung während oder nach einer Therapie eingesetzt werden könnte.

Insgesamt zeigen diese Studien unterschiedliche Einflüsse von Glycodelin auf die Prognose der Patienten. Diese können aufgrund unterschiedlicher Detektionsmethoden und der Verwendung verschiedener Antikörper technisch bedingt sein. Allerdings ist auch eine Varietät der Funktion von Glycodelin zwischen dessen Glycosylierungsformen oder den unterschiedlichen Tumorentitäten möglich.

1.5 Einfluss von Glycodelin auf die Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen

Wie für die Malignität und die Überlebensprognosen gibt es auch hinsichtlich der Funktion von Glycodelin in der Entstehung und der Progression verschiedener Krebsarten gegensätzliche Aussagen. Ein *Silencing* von *PAEP* führte nicht nur zu einer reduzierten Migration in NSCLC- und Melanomzelllinien [71], sondern in Letzteren ebenfalls zu einer inhibierten Invasion [68, 83]. Zudem zeigten Melanomzelllinien mit reduzierter *PAEP*-Expression ein geringeres Tumorstadium im murinen Xenograftmodell [68].

Dagegen stehen einige Ergebnisse mit Karzinomzellen hormonassoziierter Tumorarten bei Frauen. In Endometriumkarzinomzelllinien mit einer Überexpression von *PAEP* wurde eine reduzierte Zellproliferation, morphologische Veränderungen sowie eine reprimierte Expression der anti-apoptotischen Gene *B-cell lymphoma-extra large (Bcl-XL)* und *Mucin-1 (MUC1)* beobachtet [84]. Zudem ging die Akkumulation dieser Zellen in der G1-Phase mit einer vermehrten Expression von Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinase*, CDK)-Inhibitoren einher [85]. Eine PMA-Behandlung von Zellen mit überexprimiertem *PAEP* konnte im Gegensatz zu Kontrollzellen keine Proteinkinase C (PKC) δ -assoziierte Migration stimulieren [86]. Diese Aussagen wurden durch Studien in *PAEP*-komplementärer Desoxyribonukleinsäure (*complementary deoxyribonucleic acid*, cDNA) transfizierten Mammakarzinomzelllinien unterstützt, denn auch hier wurde eine supprimierte Proliferation sowie ein verändertes Wachstumsverhalten mit azinären Strukturen detektiert [87]. Im murinen Xenograftmodell wurde postuliert, dass die transfizierten Zellen einen differenzierteren Phänotyp sowie kleinere Tumore begünstigen [88]. Allerdings wurden auch Hinweise auf eine tumorunterstützende Funktion von Glycodelin gezeigt. Song et al. detektierten eine Glycodelin-bedingte Zunahme der *vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (vascular endothelial growth factor, VEGF)*-Expression in verschiedenen Zellen, darunter Mamma-, Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien [82, 89]. Dies lässt eine Rolle von Glycodelin in der Neovaskularisation vermuten.

Diese Diskrepanzen deuten auf unterschiedliche Einflüsse ausgehend von Glycodelin auf die Malignität in verschiedenen Tumorarten hin. Jedoch spielt bezüglich der Funktion die Glycosylierung von Glycodelin eine große Rolle. Sie könnte ursächlich für einige der Unterschiede sein.

1.6 Immunmodulatorische Effekte von Glycodelin

Glycodelin besitzt eine immunsuppressive Wirkung, die jedoch vermutlich nur von den Isoformen A sowie -F ausgeht und verschiedene Zellen des Immunsystems beeinflusst. Glycodelin S und -C wurde diese Eigenschaft bisher nicht zugeordnet [90]. Zusätzlich zu den in Kapitel 1.5 erwähnten tumorunterstützenden Einflüssen von Glycodelin umgeht der Tumor vermutlich mit Hilfe der Expression von Glycodelin die körpereigene Immunabwehr [71]. Allerdings ist die tumorassoziierte Rolle der unterschiedlichen Isoformen noch nicht vollständig geklärt. Aus der Schwangerschaft sind einige Einflüsse von Glycodelin auf Immunzellen bekannt.

Typ-1-T-Helferzellen (Th1) sowie Typ-2-T-Helferzellen (Th2) wurden durch Glycodelin inhibiert, wobei die Th1-Zellantwort stärker betroffen war [91]. Weiterhin wurde gezeigt, dass Glycodelin an Th1- und Th2-Zellen bindet, jedoch den Zelltod ausschließlich in Th1-Zellen induziert [92]. Bei der Differenzierung von CD4⁺-T-Zellen begünstigt Glycodelin den Th2-Phänotyp [91]. In CD8⁺-T-Zellen ist Glycodelin in der Lage die zytolytische Aktivität gegenüber Zielzellen zu hemmen. In diesem T-Zelltyp war die Proliferation zwar reduziert, allerdings war im Gegensatz zu CD4⁺-T-Zellen eine Resistenz gegenüber der Glycodelin-induzierten Apoptose zu beobachten [93]. Neben direkten Auswirkungen auf T-Zellen beeinflusst Glycodelin auch deren Signalwege, wie die T-Zellrezeptor (*T cell receptor*, TCR)-*cluster of differentiation3* (CD3)- und die Interleukin (IL)-2/Interleukin-2-Rezeptor (IL-2R)-Signaltransduktion. Auch dies trägt zur Verringerung ihrer Aktivität, Immunantwort sowie Zytotoxizität bei und fördert zudem die Apoptose [82].

Darüber hinaus werden B-Zellen von Glycodelin reguliert, indem Proliferation, Immunglobulin (Ig)M-Sekretion und Oberflächenexpression von Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC)-Klasse-II-Molekülen inhibiert werden [94]. In natürlichen Killer (NK)-Zellen wurde die Zytotoxizität gegenüber Zielzellen durch Glycodelin supprimiert [54]. Eine spätere Studie mit Glycodelin-behandelten NK-Zellen aus dem peripheren Blut stellte zwar eine erhöhte Sekretion von IL-6, IL-13 und des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) fest, konnte jedoch keinen Effekt auf ihre Lebensfähigkeit, Zelltod oder Zytotoxizität detektieren [95]. Auch die Funktion von dendritischen Zellen kann durch Glycodelin beeinträchtigt werden. Diesbezüglich postulierten Scholz et al. einen Glycodelin-assoziierten Verlust der immunogenen T-Zell-Stimulation dieses Zelltyps [96].

Für eine Monozytenzelllinie wurde im Gegensatz zu einer T-Zelllinie gezeigt, dass Glycodelin die Apoptose nicht induziert [97]. Demgegenüber stehen Ergebnisse einer neueren Studie, die sowohl in Monozytenzelllinien als auch in den entsprechenden Primärzellen eine mit Glycodelin assoziierte Inhibition der Proliferation und Induktion der Apoptose feststellten [98]. Danach ergaben Untersuchungen von Lee et al. keinen von Glycodelin ausgehenden Effekt auf die Lebensfähigkeit, den Zelltod oder die phagozytische Aktivität von Monozyten und Makrophagen. Dennoch wurde eine erhöhte Produktion von IL-6 detektiert [82, 99].

Aus diesen Studien gehen eindeutig immunsuppressive Funktionen von Glycodelin hervor. Nur bezüglich des Einflusses auf die Apoptose von Monozyten besteht noch Uneinigkeit.

1.7 Regulation der Glycodelin-Expression

Im weiblichen Genitaltrakt wird die Synthese von Glycodelin hormonell von Progesteron [100, 101], dem humanen Choriongonadotropin (hCG) [102, 103] und Relaxin [104] beeinflusst (Abbildung 1.3). Die regulatorischen Signalwege der *PAEP*/Glycodelin-Expression in Tumorerkrankungen sind bisher weitestgehend unbekannt. Jedoch wurde in vorherigen Studien der Einfluss einiger Signalweginduktoren oder -moleküle auf die Glycodelin-Expression in Karzinomzellen beschrieben (Abbildung 1.3). Morrow et al. postulierten die Stimulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression in einer myeloischen Leukämiezelllinie durch die Konditionierung des Kulturmediums mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) [105]. Ebenfalls konnte die *PAEP*/Glycodelin-Expression durch Lysophosphatidsäure (LPA) in Cervix-, Endometrium-, Ovarialkarzinom und myeloischen Leukämiezelllinien induziert werden [106]. Da PMA und LPA allgemein als Aktivatoren der PKC bekannt sind [107, 108], wäre eine Beteiligung dieser Kinase an der *PAEP*/Glycodelin-Expression naheliegend. Umgekehrt zeigten Hautala et al. eine reduzierte Aktivität der PKC-Isoform PKC δ in *PAEP*-transfizierten endometrialen Adenokarzinomzellen. Diese transfizierten Zellen waren zusätzlich unempfindlich gegenüber phänotypischen Veränderungen durch PMA und den transformierenden Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor*- β , TGF- β), wie sie in Kontrollzellen beobachtet wurde. Darüber hinaus wurde eine Stimulation der PKC δ über ERK1/2 angenommen [86]. In einer weiteren Studie wurde durch die Inhibierung von MEK1/2 und der Proteinkinase A (PKA) die Reprimierung von Phytoestrogen-induziertem Glycodelin detektiert [109].

Auch verschiedene Transkriptionsfaktoren wurden mit der Regulation der *PAEP*-Expression in Verbindung gebracht (Abbildung 1.3). Als Genexpressionsaktivatoren wurden das GATA-binde Protein3 (GATA3) [110], der Mikrophthalmie-assoziierte Transkriptionsfaktor (MITF) [83] und das spezifische Protein1 (Sp1) [111] beschrieben. Ausschließlich für den Krüppel-ähnlichen Transkriptionsfaktor11 (*krüppel-like transcription factor11*; KLF11) wurde eine Reprimierung der Glycodelin-Expression angenommen [112].

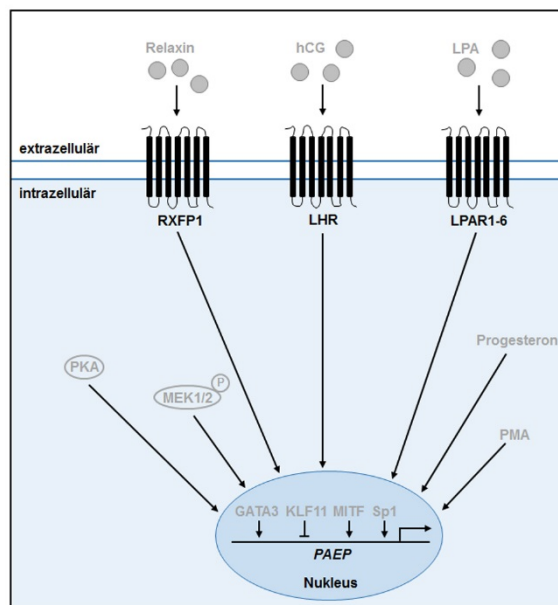


Abbildung 1.3: Übersicht über bisher postulierte Regulatoren der Glycodelin-Expression

Modulatoren der *PAEP*/Glycodelin-Expression sind schematisch dargestellt.

Des Weiteren beschrieben Uchida et al. eine durch Histon-Deacetylaseinhibitoren (HDACI) bedingte Stimulierung von Glycodelin und damit verbunden eine erhöhte Migration humaner endometrialer Adenokarzinomzellen [113]. Da HDACI als potentielles Krebsmedikament diskutiert werden, würden diese Ergebnisse den Einsatz von HDACI zumindest für Glycodelin-exprimierende Tumore in Frage stellen [82].

Auch wenn einige Regulatoren der Glycodelin-Expression bereits beschrieben sind, bleibt die genaue Beteiligung von Signalmechanismen nach wie vor unbekannt.

2 Zielsetzung der Arbeit

Das ursprünglich aus der Reproduktion bekannte immunsuppressive Protein Glycodelin wird von NSCLC-Tumoren exprimiert [71]. Über die Regulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression in Tumoren, und im speziellen im Lungenkarzinom, ist bisher nur sehr wenig bekannt. Im weiblichen Genitaltrakt wird die *PAEP*/Glycodelin-Expression hauptsächlich hormonell von Progesteron [100, 101], hCG [102, 103] und Relaxin [104] reguliert. Vorherige Studien mit Karzinomzellen zeigten, dass die *PAEP*/Glycodelin-Expression von den beiden PKC-Aktivatoren LPA [106] und PMA stimuliert werden kann [105]. Zudem führte eine Inhibierung von MEK1/2 zu einer Reprimierung von Phytoestrogen-induziertem Glycodelin [109]. Im Zusammenhang mit Lungenkarzinomzelllinien wurden diesbezüglich jedoch bisher noch keine Untersuchungen durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Regulatoren der Gen- sowie Proteinexpression von *PAEP*/Glycodelin im NSCLC identifiziert werden. Im Zellkultursystem sollte dafür der Einfluss von ausgewählten Signalweginduktoren, nachgeschalteten Signalwegen und Transkriptionsfaktoren auf die Expression von *PAEP*/Glycodelin untersucht werden. Hierfür wurden zunächst die Signalweginduktoren LPA und PMA, deren Einfluss auf *PAEP*/Glycodelin bereits in anderen Karzinomzelllinien gezeigt wurden [105, 106], sowie der epidermale Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) und der heparinbindende-epidermale Wachstumsfaktor-ähnliche Wachstumsfaktor (*heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor*, HB-EGF) als bekannte Stimulatoren NSCLC-assoziierter Signalkaskaden verwendet. Auf Basis der erhaltenen Daten wurden anschließend nachgeschaltete Signalwege und Transkriptionsfaktoren unter Verwendung von Aktivatoren, Inhibitoren und *small interfering ribonucleic acids* (si)RNAs analysiert. Die *in vitro* generierten Daten sollten anschließend anhand von NSCLC-Patientenproben validiert werden. Ein umfassendes Verständnis der Signalwege, die an der Regulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression beteiligt sind, könnte Hinweise auf Therapieansätze liefern, um die Immunabwehr Glycodelin-exprimierender NSCLC-Tumore zu schwächen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 3.1: Chemikalien

Name	Firma
β -Mercaptoethanol	PanReac AppliChem, Darmstadt
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid-Lösung (30 %) Mix 37,5:1	PanReac AppliChem, Darmstadt
Agar	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose <i>peqGold Universal Agarose</i>	VWR, Radnor (USA)
Ampicillin 99 %	Carl Roth, Karlsruhe
APS Ammoniumpersulfat	PanReac AppliChem, Darmstadt
DMSO Dimethylsulfoxid > 99,5 %	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eosin <i>Yellowish</i>	PanReac AppliChem, Darmstadt
Essigsäure $\geq 99,8$ %	Honeywell Riedel-de Haën, Seelze
Ethanol > 99,8 % <i>p.a.</i>	Carl Roth, Karlsruhe
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	PanReac AppliChem, Darmstadt
HCl 37 % Salzsäure zur Analyse 37 %	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol ≥ 99 %	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver Magermilchpulver	PanReac AppliChem, Darmstadt
Ponceau S (C.I. 27195)	PanReac AppliChem, Darmstadt
Pyronin Y	PanReac AppliChem, Darmstadt
SDS <i>grained pure</i>	PanReac AppliChem, Darmstadt
TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	PanReac AppliChem, Darmstadt

TCA Trichloressigsäure	PanReac AppliChem, Darmstadt
Tris	PanReac AppliChem, Darmstadt
Tween® 20	PanReac AppliChem, Darmstadt
Xylol (<i>Isomere</i>) ≥ 99 % <i>p.a.</i>	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 3.2: Reagenzien, Lösungen, Medien und Puffer

Name	Firma
6x Ladepuffer <i>6x DNA Loading Dye</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
Accutase® <i>solution</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA bovines Serumalbumin <i>Albumin Fraktion V (pH 7,0) for Western blotting</i>	PanReac AppliChem, Darmstadt
DMEM/Ham's F-12 <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
Ethidiumbromid 1 %ige Lösung	Merck, Darmstadt
FBS <i>Heat-Inactivated Fetal Bovine Serum</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
L-Glutamin GlutaMAX™ (100x)	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
PBS-Pufferlösung <i>DPBS (1x) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
PBS-Puffer (10x Dulbecco's)-Pulver	PanReac AppliChem, Darmstadt
<i>Shandon™ Consul-Mount™</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
<i>Shandon™ Gill™ 3 Hematoxilin</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
SOB <i>Super Optimal Broth</i>	Carl Roth, Karlsruhe
TBS (20x <i>Tris-buffered saline</i>)-Pulver	PanReac AppliChem, Darmstadt
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tabelle 3.3: siRNAs

Die siRNAs wurden gemäß den Herstellerangaben gelöst.

Name	Sequenz	Firma
<i>AllStars Negative Control siRNA</i>	nicht angegeben	Qiagen, Hilden
JUNB 3	acagactcgattcatattgaa	Qiagen, Hilden
JUNB 4	aaacacgcacttagtctctaa	Qiagen, Hilden
JUNB 5	cccgacgaccaccatcagcta	Qiagen, Hilden
STAT3 3	ctggctctaactctgattgta	Qiagen, Hilden
STAT3 4	caccttgagaccgaggtgta	Qiagen, Hilden
STAT3 7	cagcctctctgcagaattcaa	Qiagen, Hilden
STAT3 8	caggctggaattatataat	Qiagen, Hilden
NFκB1 7	tacctggtgcctctagtgaaa	Qiagen, Hilden
NFκB1 8	tcagttggtcacaaatggaaa	Qiagen, Hilden
NFκB1 10	gacgcatctatgacagtaaa	Qiagen, Hilden

Tabelle 3.4: Signalweginduktoren

Die Signalweginduktoren wurden gemäß den Herstellerangaben gelöst.

Name	eingesetzte Konzentrationen	Firma	Katalognummer
<i>1-oleoyl lysophosphatidic acid (LPA)</i>	10 μM, 50 μM, 100 μM in Ethanol	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc-222720
<i>epidermal growth factor (EGF), human recombinant</i>	10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml in PBS	Biomol, Hamburg	50349
<i>heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), human recombinant</i>	1 nM, 10 nM, 100 nM in PBS	Biomol, Hamburg	97560
<i>human chorionic gonadotropin (hCG)</i>	500 U, 1000 U, 2000 U in ddH ₂ O	USBiological Life Sciences, Salem (USA)	C5069-21
<i>phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)</i>	1 nM, 10 nM, 100 nM in DMSO	Cayman Chemical, Ann Arbor (USA)	10008014
<i>transforming growth factor-β1 (TGF-β1), human recombinant</i>	1 ng/ml, 2 mg/ml, 5 ng/ml in ddH ₂ O	WuXi Biosciences, San Diego (USA)	WBP1439

<i>transforming growth factor-β2</i> (TGF-β2), <i>human recombinant</i>	1 ng/ml, 2 mg/ml, 5 ng/ml in ddH ₂ O	WuXi Biosciences, San Diego (USA)	WBP1442
<i>transforming growth factor-β3</i> (TGF-β3), <i>human recombinant</i>	1 ng/ml, 2 mg/ml, 5 ng/ml in ddH ₂ O	WuXi Biosciences, San Diego (USA)	WBP1443

Tabelle 3.5: Signalwegmodulatoren

Die Signalwegmodulatoren wurden gemäß den Herstellerangaben gelöst.

Name	adressierter Signalweg	eingesetzte Konzentrationen	Inkubationszeit	Firma	Katalognummer
AZD9291	EGFR-TKI	0,1 μM, 1 μM, 10 μM in DMSO	24 h	Selleckchem, Houston (USA)	S7297
Bortezomib (PS-341)	26S- Proteasom- inhibitor	1 nM, 10 nM, 100 nM in DMSO	25 h	Selleckchem, Houston (USA)	S1013
Bryostatin1	PKC- Aktivator	0,1 nM, 1 nM, 10 nM in DMSO	1 h	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc- 201407
GF109203X	PKC- Inhibitor	1 μM, 5 μM, 10 μM in DMSO	24 h	StressMarq Biosciences, Victoria (Kanada)	SIH-447
MK-2206 2HCl	AKT1/2- Inhibitor	0,1 μM, 1 μM, 10 μM in DMSO	24 h	Selleckchem, Houston (USA)	S1078
RO5126766 (CH5126766)	RAF/MEK- Inhibitor	0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM in DMSO	24 h	Selleckchem, Houston (USA)	S7170

Tabelle 3.6: Primärantikörper

Name	Spezies	Puffer	Firma	Katalognummer
β-Actin (AC-15)	Maus	5 % Milch, 1x PBS/0,1 % Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim	A5441
Akt (pan) (C67E7)	Kaninchen	5 % BSA, 1x TBS/0,1% Tween® 20	Cell Signaling Technology®, Danvers (USA)	4691
ERK1/2 P44/42 MAPK (137F5)	Kaninchen	5 % BSA, 1x TBS/0,1 % Tween® 20	Cell Signaling Technology®, Danvers (USA)	4695
Glycodelin (N20)	Ziege	5 % Milch, 1x PBS/0,1 % Tween® 20	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc-12289
JUNB (C37F9)	Kaninchen	5 % BSA, 1x TBS/0,1 % Tween® 20	Cell Signaling Technology®, Danvers (USA)	3753
NFκB p105/p50	Kaninchen	5 % BSA, 1x TBS/0,1 % Tween® 20	Cell Signaling Technology®, Danvers (USA)	3035
pAKT (Thr308) (D25E6) XP®	Kaninchen	5 % Milch, 1x TBS/0,1 % Tween® 20	Cell Signaling Technology®, Danvers (USA)	13038
pERK1/2 Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	5 % BSA, 1x TBS/0,1 % Tween® 20	Cell Signaling Technology®, Danvers (USA)	9101
pJUNB (Thr102/Thr104) (D3C6)	Kaninchen	5 % BSA, 1x TBS/0,1 % Tween® 20	Cell Signaling Technology®, Danvers (USA)	8053
pNFκB p105 (Ser933) (18E6)	Kaninchen	5 % BSA, 1x TBS/0,1 % Tween® 20	Cell Signaling Technology®, Danvers (USA)	4806
pPKC-Substrate [(R/KXpSX(R/K)) MultiMab™	Kaninchen	5 % Milch, 1x PBS/0,1 % Tween® 20	Cell Signaling Technology®, Danvers (USA)	6967
pSmad2 (Ser465/467) (138D4)	Kaninchen	5 % BSA, 1x TBS/0,1 % Tween® 20	Cell Signaling Technology®, Danvers (USA)	3108
pStat3 (Ser727) (6E4)	Maus	5 % Milch, 1x TBS/0,1 % Tween® 20	Cell Signaling Technology®, Danvers (USA)	9136

Smad2/3	Maus	5 % BSA, 1x TBS/0,1 % Tween® 20	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)	610843
Stat3 (124H6)	Maus	5 % Milch, 1x TBS/0,1 % Tween® 20	Cell Signaling Technology®, Danvers (USA)	9139

Tabelle 3.7: Sekundärantikörper

Name	Spezies	Puffer	Firma	Katalognummer
<i>Peroxidase-linked Goat IgG</i>	Kaninchen	je nach primärem Antikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim	A5420
<i>Peroxidase-linked Mouse IgG</i>	Ziege	je nach primärem Antikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim	A4416
<i>Peroxidase-linked Rabbit IgG</i>	Ziege	je nach primärem Antikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim	A6154

Tabelle 3.8: Größenstandards

Name	Firma
<i>MassRuler™ DNA Ladder Low Range</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)

Tabelle 3.9: Kommerzielle Reaktions- und Nachweissysteme

Name	Firma
2x qPCR Sonden-MasterMix <i>PrimaQuant 2x qPCR Probe-MasterMix</i>	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach
Agilent RNA 6000 Nano Kits	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
<i>AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>CloneJET PCR Cloning Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
<i>Enhanced ChemiLuminescence (ECL) Detection Kit</i> <i>CheLuminate-HRP PicoDetect</i>	PanReac AppliChem, Darmstadt
Entwicklerlösung <i>Carestream® Kodak® GBX Developer and Replenisher</i>	Merck, Darmstadt

Fixierlösung <i>Carestream® Kodak® GBX Fixer and Replenisher</i>	Merck, Darmstadt
<i>GeneChip™ 3' IVT PLUS Reagent Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
<i>GeneChip™ Human Genome U133 Plus 2.0 Array</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
<i>Lipofectamine™ RNAiMax</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
<i>NEBuffer™3.1</i>	New England BioLabs, Ipswich (USA)
<i>NucleoSpin® Plasmid Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren
Restriktionsenzym <i>Bgl II</i>	New England BioLabs, Ipswich (USA)
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Roche, Mannheim

Tabelle 3.10: Primer

Die *Primer* wurden gemäß den Herstellerangaben gelöst. Zu den jeweiligen *Primern* wurden passende UPL-Sonden gewählt.

Name	Sequenz	Firma	UPL-Sonde	Firma
ESD <i>forward</i>	tcagtctgcttcagaacatgg	TIB MOLBIOL, Berlin	#50	Roche, Mannheim
ESD <i>reverse</i>	cctttaatattgcagccacga	TIB MOLBIOL, Berlin	#50	Roche, Mannheim
JUNB <i>forward</i>	caaggtgaagacgctcaagg	TIB MOLBIOL, Berlin	#32	Roche, Mannheim
JUNB <i>reverse</i>	tcatgaccttctgttgagctg	TIB MOLBIOL, Berlin	#32	Roche, Mannheim
NFκB <i>forward</i>	cctggaaccacgcctcta	TIB MOLBIOL, Berlin	#49	Roche, Mannheim
NFκB <i>reverse</i>	ggctcatatggtttccattta	TIB MOLBIOL, Berlin	#49	Roche, Mannheim
PAEP <i>forward</i>	cctgtttctctgcctacagga	TIB MOLBIOL, Berlin	#77	Roche, Mannheim
PAEP <i>reverse</i>	cgctcctccaccaggactct	TIB MOLBIOL, Berlin	#77	Roche, Mannheim
RPS18 <i>forward</i>	ctccacaggaggcctacac	TIB MOLBIOL, Berlin	#46	Roche, Mannheim
RPS18 <i>reverse</i>	cgcaaaatattgctggaacttt	TIB MOLBIOL, Berlin	#46	Roche, Mannheim

STAT3 <i>forward</i>	gagcagagatgtgggaatgg	TIB MOLBIOL, Berlin	#17	Roche, Mannheim
STAT3 <i>reverse</i>	cggctctcaaaggtgatcagg	TIB MOLBIOL, Berlin	#17	Roche, Mannheim

Tabelle 3.11: Materialien

Name	Firma
1,5 ml-Reaktionsgefäß	Carl Roth, Darmstadt
10 cm-Schale	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
12er-Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
50 ml-Reaktionsgefäß	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
384-Mikrotiterplatte	4titude, Dorking (UK)
Film <i>Amersham Hyperfilm™ ECL High performance chemiluminescence film</i>	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
Kryobehälter <i>Mr. Frosty™</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Neubauer-Zählkammer 0,1 mm Kammertiefe	VWR, Radnor (USA)
Nitrozellulosemembran <i>Amersham Protan™ Premium 0,2 µm NC Nitrozellulose Blot Membran</i>	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
Objektträger	NeoLab, Heidelberg
Plastikwaren	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Whatman Papier	VWR, Radnor (USA)
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² und 175 cm ²)	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)

Tabelle 3.12: Geräte

Name	Firma
<i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i>	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Blotapparatur <i>2005 Transphor Elektroblothing Unit</i>	LKB Bromma, Bromma (Schweden)

Elektrophoreseapparatur Hoefer™ Vertikalkammer SE 600 Basic	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
<i>GeneChip™ Fluidics Station 450</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
<i>GeneChip™ Scanner 3000</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
Inkubator	Sanyo, Osaka (Japan)
Kryostat HM 500 OM	Microm International, Walldorf
<i>LightCycler® 480</i>	Roche, Mannheim
Micra D-8 rotor-stator Homogenisator	Micra, Heitersheim
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
Sicherheitswerkbank BSB 4A	Gelaide, Sydney (Australien)
Schüttler <i>Rocking-Shaker PMR-100</i>	Grant Instruments, Cambridge (UK)
Schüttler Rockomat	Tecnomara, Fernwald
<i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
Thermoschüttler KS-15 Control	Edmund Bühler, Bodelshausen
<i>TissueLyser</i>	Qiagen, Hilden
Zentrifuge <i>Centrifuge 5415 R</i>	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge <i>Centrifuge 5417 R</i>	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen

Tabelle 3.13: Analyse-Software und Webseiten

Name	Firma
Blast https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	NCBI, Bethesda (USA)
<i>GenEx 5</i>	Mutid Analysis, Göteborg (Schweden)
<i>Gene Expression Omnibus (GEO)-Datenbank</i>	<i>National Center for Biotechnology Information (NCBI)</i>
<i>GraphPad Prism 5</i>	GraphPad Software, La Jolla (USA)
<i>Expression Console™</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
FinchTV	Geospiza, Seattle (USA)

<i>Ingenuity Pathway Analysis</i> (IPA-42012434)	Qiagen, Hilden
<i>LightCycler® 480 Software release 1.5</i>	Roche, Mannheim
<i>Photoshop Elements</i>	Adobe, San José (USA)
<i>Transcriptome Analysis Console™ 3.0</i>	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad (USA)
<i>UCSC Genome Browser</i> http://genome.ucsc.edu/	[114]

Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Microarray Genexpressionsanalysedaten wurden unter Verwendung der *Software Ingenuity Pathway Analysis* (IPA-42012434, IPA) analysiert. Dabei wurde eine Analysemethode verwendet, die vorgeschaltete Regulatoren differentiell exprimierter Gene (Faktor < -1,5 oder > 1,5) identifiziert (*upstream regulator analysis*). Der errechnete *activation z-score* vereint die aus der Literatur bekannten Interaktionen des vorgeschalteten Regulators mit Zielgenen der Genexpression aus dem zu untersuchenden Datensatz. Dadurch stellt dieser Wert nicht die veränderte Genexpression an sich, sondern die Aktivierung oder Inhibierung vorgeschalteter Regulatoren dar, welche diese bedingt. Ähnlich ist es bei der ebenfalls verwendeten Analysemethode *diseases and bio function*. Hier bezieht sich der *activation z-score* auf die Aktivierung von Molekülen, die einer bestimmten Krankheit oder biologischen Funktion zugeordnet werden. Für beide Methoden wurde eine vergleichende Analyse verwendet, wodurch innerhalb verschiedener Behandlungsmethoden Trends, Ähnlichkeiten oder Unterschiede analysiert werden können.

Die detaillierte Beschreibung der IPA-Analyse ist auf der Homepage des Herstellers (<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/features/>) verfügbar.

3.1.1 Puffer und Lösungen

2x SDS-Probenpuffer

125 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
4 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Glycerol
10 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,02 % (w/v)	Pyronin

50x TAE

2 M	Tris
1 M	Essigsäure
0,05 M	EDTA

1x PBST

	PBS (eingesetzt wie vom Hersteller angegeben)
0,1 % (v/v)	Tween® 20

Ponceaulösung

0,2 % (w/v)	Ponceau
3 % (v/v)	Essigsäure

Eosinlösung

0,75 % (w/v)	Eosin <i>Yellowish</i>
70 % (v/v)	Ethanol
0,5 % (v/v)	Essigsäure

Entfernungspuffer

62,5 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
2 % (w/v)	SDS
7 % (v/v)	β-Mercaptoethanol

Transferpuffer

2,5 mM	Tris
19,2 mM	Glycin
20 % (v/v)	Methanol

1x TBST

	TBS (eingesetzt wie vom Hersteller angegeben)
0,1 % (v/v)	Tween® 20

Tris-/Glycinlaufpuffer

2,5 mM	Tris
19,2 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

3.1.2 Medien zur Kultivierung bakterieller Zellen

Super optimal broth with catabolite repression (SOC)-Medium

26,64 g/L Super Optimal Broth (SOB)

Das SOB-Medium wurde autoklaviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Glucose (Endkonzentration 20 mM) und des Selektionsantibiotikums Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml).

SOC-Medium zum Gießen von Agarplatten

1,5 % (w/v)	Agar
26,64 g/L	SOB

Das SOB-Medium wurde autoklaviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Glucose (Endkonzentration 20 mM) und des Selektionsantibiotikums Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml).

Gießen von SOB-Agarplatten

Das SOB-Agarmedium wurde in der Mikrowelle bis zum Siedepunkt erhitzt. Nach dem Abkühlen auf circa 50 – 60 °C wurde das Selektionsantibiotikum Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µM hinzugefügt. Zum Aushärten wurde das Medium in eine 10 cm-Schale gegossen. Die Lagerung der Agarplatten erfolgte über Kopf bei 4 °C.

3.1.3 Medien zur Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Kulturmedium

	DMEM/Ham's F-12
10 % (v/v)	FBS
1 %	L-Glutamin

Serumfreies Kulturmedium

	DMEM/Ham´s F-12
1 %	L-Glutamin

Kryokonservierungsmedium

	FBS
10 %	DMSO

3.1.4 Bakterienstamm und Zelllinien

3.1.4.1 Bakterienstamm

Chemokompetente *E. (Escherichia) coli* XL1-Blue Zellen wurden von Agilent Technologies (Santa Clara (USA)) erworben.

3.1.4.2 Eukaryotische Zelllinien

H1975-Zellen sind humane ADC-Zellen eines NSCLC-Patienten von 1988 (ATCC, Manassas (USA)). Diese Zellen sind Träger folgender Mutationen:

- *Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor 2A (CDKN2A)* (Substitution von Glutaminsäure zu Nonsense an der Position 69; E69*)
- *EGFR* (T790M)
- *EGFR* (L858R)
- *PIK3CA* (Substitution von Glycin zu Asparaginsäure an der Position 118; G118D)
- *Tumorprotein P53 (TP53)* (Substitution von Arginin zu Histidin an der Position 273; R273H)

2106T-Zellen sind SQCC-Zellen isoliert aus einem NSCLC-Patienten im Jahr 2009. In diesen Zellen wurden *KRAS*- und *EGFR*-Mutationen ausgeschlossen [115]. Betreffend der untersuchten Signalwege sind folgende Mutationen innerhalb des *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta (PIK3CB)*-Gens bekannt. Hierbei können drei unterschiedliche Transkriptvarianten vorliegen:

- Transkriptvariante 1: *PIK3CB* (Substitution von Glycin zu Alanin an der Position 3151 in Exon 22; G3151A und Substitution von Glycin zu Threonin an der Position 1224 in Exon 7; G1224T)

- Transkriptvariante 2: *PIK3CB* (Substitution von Glycin zu Alanin an der Position 3151 in Exon 23; G3151A und Substitution von Glycin zu Threonin an der Position 1224 in Exon 8; G1224T)
- Transkriptvariante 3: *PIK3CB* (Substitution von Glycin zu Alanin an der Position 1504; G1504A)

3.1.5 Referenz-RNA

Die als Referenz eingesetzte *Stratagene qPCR Human Reference Total* Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) wurde von Agilent Technologies (Santa Clara (USA)) bezogen.

3.2 Methoden

3.2.1 Patientenproben

3.2.1.1 Sammlung von Gewebeproben

Gewebeproben von NSCLC-Patienten wurden von der Lungenbiobank Heidelberg bereitgestellt. Vor der Verwendung der Gewebe wurde von allen Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Heidelberg (Nr. 270/2001) zugelassen und umfasst 179 NSCLC-Patienten, die an der Thoraxklinik am Universitätsklinikum Heidelberg operiert wurden. Dabei wurde das Tumorgewebe ebenso wie das korrespondierende normale Lungenparenchym, welches > 5 cm vom Tumor entfernt war, verwendet. Das entnommene Gewebe wurde von Pathologen gemäß der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) Klassifikation für Lungenkrebs von 2004 diagnostiziert. Entsprechend der 7. Edition der *Union of International Cancer Control's (UICC), tumor, node and metastasis* wurde das *Staging* durchgeführt. Innerhalb von 30 min nach der chirurgischen Entfernung der Gewebe wurden diese schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.1.2 Kryosektion von Gewebeproben

Aus den Patientengeweben (Kapitel 3.2.1.1) wurden mit Hilfe eines Kryostats 10 – 15 Schnitte á 10 – 15 µM pro Gewebe angefertigt. Dabei wurden jeweils der erste und der letzte Schnitt zur späteren Validierung des Tumorgehaltes auf einen Objektträger überführt.

Dazwischenliegenden Schnitte wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen wurden mit Hilfe einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Als Zellsystem für alle folgenden zellbiologischen Methoden dienten H1975- und 2106T-Zellen (Kapitel 3.1.4.2).

3.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Die Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in Zellkulturflaschen (25 cm², 75 cm² oder 175 cm²) mit entsprechendem Medium kultiviert. Das Passagieren der Zellen ermöglicht die Kultivierung über einen längeren Zeitraum und erfolgt bei einer Konfluenz von circa 60 – 80 %. Entsprechend der Größe der Zellkulturflasche wurden die adhärenen Zellen mit 2 – 10 ml 1x *phosphate buffered saline* (PBS) (37 °C) gewaschen und durch Zugabe von 1 – 4 ml Accutase[®] gefolgt von einer Inkubation für 5 – 10 min bei 37 °C und 5 % CO₂ vom Flaschenboden gelöst. Die Zugabe des 1,5-fachen Volumens Kulturmedium (37 °C) stoppte die Reaktion der eingesetzten Accutase[®]. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension für 5 min bei 300 x g (Raumtemperatur, RTP), wurde das Zellsediment in 5 ml Kulturmedium (37 °C) resuspendiert und in geeigneten Verdünnungen (1:2 – 1:15) in Zellkulturflaschen (25 cm², 75 cm² oder 175 cm²) mit entsprechenden Volumina Kulturmedium (37 °C) (5 ml, 10 ml oder 25 ml) überführt.

3.2.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zelllinien

Die Kryokonservierung von Zellen ermöglicht deren Lagerung über einen längeren Zeitraum. Zum Zeitpunkt der Kryokonservierung sollten die Zellen in einer Konfluenz von circa 60 – 80 % vorliegen. Zu Beginn wurden die Zellen, wie bereits für das Passagieren (Kapitel 3.2.2.1) beschrieben, vom Flaschenboden gelöst. Vor der Zentrifugation wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einer Trypanblaulösung in der Verdünnung 1:1 gemischt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die restliche Zellsuspension wurde für 5 min bei 300 x g (RTP) sedimentiert. Anschließend erfolgte das Resuspendieren der Zellen in einer geeigneten Menge Kryokonservierungsmedium, sodass

circa 1×10^6 – 2×10^6 Zellen in ein Kryoröhrchen überführt werden konnten. Die Lagerung der Kryoröhrchen in einem mit Isopropanol gefüllten Kryobehälter über Nacht bei -80 °C gewährleistete das langsame Herunterkühlen (-1 °C/min) der Zellen. Am darauffolgenden Tag wurden die mit der Zellsuspension gefüllten Kryoröhrchen zur Langzeitlagerung in eine -150 °C Truhe überführt.

3.2.2.3 Aussäen eukaryotischer Zelllinien

Eine optimale Behandlungs- oder Transfektionseffizienz (Kapitel 3.2.2.4 und 3.2.2.6) ist unter anderem abhängig von der Konfluenz der Zellen. Um diese Bedingungen möglichst einheitlich zu halten, wurden die Zellen am Tag vor ihrer Verwendung ausgesät. Zum Aussäen sollten die Zellen circa 60 – 80 % konfluent sein. Das Ablösen und Zentrifugieren der Zellen erfolgte wie zuvor unter Kultivierung eukaryotischer Zellen dargestellt (Kapitel 3.2.2.1). Nach dem Mischen eines Aliquots der Zellsuspension mit einer Trypanblaulösung (1:1), wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die jeweiligen Fragestellungen erforderten das Aussäen unterschiedlicher Zellzahlen in eine 12er-Mikrotiterplatte (Kapitel 3.2.2.4 und 3.2.2.6).

3.2.2.4 Behandlung eukaryotischer Zellen mit Signalweginduktoren und -modulatoren

Durch die Behandlung der Zellen mit verschiedenen Signalweginduktoren, -aktivatoren und -inhibitoren wurden spezifische Signalwege stimuliert oder gehemmt (Kapitel 3.2.2.5). Dafür wurden am Vortag $1,6 \times 10^5$ Zellen pro Kavität in einer 12er-Mikrotiterplatte ausgesät (Kapitel 3.2.2.3). Zu Beginn des Versuches sollten die Zellen eine Konfluenz von circa 80 % erreicht haben. Um die Zellen auf die Behandlung mit den Signalweginduktoren und -modulatoren vorzubereiten, wurden sie mit serumfreien Kulturmedium (37 °C) gewaschen und anschließend für circa 16 h in diesem Medium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Vor der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Signalweginduktoren, -aktivatoren und -inhibitoren wurde das serumfreie Medium erneuert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2 , variierte jedoch zeitlich je nach Behandlung sowie Fragestellung.

3.2.2.5 Verwendete Signalweginduktoren und -modulator

Zur Behandlung der Zellen (3.2.2.4) wurden unterschiedliche Signalweginduktoren und -modulatoren eingesetzt. Als Kontrolle diente dabei immer die Lösung, in der die jeweilige Substanz aufgenommen wurde oder ddH₂O.

Die Signalweginduktoren hCG, LPA, EGF, HB-EGF und TGF- β 1, -2 und -3 stimulieren anschließende Signalwege über die Bindung an ihren jeweiligen Rezeptor. PMA aktiviert als Diacylglycerol (DAG)-Analogon direkt die PKC. Die Inkubationszeit mit diesen Induktoren betrug 24 h zum Nachweis von *PAEP*/Glycodelin und 30 min – 1 h zur Detektion der Phosphorylierung von Kinasen oder Transkriptionsfaktoren.

Bryostatin1 aktiviert die PKC durch die kompetitive Bindung an ihre DAG-Bindestelle. Dabei werden insbesondere die Isoformen PKC α , PKC δ und PKC ϵ stimuliert [116]. Eine kurze Inkubationszeit induziert die PKC, wohingegen eine verlängerte Aufnahmedauer zu einer Hemmung dieser Kinase führt [117]. Aufgrund dessen wurden die Zellen ausschließlich für 1 h mit Bryostatin1 behandelt. Danach wurde das konditionierte Medium gegen serumfreies Kulturmedium (37 °C) ausgetauscht.

Alle weiteren Modulatoren wurden mit einer Behandlungsdauer von 24 h eingesetzt.

GF109203X ist ein Inhibitor der PKC [118]. Es hemmt selektiv PKC α , PKC β I, PKC β II und PKC γ .

Zur selektiven Hemmung von AKT1/2 wurde MK-2206 verwendet. Dieser allosterische Inhibitor verhindert die Membranlokalisation und damit die Aktivierung von AKT, indem er die inaktive Konformation dieser Kinase stabilisiert.

RO5126766 bindet an MEK und bewirkt dessen Konformationsänderung. Dadurch wird eine von RAF ausgehende Phosphorylierung verhindert und es kommt zu einem stabilen MEK/RAF-Komplex. Dies bedingt eine Hemmung der RAF-Kinase [119].

AZD9291 (Osimertinib) ist ein irreversibler EGFR-TKI, dessen Wirksamkeit bei Mutationen im *EGFR* insbesondere bei der T790M TKI-Resistenz im NSCLC gezeigt wurde [120]. Dementsprechend wurde es ausschließlich für die Behandlung von H1975-Zellen, welche eine T790M-Mutation tragen, eingesetzt. In diesem Zusammenhang wurde auch Bortezomib verwendet, welches ein reversibler Inhibitor des 26S-Proteasoms ist. Da die Zellen vor der eigentlichen Applikation mit Bortezomib für 1 h vorbehandelt wurden, erfolgte die Inkubation für 25 h.

3.2.2.6 siRNA-Transfektion eukaryotischer Zellen

Ziel der siRNA-Transfektion ist es durch das Einbringen fremder siRNA in eukaryotische Zellen das *Silencing* eines Transkriptes mittels RNA-Interferenz zu bewirken. Für diese Methode wurden am Vortag 4×10^4 Zellen pro Kavität in einer 12er-Mikrotiterplatte (Kapitel 3.2.2.3) ausgesät. Die optimale Konfluenz der Zellen vor der Transfektion beträgt circa 80 %. Das Medium der Zellen wurde durch 1,1 ml frisches Kulturmedium (37 °C) ersetzt. Pro Kavität der 12er-Mikrotiterplatte wurden 1,2 µl einer spezifischen siRNA oder der *AllStars Negative Control* siRNA (Endkonzentration 10 nM), welche als Kontrolle verwendet wurde, in 100 µl DMEM/Ham's F-12 verdünnt. Nach der Zugabe von 2 µl *LipofectamineTM RNAiMax*, wurde der Transfektionsansatz gemischt und 10 – 20 min bei RTP inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend tropfenweise zu den Zellen pipettiert und durch kreisförmige Bewegungen gleichmäßig verteilt. Die Inkubation erfolgte für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.2.2.7 Zellernte

Zunächst wurden die Zellen pro Kavität einer 12er-Mikrotiterplatte mit 500 µl 1x PBS (37 °C) gewaschen. Durch die Inkubation mit 300 µl Accutase® für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die adhärennten Zellen vom Boden gelöst. Das Stoppen dieser Reaktion erfolgte durch Zugabe von 500 µl des Kulturmediums (37 °C). Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 300 x g (RTP) wurde das Zellpellet in 1 ml 1x PBS resuspendiert und durch einen erneuten Zentrifugationsschritt sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -21 °C aufbewahrt.

3.2.2.8 Zellyse

Das Lysieren von Zellen dient der Gewinnung von intrazellulären Bestandteilen wie beispielsweise Proteinen für nachfolgende Western Blot-Analysen (Kapitel 3.2.3.4). Die Zellen wurden mit 500 µl 1x PBS (37 °C) pro Kavität einer 12er-Mikrotiterplatte gewaschen. Durch das anschließende Versetzen mit 100 µl 2x SDS-Probenpuffer (99 °C) und die kreisförmigen Bewegungen mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze wurden die Zellen gleichzeitig abgelöst sowie lysiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 99 °C inkubiert.

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Vor der weiteren Verwendung wurde das Patientengewebe bezüglich der darin vorkommenden Anteile lebensfähiger Tumorzellen, Stromazellen, normaler Lungenzellen, infiltrierender Lymphozyten und nekrotischer Bereiche von einem Pathologen beurteilt. Hierzu wurden der erste sowie der letzte Schnitt des zuvor im Kryostat präparierten Patientengewebes (Kapitel 3.2.1.2) benutzt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Zur Durchführung der Färbereihe wurden die jeweiligen Lösungen in Gefäßen vorbereitet und die Objektträger für die entsprechenden Zeitdauern eingetaucht. Zu Beginn erfolgte die Kernfärbung. Dafür wurde der Objektträger für 60 s in *Shandon™ Gill™ 3 Hematoxilin* gegeben. Nach zweimaligem Spülen in ddH₂O wurde 2 % Essigsäure für circa 10 s eingesetzt. Dann wurden die Objektträger für circa 60 s in Leitungswasser getaucht. An die Gegenfärbung mit einer Eosinlösung für 5 s schloss sich eine Ethanolreihe mit 70 %, 96 % und 100 % Ethanol an, welche zur Entwässerung der Schnitte sowie zur Farbdifferenzierung diente. Die Objektträger wurden solange in Ethanol bewegt, bis sich die Färbung differenzierte. Im Anschluss daran wurde Xylol verwendet und die Schnitte in *Shandon™ Consul-Mount™* eingedeckt. Danach erfolgte die mikroskopische Beurteilung.

3.2.3.2 TCA-Fällung von Proteinen

Mit Hilfe der TCA-Fällung wurden Proteine aus dem Medium von Zellkulturen gefällt. Zunächst wurde das Medium von den Zellen abgenommen und für 5 min bei 300 x g (RTP) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer 100 % Trichloressigsäure (TCA)-Lösung gemischt, sodass sich eine 10 % Lösung ergab. Nach einer Inkubation für 30 min auf Eis folgte das Sedimentieren der gefällten Proteine für 30 min bei 11700 x g (4 °C). Das Pellet wurde mit 500 µl Aceton gewaschen und erneut für 5 min bei 11700 x g (4 °C) zentrifugiert. Im Anschluss an das Trocknen des Pellets wurde dieses in 50 µl 2x SDS-Probenpuffer (99 °C) aufgenommen und für 5 min bei 99 °C inkubiert.

3.2.3.3 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) dient der Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld gemäß ihrer molekularen Masse. Im Lysat enthaltene oder aus dem Medium von

Zellkulturen gefällte Proteine wurden auf diese Weise aufgetrennt (Kapitel 3.2.2.8 und 3.2.3.2).

Tabelle 3.14: Zusammensetzung des Trenngels

	Trenngel (10 %)	Trenngel (15 %)
Acrylamid-Lösung (30 %) Mix 37,5:1 (ml)	20	15
1,5 M Tris/HCl pH 8,8 (ml)	15	7,5
ddH ₂ O (ml)	24	7
10 % SDS (µl)	600	300
10 % APS (µl)	300	150
TEMED (µl)	40	20

Tabelle 3.15: Zusammensetzung des Sammelgels

	Sammelgel (10 %)
Acrylamid-Lösung (30 %) Mix 37,5:1 (ml)	2
0,5 M Tris/HCl pH 6,8 (ml)	2,5
ddH ₂ O (ml)	5,3
10 % SDS (µl)	100
10 % APS (µl)	50
TEMED (µl)	10

Lysate, die zuvor mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt worden waren, wurden in die Taschen des Gels geladen. Zusätzlich wurde ein Größenstandard (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit Tris-/Glycinlaufpuffer gefüllten Apparatur für circa 4 h bei einer elektrischen Spannung von 100 – 200 V.

3.2.3.4 Western Blot

Im Western Blot wurden zuvor aufgetrennte Proteine (Kapitel 3.2.3.3) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die anschließende immunologische Detektion ermöglicht die Visualisierung spezifischer Proteine. An eine mit Transferpuffer gefüllte Blotapparatur wurde eine elektrische Stromstärke von 0,5 – 1 A angelegt. Abhängig von der Größe der auf die Nitrozellulosemembran zu transferierenden Proteine erfolgte dies für

1 – 2 h. Danach wurde der Proteintransfer auf die Membran überprüft, indem diese für 20 s bei RTP in einer Ponceaulösung inkubiert wurde. Durch zwei- bis dreimaliges Spülen mit ddH₂O wurde die überschüssige Lösung entfernt, wohingegen das komplette Entfärben unter Verwendung von 1x PBS in zwei aufeinander folgenden Waschschritten für wenige Minuten erfolgte. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurde die Membran gemäß den Herstellerangaben des verwendeten Antikörpers in 5 % Milchpulver (w/v) oder 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) (w/v) in 1x PBST oder 1x *Tris-buffered saline* (TBS)T für 1 h bei RTP inkubiert. Diese Lösung wurde anschließend durch den primären Antikörper ersetzt, welcher in der entsprechenden Blocklösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert wurde. Nach viermaligem Waschen für 10 min mit 1x PBST oder 1x TBST (entsprechend der Verdünnungslösung des Antikörpers) wurde die Membran am Folgetag mit einem sekundären Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase, HRP*)-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei RTP auf einem Schüttler inkubiert. Ebenso wie der primäre Antikörper wurde auch der sekundäre Antikörper in der gleichen Blocklösung verdünnt. Erneut folgten vier Waschschriffe für jeweils 10 min mit 1x PBST oder 1x TBST und ein zusätzlicher Waschschriff ohne Tween[®] 20 für 5 min. Zur Detektion der antikörpergebundenen Proteine wurden die beiden Lösungen des ECL *Detections Kits (CheLuminate-HRP PicoDetect)* gemischt und die Membran für 1 – 2 min darin inkubiert. Durch das Auflegen von Filmen auf die Membran sowie das darauffolgende Entwickeln und Fixieren dieser in geeigneten Lösungen (Entwickler- und Fixierlösung) wurde die entstandene Chemilumineszenz nachgewiesen. Die Filme wurden eingescannt und unter Verwendung der *Software Photoshop Elements* weiterverarbeitet.

3.2.3.5 Entfernung der Antikörper von einer Nitrozellulosemembran

Um verschiedene Proteine ähnlicher molekularer Massen auf einer Nitrozellulosemembran detektieren zu können, ist die Entfernung des zuvor verwendeten Antikörpers nötig. Die Nitrozellulosemembran wurde mit dem Entfernungspuffer für 1 h bei 50 °C auf einem Schüttler inkubiert, wonach ein Waschschriff für 10 min mit 1x PBS oder 1x TBS bei 50 °C und anschließend zwei Waschschriffe bei RTP folgten. Anschließend konnte, wie in Kapitel 3.2.3.4 beschrieben, mit dem Blocken der Membran und den Inkubationsschritten mit den Antikörperlösungen fortgefahren werden.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Wurde das zuvor beurteilte Patientengewebe (Kapitel 3.2.3.1) mit einem Tumorgehalt von $\geq 50\%$ bewertet, war die Mindestvoraussetzung für die RNA-Extraktion erfüllt. RNA wurde sowohl aus Patientengewebe (Kapitel 3.2.1.2) als auch aus geernteten Zelllinien (Kapitel 3.2.2.7) isoliert. Die Tumorschnitte wurden mit dem Gewebehomogenisator *TissueLyser* für 2x 2 min bei 25 Hz homogenisiert. Für die größeren, normalen Lungengewebestücke wurde der Micra D-8 rotor-stator Homogenisator mit DS-5/K1 für 2x 2,5 min bei 25 Hz verwendet. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des *AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kits* nach Angaben des Herstellers aus Patientengewebe isoliert. Die RNA-Extraktion aus Zelllinien erfolgte mittels des *RNeasy Mini Kits*. Unter Verwendung des NanoDrop 1000 Spectrophotometers wurde die Quantität der RNA gemessen. Zur Qualitätskontrolle wurde gemäß den Herstellerangaben des Agilent RNA 6000 Nano Kits und des Agilent 2100 Bioanalyzers die RNA Integrität (*Integrity Number*, RIN) bestimmt. Erfüllte die extrahierte RNA einer Probe die Qualitätsstandards, wurde ein Teil davon bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die restliche RNA wurde in drei voneinander unabhängigen Reaktionen mittels des *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kits* zu cDNA transkribiert. Hierbei wurde die cDNA über verankerte Oligo(dT)18-Nukleotide und *Random* Hexamer-Oligonukleotide aus der RNA synthetisiert. 2 μg RNA, 2,5 μM Oligo(dT)18, 60 μM *Random* Hexamer und die entsprechende Menge ddH₂O wurden zunächst in einem Gesamtvolumen von 13 μl eingesetzt. Um die Denaturierung möglicher Sekundärstrukturen sicherzustellen, erfolgte eine Inkubation für 10 min bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der Ansatz wurde für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt, wonach die Zugabe von 4 μl 5x Reaktionspuffer, 20 U RNase Inhibitor, 1 mM (jeweils) Deoxynukleotide (dNTPs), 10 U reverser Transkriptase und ddH₂O bis zu einem finalen Volumen von 20 μl erfolgte. Zur Durchführung der reversen Transkription wurde dieser Ansatz für 10 min bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60 min bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 min bei $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Um Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschließen, wurde diese Reaktion zusätzlich ohne die Zugabe von RNA durchgeführt. Schließlich wurden die drei cDNA-Reaktionen erneut zu einer Probe vereint, vorsichtig gemischt und in Aliquots á 20 μl bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.4.2 *Microarray* Genexpressionsanalyse

Die *Microarray* Analyse erlaubt eine umfassende quantitative Untersuchung der Genexpression. Hierfür wurde die aus Patientenmaterial und Zellen extrahierte RNA verwendet (Kapitel 3.2.4.1). Die *Microarray* Experimente wurden mit dem *GeneChip™ 3' IVT PLUS Reagent Kit* und den *GeneChip™ Human Genome U133 Plus 2.0 Array* gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. In zellbasierten Experimenten wurden drei biologische Replikate analysiert. Unter Verwendung der *Software Expression Console™* wurden die dabei ermittelten Rohdaten normalisiert. Diese Datensätze (*robust multi-array average* (RMA)-*signal*) sind in der *National Center for Biotechnology* (NCBI) *Gene Expression Omnibus* (GEO)-Datenbank verfügbar (GSE115458; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE115458>). Weitere Analysen erfolgten mit der *Transcriptome Analysis Console™ 3.0*. Ausschließlich Gene mit einem daraus resultierenden Faktor $< -1,5$ oder $> 1,5$ wurden zur folgenden Evaluierung mit der *Software IPA* verwendet.

3.2.4.3 qPCR

Bei der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*quantitative real-time polymerase chain reaction*, qPCR) werden spezifische Gene mit Hilfe fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden quantifiziert. Dies erfolgte mit der zuvor aus Patientengeweben und Zellen extrahierten RNA, welche danach zu cDNA transkribiert worden war (Kapitel 3.2.4.1). Die qPCR wurde gemäß der Mindestinformation für die Publikation von qPCR-Experimenten (*Minimum Information for Publication of qPCR Experiments*, MIQE)-Richtlinien durchgeführt [121]. Pro Kavität einer 384-Mikrotiterplatte wurden 5 ng cDNA eingesetzt. Dabei wurde die Konzentration der in Kapitel 3.2.4.1 gemessenen korrespondierenden RNA auf die cDNA übertragen. Zusätzlich zur cDNA wurden 6 μ l 2x qPCR Sonden-Mastermix, 0,1 μ M *forward Primer*, 0,1 μ M *reverse Primer*, 0,1 μ M der entsprechenden Sonde und die für ein Gesamtvolumen von 12 μ l entsprechende Menge ddH₂O beigefügt. Um mögliche Kontaminationen auszuschließen, wurden für alle verwendeten *Primer*-Paare ein Ansatz ohne cDNA als Kontrolle verwendet. Die Messung der technischen Triplikate erfolgte mit dem *LightCycler® 480* unter folgenden Bedingungen: Aktivierung der Taq Polymerase für 10 min bei 95 °C, gefolgt von 45 Zyklen mit jeweils einer Denaturierung für 10 s bei 95 °C, einer Hybridisierung für 30 s bei 60 °C sowie einer Elongation bei 72 °C. Unter Verwendung der *LightCycler® 480 Software release 1.5* und der *2nd derivative maximum* Methode wurde der Zyklus, bei dem der Schwellenwert (*threshold cycle*, C_t) für

unspezifische Fluoreszenzemission das erste Mal überschritten wurde, ermittelt. Triplikate mit einer Standardabweichung $> 0,3$ wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Die C_T -Werte des Zielgens wurden mit denen der beiden Referenzgene (Esterase D, ESD und 40S ribosomales protein S18, RPS18) normalisiert. Anschließend wurden Unterschiede in der Genexpression nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode errechnet [122]. Bei Experimenten basierend auf Zellkulturen wurden die Werte der behandelten oder siRNA-transfizierten Zellen in Bezug auf die Werte der Kontrollzellen betrachtet.

C_T -Werte von Patienten-cDNA wurden mit der *Software* GenEx 5 weiterverarbeitet. Hierbei wurde die PCR-Effizienz der *Primer* mitberücksichtigt. Zur Errechnung des Wertes ΔC_T wurde der Mittelwert der technischen Replikate gebildet und mit den Werten der Referenzgene normalisiert. Durch den anschließenden Vergleich von Tumorgewebe und tumorangrenzendem Normalgewebe ergab sich der normalisierte, relative $\Delta\Delta C_T$ -Wert. Dabei wurden Proben nicht berücksichtigt, wenn der mittlere C_T -Wert des Tumors und des Normalgewebes > 38 war. Wies allerdings entweder nur der Tumor oder das korrespondierende Normalgewebe einen mittleren C_T -Wert > 38 auf, wurde dieser Wert auf 38 gesetzt. Dadurch war die Einbeziehung dieser Proben in die statistische Analyse möglich.

Generell wurde vor Verwendung der *Primer* die jeweilige PCR-Effizienz untersucht. Dafür wurden die C_T -Werte von fünf Verdünnungen der cDNA (korrespondierend zu den RNA-Konzentrationen von 50 ng, 5 ng, 0,5 ng, 0,05 ng, 0,005 ng), welche aus der *Stratagene QPCR Human Reference Total RNA* transkribiert wurde, ermittelt. Danach wurde mit GenEx 5 die PCR-Effizienz errechnet. Es wurden ausschließlich *Primer* mit einer PCR-Effizienz zwischen 0,9 und 1,1 verwendet.

Die statistische Darstellung der qPCR-Ergebnisse erfolgte mittels der *Software GraphPad Prism 5*.

3.2.4.4 Ligation des Amplifikates der PCR-Effizienzbestimmung

Im Anschluss an die PCR-Effizienzbestimmung der *Primer* (Kapitel 3.2.4.3) wurde die korrekte Amplifizierung des entsprechenden Zielgens überprüft. Dafür wurde das Amplifikat der PCR-Effizienzbestimmung (5 ng Verdünnungen) mit dem *CloneJET PCR Cloning Kit* nach der Anleitung des Herstellers in einen *pJET 1.2 Cloning* Vektor kloniert.

3.2.4.5 Transformation chemokompetenter *E. coli* XL1-Blue Zellen

Die Transformation dient der Aufnahme fremder DNA in eine kompetente Bakterienzelle. Durch die Teilung der *E. coli* XL1-Blue Zellen wird die DNA vervielfältigt und kann anschließend zur weiteren Verwendung isoliert werden (Kapitel 3.2.4.6). Diese Methode wurde genutzt, um das zuvor erzeugte Ligationsprodukt zu amplifizieren (Kapitel 3.2.4.4). 50 µl der chemokompetenten XL1-Blue Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 0,85 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Nach der Zugabe des Ligationsansatzes wurde das Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert. Durch einen Hitzeschock bei 42 °C wurde die Membran der Bakterienzellen permeabilisiert und somit die Aufnahme der fremden DNA ermöglicht. Das anschließende Abkühlen für 1 min auf Eis hob diesen Zustand wieder auf. 1 ml SOC-Medium wurde zu dem Ansatz gegeben, gefolgt von der Inkubation in einem Thermoschüttler (KS-15 Control, Edmund Bühler, Bodelshausen) für 45 min bei 220 rpm und 37 °C. 100 µl dieser Bakteriensuspension wurden auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Danach erfolgte das Animpfen von 5 ml Ampicillin-haltigem SOC-Medium mit einzelnen Bakterienkolonien und die Inkubation in einem Thermoschüttler (KS-15 Control, Edmund Bühler, Bodelshausen) für 14 – 16 h bei 200 rpm und 37 °C.

3.2.4.6 DNA-Minipräparation

Die Minipräparation ermöglicht die Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienzellen (Kapitel 3.2.4.5). Entsprechend den Herstellerangaben des *NucleoSpin*[®] Plasmid Kits wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterien der zuvor angelegten Übernachtskultur isoliert. Anschließend erfolgte die weitere Analyse dieser DNA unter Verwendung der Methoden: Restriktionsverdau (Kapitel 3.2.4.7), Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.4.8) und Sequenzierung (Kapitel 3.2.4.9).

3.2.4.7 Restriktionsverdau

Beim Restriktionsverdau wurden Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Dadurch wurde die zuvor isolierte Plasmid-DNA (Kapitel 3.2.4.6) fragmentiert und nachfolgend analytisch in der Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt (Kapitel 3.2.4.8). Das verwendete Restriktionsenzym *Bgl* II sowie der entsprechende Puffer *NEBuffer*TM3.1 wurden von der Firma *New England BioLabs* bezogen und gemäß deren Angaben eingesetzt. Der

Restriktionsverdau erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl und wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert.

3.2.4.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA entsprechend ihrer molekularen Masse. Die zuvor durch den Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente (Kapitel 3.2.4.7) wurde mittels dieser Methode analysiert. Zur Herstellung eines Agarosegels (2 %) wurde Agarose in der entsprechenden Menge TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,1 ng/ml) versetzt. Anschließend wurde das Gel in eine horizontale Kammer gegossen. Die Auftrennung der zu analysierenden DNA-Proben, die zuvor durch Zugabe von 6x Ladepuffer vorbereitet worden war, erfolgte für circa 1 h bei 120 V. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid lagerte sich in die Nukleinsäure ein und ermöglichte dadurch eine Visualisierung der DNA unter UV-Licht.

3.2.4.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung dient der Bestimmung der genauen Nukleotidabfolge einer DNA-Sequenz. Auf diese Weise wurde die mittels Minipräparation isolierte Plasmid-DNA (Kapitel 3.2.4.6) untersucht. Durchgeführt wurde die Sequenzierung von der Firma Eurofins, Luxemburg (Luxemburg) und mittels der *Software* FinchTV und Blast ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Die *PAEP*/Glycodelin-Expression wird durch die Signalweginduktoren LPA, PMA, EGF, HB-EGF und TGF- β stimuliert

Um die Regulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression im Zellkultursystem zu untersuchen, wurden H1975- und 2106T-Zellen verwendet. In einer vorherigen Studie wurden bereits verschiedene ADC- und SQCC-Zelllinien der Lunge bezüglich ihrer Glycodelin-Expression analysiert. Unter diesen histologischen Subtypen waren H1975 und 2106T die einzigen Zelllinien, welche Glycodelin nachweisbar sezernierten [71]. H1975-Zellen sind Träger mehrerer aktivierender Mutationen, die sowohl *EGFR* (T790M, L858R) als auch *PIK3CA* (G118D) betreffen. Dagegen wurden in 2106T-Zellen keine *EGFR*-Mutationen detektiert [115]. Hinsichtlich der untersuchten Signalwege liegen jedoch *PIK3CB*-Mutationen (G3151A, G1224T oder G1504A) vor.

In diesen beiden Zelllinien wurde zunächst der Einfluss von Hormonen und Signalweginduktoren auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression adressiert. In einer vorhergehenden Studie wurde eine PMA-induzierte *PAEP*-Expression nach 6 h ausgelöst und erreichte nach 24 h ein Plateau, das bis 72 h konstant anhielt [105]. Mit diesem Hintergrund wurde hier in initialen Western Blot-Untersuchungen ein geeigneter Zeitpunkt zur Detektion der Glycodelin-Expression in H1975- und 2106T-Zellen bestimmt. Dafür wurden die Zellen für verschiedene Zeitintervalle (4 h – 24 h) exemplarisch mit PMA und der Kontrolle behandelt. Als Kontrolle diente wie auch in folgenden Experimenten die Lösung, in welcher die entsprechende Substanz aufgenommen wurde (siehe Tabelle 3.4 und Tabelle 3.5) oder ddH₂O. Generell erstreckte sich das Bandenmuster von Glycodelin zwischen 23 kDa und 30 kDa, wobei es sich in beiden Zelllinien unterschied (Abbildung 4.1). Je nach Belichtungszeit wurden in H1975-Zellen 2 – 3 Banden detektiert, die allerdings in einem größeren Abstand zueinander lagen als in 2106T-Zellen. Diese zeigten die verschiedenen Glycosylierungsmuster von Glycodelin und weisen damit auf Unterschiede in der posttranslationalen Modifikation zwischen H1975- und 2106T-Zellen hin. Im Vergleich zur Kontrollbehandlung wurde eine Induktion der Glycodelin-Expression durch PMA im Western Blot nach 4 h nachgewiesen (Abbildung 4.1). Danach reicherte sich das Protein bis zum letzten gemessenen Zeitpunkt von 24 h kontinuierlich an. Dies ist auf die Stabilität von Glycodelin innerhalb der Zelle, aber auch auf die durch den Serumentzug der Zellen

gehemmte Sekretion zurückzuführen. Aufgrund der allgemein eher geringen intrazellulären Mengen wurde die *PAEP*/Glycodelin-Expression in den folgenden Untersuchungen repräsentativ nach 24 h bestimmt. Die hohe Menge an Gesamtprotein, die geladen werden musste, um Glycodelin im Western Blot detektieren zu können, bedingte oftmals eine Überbelichtung von β -Aktin.

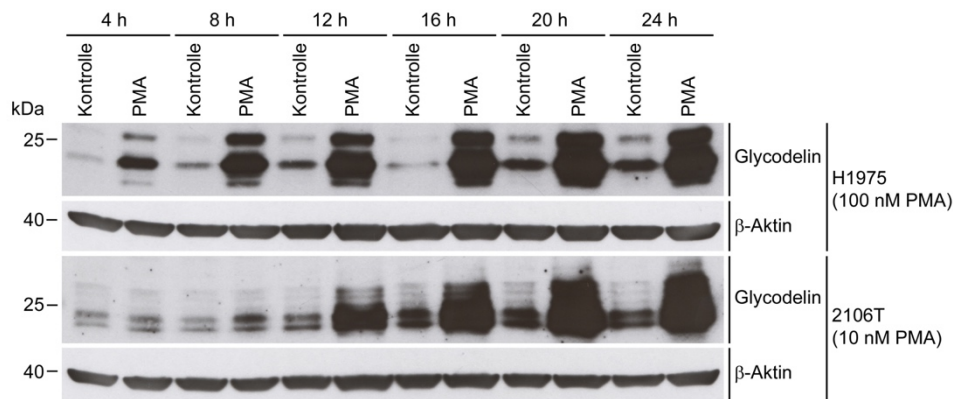


Abbildung 4.1: Zeitabhängige Induktion der Glycodelin-Expression durch PMA

H1975- und 2106T-Zellen wurden mit den angegebenen PMA-Konzentrationen im 4-stündigen Intervall zwischen 4 h und 24 h behandelt. Es folgte eine immunologische Detektion von Glycodelin sowie β -Aktin, welches als Ladekontrolle diente.

Ein Einfluss der Hormone Progesteron und Relaxin auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression in H1975- und 2106T-Zellen wurde bereits in vorherigen Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe ausgeschlossen. Ergänzend dazu erfolgte die Behandlung dieser beiden Zelllinien mit hCG und einer Kontrolle für 24 h. Anschließend wurde die *PAEP*-Expression mittels qPCR bestimmt sowie Glycodelin auf Proteinebene im Western Blot detektiert. Verglichen mit der Kontrollbehandlung wurde eine tendenziell gesteigerte *PAEP*/Glycodelin-Expression ausschließlich durch die Behandlung mit hohen hCG-Konzentrationen ausgelöst (2,14-fach (H1975); 1,7-fach (2106T) erhöhte Genexpression) (Abbildung 4.2 a – b). In diesen Proben änderte sich allerdings die Zellmorphologie und die Anordnung im Zellverband sehr stark (Abbildung 4.2 c). Daher wurde keines dieser drei Hormone für weitere Analysen herangezogen.

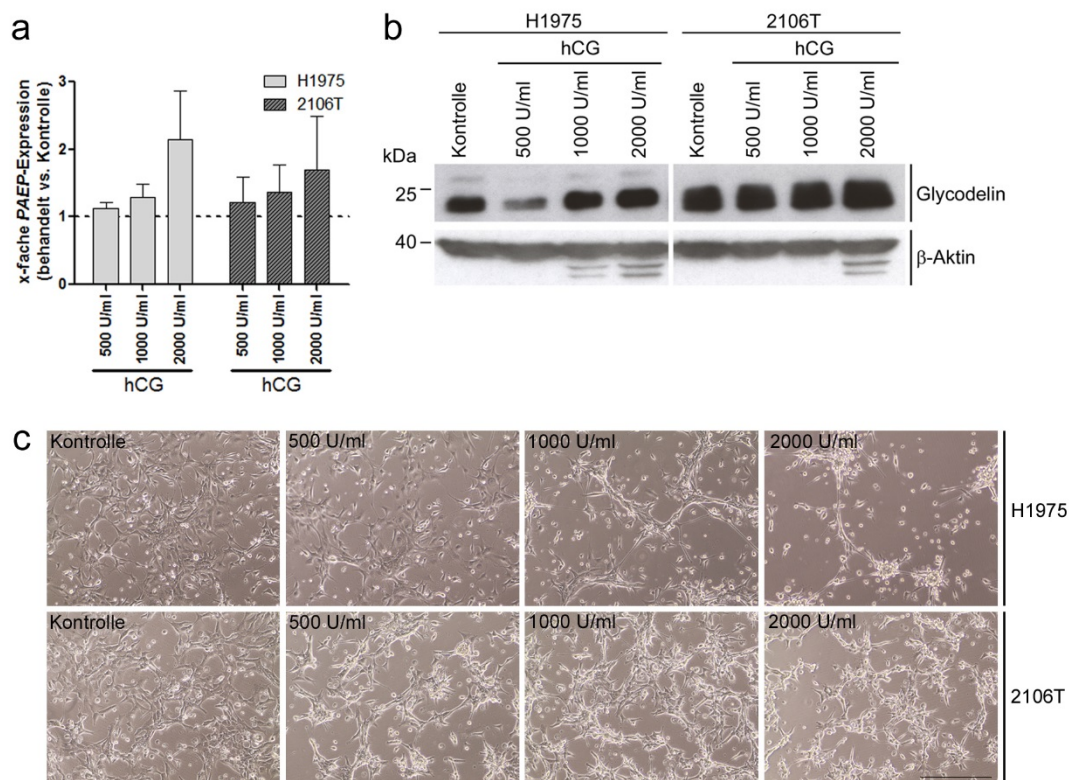


Abbildung 4.2: Hohe hCG-Konzentrationen stimulieren die PAEP/Glycodelin-Expression und führen zu einer veränderten Struktur des Zellverbandes

Die Zelllinien H1975 und 2106T wurden für 24 h mit verschiedenen hCG-Konzentrationen behandelt. **(a)** Die PAEP-Expression wurde mittels qPCR bestimmt. Die gestrichelte Linie bei 1 entspricht der Expression in den kontrollbehandelten Zellen ($n = 3$; Mittelwerte der normalisierten, relativen C_t -Werte und mittlere SD sind dargestellt). Der P -Wert wurde in Bezug auf die Kontrolle über einen zweiseitigen, gepaarten t-Test ermittelt und ist hier als nicht signifikant bewertet. **(b)** Glycodelin sowie β -Aktin, das als Ladekontrolle diente, wurden immunologisch detektiert. **(c)** Mikroskopische Darstellung der behandelten Zellen. Maßstabsbalken: 400 μ m.

Im nächsten Schritt wurde zusätzlich zu den Signalweginduktoren LPA und PMA auch der Einfluss von EGF und HB-EGF auf die PAEP/Glycodelin-Expression untersucht. Beide sind Liganden des EGFR, dessen aktivierende Mutationen in einigen Fällen entscheidend zur Entstehung von NSCLC beiträgt [22]. H1975- und 2106T-Zellen wurden mit jeweils ansteigenden Konzentrationen LPA, PMA, EGF, HB-EGF sowie den jeweiligen Kontrollen für 24 h behandelt. Im Vergleich zur Kontrolle wurde eine deutlich erhöhte PAEP/Glycodelin-Expression in H1975-Zellen ausschließlich durch PMA induziert (5,88-fach erhöhte Genexpression, signifikant), während dieser Einfluss in 2106T-Zellen für alle Signalweginduktoren (PMA, EGF sowie HB-EGF) signifikant in der qPCR- und in der Western Blot-Analysen gezeigt wurde (12,15-fach; 3,07-fach bzw. 2,4-fach erhöhte Genexpression) (Abbildung 4.3). Hierbei war die gesteigerte PAEP-Expression durch LPA statistisch nicht signifikant, allerdings ließ die 2,05-fache Erhöhung einen Trend erkennen (Abbildung 4.3 a). Induktoren, welche die PAEP/Glycodelin-Expression deutlich

stimulierten, wurden in ihren potentesten Konzentrationen (schwarze Pfeile; H1975: 100 nM; 2106T: 100 μ M LPA; 10 nM PMA; 50 ng/ml EGF; 100 ng/ml HB-EGF) für weitere Analysen eingesetzt (Abbildung 4.3 a).

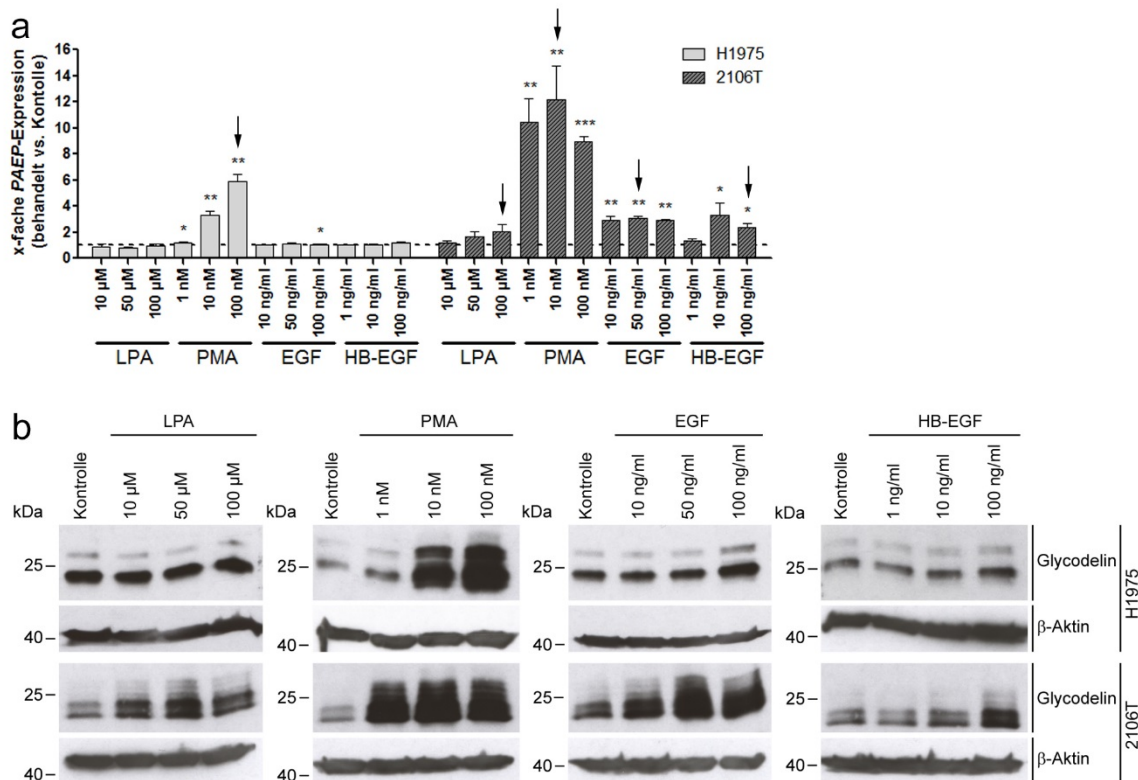


Abbildung 4.3: Die Signalweginduktoren LPA, PMA, EGF und HB-EGF induzieren die PAEP/Glycodelin-Expression

H1975- und 2106T-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen LPA, PMA, EGF, HB-EGF für 24 h behandelt. **(a)** In der qPCR wurde die PAEP-Expression ermittelt. Die gestrichelte Linie bei 1 entspricht der Expression in den kontrollbehandelten Zellen ($n = 3$; Mittelwerte der normalisierten, relativen C_T -Werte und mittlere SD sind dargestellt). Der P -Wert wurde in Bezug auf die Kontrolle über einen zweiseitigen, gepaarten t -Test bestimmt und ist wie folgt definiert: $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$. Die Experimente wurden von Dr. Marc A. Schneider durchgeführt. **(b)** Im Western Blot wurden Glycodelin und β -Aktin (Ladekontrolle) detektiert.

Im nächsten Schritt wurden diese potenten Signalweginduktoren (Abbildung 4.3; schwarze Pfeile) verwendet, um in *Microarray* Genexpressionsanalysen weitere Erkenntnisse über die Beteiligung möglicher Signalwege an der Regulation der PAEP/Glycodelin-Expression zu erlangen. Dafür wurde die RNA der Zellen, die nach den entsprechenden Behandlungen eine erhöhte PAEP-Expression vorwiesen, eingesetzt. Die Datensätze der *Microarray* Genexpressionsanalysen sind in der NCBI GEO-Datenbank verfügbar (GSE115458; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE115458>). Die aufgrund der Behandlung differentiell exprimierte Gene mit einem Faktor $< -1,5$ oder $> 1,5$ (Tabelle 4.1)

wurden mit Hilfe der *Software IPA (upstream regulator analysis)* untersucht. Diese Analyse diente zur Identifizierung vorgeschalteter Regulatoren, wie Signalweginduktoren oder intrazellulären Signalwegen (siehe Kapitel 3.1). Zum einen konnte hierbei die Aktivierung von *PAEP* durch die vorgeschalteten Regulatoren EGFR (Rezeptor für EGF und HB-EGF), LPA und PMA bestätigt werden (fett gedruckt in Tabelle 4.2). Darüber hinaus wurden aber ebenso einige weitere potentielle Regulatoren identifiziert, wovon ERK1/2, JUN, MEK, NFκB1 (NFκB Komplex), PKC (PRKCD; Isoform der PKC), RAF1 und TGF-β1 für folgende Analysen herangezogen wurden (fett gedruckt in Tabelle 4.2). Die Aktivierung von ERK1/2 sowie MEK wurde durch die Hemmung deren entsprechender Inhibitoren U0126 (ERK1/2-Inhibitor) und PD98059 (MEK1/2-Inhibitor) bekräftigt. Diese jeweiligen Regulatoren wurden ausgewählt, da sie zuvor mit *PAEP*/Glycodelin-Expression regulierenden Signalwegen assoziiert wurden oder ein Einfluss auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression bereits postuliert wurde. LPA und PMA sind PKC-Aktivatoren [107, 108], wodurch sich in diesem Kontext eine Beteiligung der PKC an der Regulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression erwarten lässt. In Folge der PKC-Aktivität werden einige Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise NFκB und JUNB, stimuliert [123, 124]. Weiterhin wurde eine Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges, welcher auch RAF beinhaltet, nach der Phosphorylierung des EGFR gezeigt [125]. Die Induktion der MEK/ERK-Signalkaskade durch TGF-β ist ebenso bekannt wie die Stimulation des Transkriptionsfaktors JUNB [124, 126, 127]. Darüber hinaus wurde bereits eine Reprimierung von Phytoestrogen-induziertem Glycodelin in Folge der Inhibierung von MEK1/2 beschrieben [109]. Zusätzlich zu diesen Interaktionen sind alle dieser Kandidaten bekannte Regulatoren in der Entstehung und Progression verschiedener Krebserkrankungen.

Tabelle 4.1: Informationen zu differentiell exprimierten Genen (Faktor < -1,5 oder > 1,5) nach der Behandlung mit LPA, PMA, EGF und HB-EGF

↓ = runterregulierte Gene und ↑ = hochregulierte Gene

Analyse	Replikate	Anzahl der Gene mit Faktor < -1,5 oder > 1,5	Bereich des Faktors
H1975 – PMA	3	2894 (1788 ↓; 1106 ↑)	-18,97 – 180,93
2106T – LPA	3	525 (197 ↓; 328 ↑)	-11,33 – 5,09
2106T – PMA	3	1807 (719 ↓; 1088 ↑)	-27,03 – 801,03
2106T – EGF	3	319 (168 ↓; 151 ↑)	-7,72 – 6,57
2106T – HB-EGF	3	137 (83 ↓; 54 ↑)	-2,53 – 2,66

Tabelle 4.2: Ingenuity Pathway Analysis (IPA) vorgeschalteter Regulatoren, die eine erhöhte PAEP/Glycodelin-Expression in NSCLC-Zellen beeinflussen

Dargestellt sind die mittels der Software IPA generierten *activation z-scores* (signifikant bei > 2 oder < -2) der signifikantesten vorgeschalteten Regulatoren. Der Farbverlauf von gelb (hoch) bis blau (niedrig) gibt die Höhe der Werte wieder.

vorgeschaltete Regulatoren	H1975		2106T		
	PMA	LPA	PMA	EGF	HB-EGF
5-O-mycyl-beta-araf-(1->2)-5-O-mycyl-alpha-araf-(1->1')-glycerol	4,94	2,49	2,87	2,52	0,90
Ap1	4,04	1,99	2,93	2,72	1,67
Cg	1,89	2,26	4,25	3,46	1,52
EGFR	1,27	2,37	3,75	4,74	2,15
ERK1/2	2,85	3,14	4,27	3,22	1,91
F2	3,21	4,78	5,27	4,11	2,26
FOXL2	2,62	2,23	3,76	3,14	1,85
IFNG	7,45	2,09	-0,50	3,92	0,88
IL1	5,11	3,71	3,47	2,62	1,60
IL17A	4,18	2,01	3,64	2,90	0,95
IL18	4,11	3,18	2,68	2,47	1,93
IL1A	6,55	4,10	3,76	3,78	1,72
IL1B	8,05	4,62	5,10	4,25	2,23
IL1RN	-6,23	-2,52	0,04	-3,09	-2,24
IRF7	5,49	-1,01	-4,81	2,41	N/A
JUN	2,66	2,83	3,46	2,64	2,05
LPA	1,98	3,94	1,92	3,47	2,55
Mek	1,09	3,34	4,54	2,49	2,42
MYD88	4,90	2,78	2,81	2,47	0,86
NFKB (Komplex)	5,67	3,90	4,39	3,51	0,76
NFKB1	2,97	2,09	2,56	3,04	2,71
NUPR1	9,99	1,33	5,93	2,83	2,11
PD98059	-3,58	-2,75	-5,28	-4,33	-1,55
PDGF BB	3,84	2,35	3,98	2,78	1,42
PMA	6,24	3,82	6,02	3,71	1,74
poly rI:rC-RNA	6,88	2,23	0,87	3,64	1,42
PPRC1	4,52	2,40	3,60	2,40	2,20
PRKCD	4,59	3,31	4,40	3,08	2,06
RAF1	2,57	3,32	4,57	3,14	2,20
Reaktive Sauerstoffspezies	2,51	2,47	3,06	3,09	2,39
RELA	4,72	3,52	4,40	2,68	2,32
SMARCA4	4,47	3,15	3,23	2,83	2,31
TGFB1	1,98	4,81	5,20	4,58	2,55
Tlr	4,17	2,59	2,86	2,61	1,59
TLR4	4,91	2,96	2,28	2,80	1,44
TLR7	5,48	2,56	1,05	2,69	1,89
TNF	10,15	4,99	6,04	3,67	2,25
Tnf (Familie)	3,22	3,93	2,74	2,69	1,95
TREM1	3,25	3,01	5,76	3,06	3,84
U0126	-3,67	-2,33	-4,00	-3,91	-2,11

Des Weiteren wurden dieselben Genexpressionsdaten für eine IPA-Analyse der *diseases and bio functions* verwendet. Diese Analyse veranschaulichte Einflüsse bestimmter biologischer Funktionen in Zellen mit einer erhöhten *PAEP*-Expression (siehe Kapitel 3.1) und wird im Anhang dargestellt sowie erläutert (siehe Anhang Tabelle 7.1).

TGF- β ist ein weiterer möglicher Signalweginduktor und wurde deshalb bezüglich des Einflusses auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression konsekutiv in diesem Kapitel analysiert. Nachgeschaltete intrazelluläre Signalwege werden in Kapitel 4.2 untersucht. Die Behandlung mit verschiedenen TGF- β 1, -2 und -3-Konzentrationen für 24 h führte ausschließlich in 2106T-Zellen zu einem dosisabhängigen Anstieg der *PAEP*/Glycodelin-Expression in der qPCR- und der Western Blot-Analyse (Abbildung 4.4). In den höchsten Konzentrationen (5 ng/ml) waren die Effekte aller Isoformen auf die *PAEP*-Expression signifikant, wobei TGF- β 1 und -2 den stärksten Einfluss hatten (4,44-fach bzw. 2,93-fach; $p = 0,0037$ bzw. $p = 0,0429$) (Abbildung 4.4 a). Aufgrund dessen wurden diese beiden Isoformen in nachfolgenden Untersuchungen verwendet. Die Behandlung von H1975-Zellen veränderte die *PAEP*/Glycodelin-Expression nur geringfügig und wurde im Folgenden nicht weiter analysiert (Abbildung 4.4).

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass Signalweginduktoren wie PMA in beiden Zelllinien sowie LPA, EGF, HB-EGF und TGF- β in 2106T-Zellen die *PAEP*/Glycodelin-Expression stimulierten. Im Hinblick auf diese Induktoren deuteten sie zusätzlich eine nachfolgende Beteiligung von ERK1/2, JUN, MEK, NF κ B1, PKC und RAF1 an.

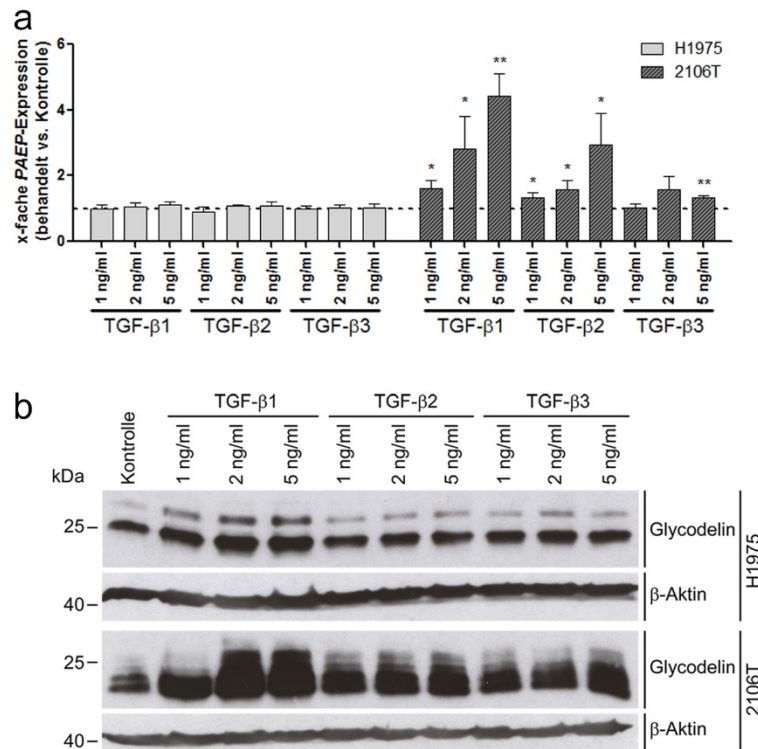


Abbildung 4.4: TGF-β ist ein Induktor der PAEP/Glycodelin-Expression

H1975- und 2106T-Zellen wurden für 24 h mit TGF-β1, -2 und -3 behandelt. **(a)** Die PAEP-Expression wurde mittels qPCR untersucht. Die gestrichelte Linie bei 1 entspricht der Expression in den kontrollbehandelten Zellen ($n = 3$; Mittelwerte der normalisierten, relativen C_T -Werte und mittlere SD sind dargestellt). Der P -Wert wurde in Bezug auf die Kontrolle über einen zweiseitigen, gepaarten t-Test bestimmt und ist wie folgt definiert: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. **(b)** Glycodelin und die Ladekontrolle β-Aktin wurden immunologisch detektiert.

4.2 Intrazelluläre Signalwege unter Beteiligung von PKC, AKT und RAF/MEK beeinflussen die PAEP/Glycodelin-Expression

Sowohl die untersuchten Signalweginduktoren als auch die IPA-Analysen der *Microarray* Genexpressionsdaten gaben Hinweise auf einige nachgeschaltete Signalwege, die bei der PAEP/Glycodelin-Expression eine Rolle spielen könnten. Die Beteiligung dieser wurde in folgenden Experimenten näher analysiert (Abbildung 4.5).

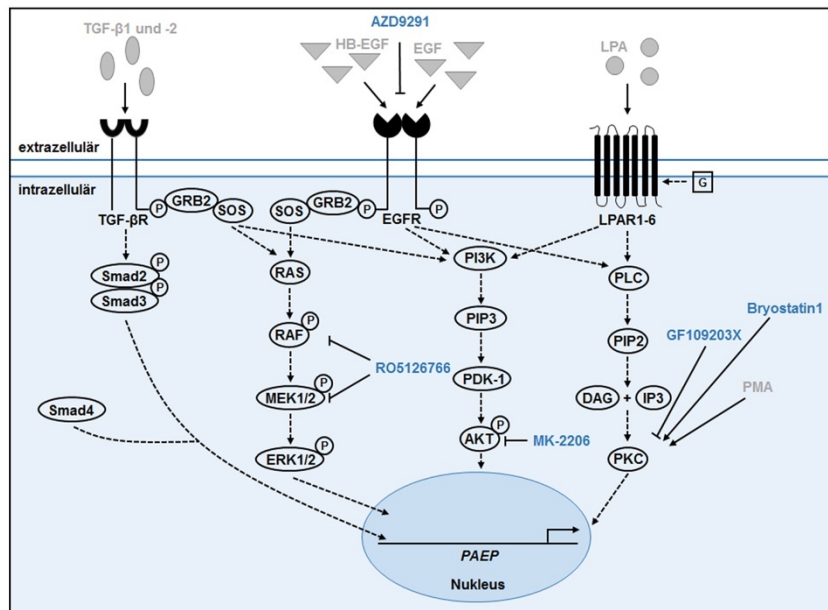


Abbildung 4.5: Übersicht über untersuchte Regulatoren der *PAEP*/Glycodelin-Expression und die im Folgenden adressierten Signalwege

Bereits untersuchte Signalweginduktoren (grau), welche die *PAEP*/Glycodelin-Expression stimulierten, sowie in diesem Kapitel analysierte Signalwegmodulatoren (blau) sind schematisch dargestellt. Untersuchte Einflüsse sind mit durchgehenden Linien abgebildet, während gestrichelte Linien auf Literaturdaten zurückgehen.

Wie bereits erwähnt deuteten die bekannten PKC-Stimulatoren LPA und PMA [107, 108] einen Einfluss dieser Kinase auf die Regulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression an. Ebenso lässt sich aus den *Microarray* Genexpressionsanalysen, die im Rahmen dieser Arbeit in Zellen mit erhöhter *PAEP*-Expression durchgeführt worden sind, eine Beteiligung der PKC folgern (siehe Tabelle 4.2). Aufgrund dessen wurden Bryostatin1 zur Aktivierung und GF109203X zur Inhibierung der PKC eingesetzt. Bryostatin1 stimuliert die PKC durch die kompetitive Bindung an ihre DAG-Bindestelle. Dabei werden insbesondere die Isoformen PKC α , PKC δ und PKC ϵ aktiviert [116]. GF109203X ist ein Inhibitor der PKC [118] und hemmt selektiv PKC α , PKC β I, PKC β II und PKC γ . Damit wurde ein repräsentativer Teil der Isoformen klassischer und neuer PKCs abgedeckt. Die Behandlung von H1975- und 2106T-Zellen mit verschiedenen Bryostatin1-Konzentrationen erfolgte für nur 1 h. In der Literatur wurde gezeigt, dass eine kurze Inkubationszeit die PKC induziert, wohingegen eine verlängerte Aufnahmedauer zu einer Hemmung dieser Kinase führt [117]. Alle anderen Inhibitoren wurden für 24 h appliziert. Im Vergleich zur Kontrolle führte die Bryostatin1-Behandlung signifikant auf RNA-Ebene (2,19-fach; $p = 0,0052$ (H1975); 3,88-fach; $p = 0,0407$ (2106T)) sowie auf Proteinebene zu einer erhöhten *PAEP*/Glycodelin-Expression in beiden Zelllinien (Abbildung 4.6 a und b). Dabei reagierten 2106T-Zellen bereits auf geringere Konzentrationen des PKC-Aktivators. GF109203X hatte in

H1975- sowie in 2106T-Zellen in niedrigeren Konzentrationen (1 μM und 5 μM) einen leicht induzierenden bzw. keinen Effekt, hemmte aber in der höchsten Konzentration die *PAEP*/Glycodelin-Expression deutlich (2,08-fach (H1975); 2-fach (2106T) reprimierte Genexpression) (Abbildung 4.6 c und d). Die Hemmung der *PAEP*-Expression war ausschließlich in H1975-Zellen signifikant ($p = 0,0057$), allerdings zeigten die Ergebnisse in 2106T-Zellen ebenfalls eine reprimierende Tendenz. Daraus geht hervor, dass die PKC die Expression von *PAEP*/Glycodelin stimuliert (Abbildung 4.6 a – d).

Darauffolgend wurde der PI3K/AKT-Signalweg adressiert, da LPA, EGF/HB-EGF und TGF- β in der Literatur als entsprechende Stimulatoren beschrieben wurden [127-129]. Durch die Verwendung von MK-2206 wurde AKT1/2 selektiv gehemmt. Dieser allosterische Inhibitor unterstützt die inaktive Konformation dieser Kinase und verhindert dadurch die Membranlokalisation sowie die Aktivierung von AKT. In H1975-Zellen stimulierte MK-2206 durch die Hemmung von AKT [130] sowohl die *PAEP*-Expression signifikant (9-fach erhöhte Genexpression; $p = 0,0068$) als auch die Glycodelin-Expression stark (Abbildung 4.6 e und f). Im Gegensatz dazu blieben 2106T-Zellen diesbezüglich unbeeinflusst von dem Inhibitor.

Ähnlich wie bei dem PI3K/AKT-Signalweg wurde auch die Induktion der MEK/ERK-Signalkaskade in Folge einer EGFR-, TGF- β - sowie zusätzlich nach einer PKC-Stimulation bereits gezeigt [125, 127, 131]. Zudem identifizierten hier durchgeführte *Microarray* Genexpressionsanalysen einige Moleküle des MEK/ERK-Signalweges als vorgeschaltete Regulatoren der *PAEP*/Glycodelin-Expression (siehe Tabelle 4.2). In einer vorherigen Studie wurde ebenfalls bereits ein Zusammenhang zwischen der Inhibition von MEK1/2 und der Reduktion von Phytoestrogen-induziertem Glycodelin gezeigt [109]. Somit wurde auch dieser Signalweg hinsichtlich seines regulatorischen Einflusses auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression untersucht. Der dafür verwendete Inhibitor RO5126766 bindet an MEK und bewirkt dessen Konformationsänderung. Dies verhindert die von RAF ausgehende Phosphorylierung, der MEK/RAF-Komplex wird stabilisiert und schließlich die RAF-Kinase in ihrer Aktivität gehemmt [119]. Eine solche Hemmung [132] führte in beiden Zelllinien zu einer leicht verminderten *PAEP*/Glycodelin-Expression (Abbildung 4.6 g und h). Dabei waren die Unterschiede zur Kontrollbehandlung in der qPCR-Analyse statistisch signifikant (1,41-fach (H1975); 1,43-fach (2106T) reprimierte Genexpression).

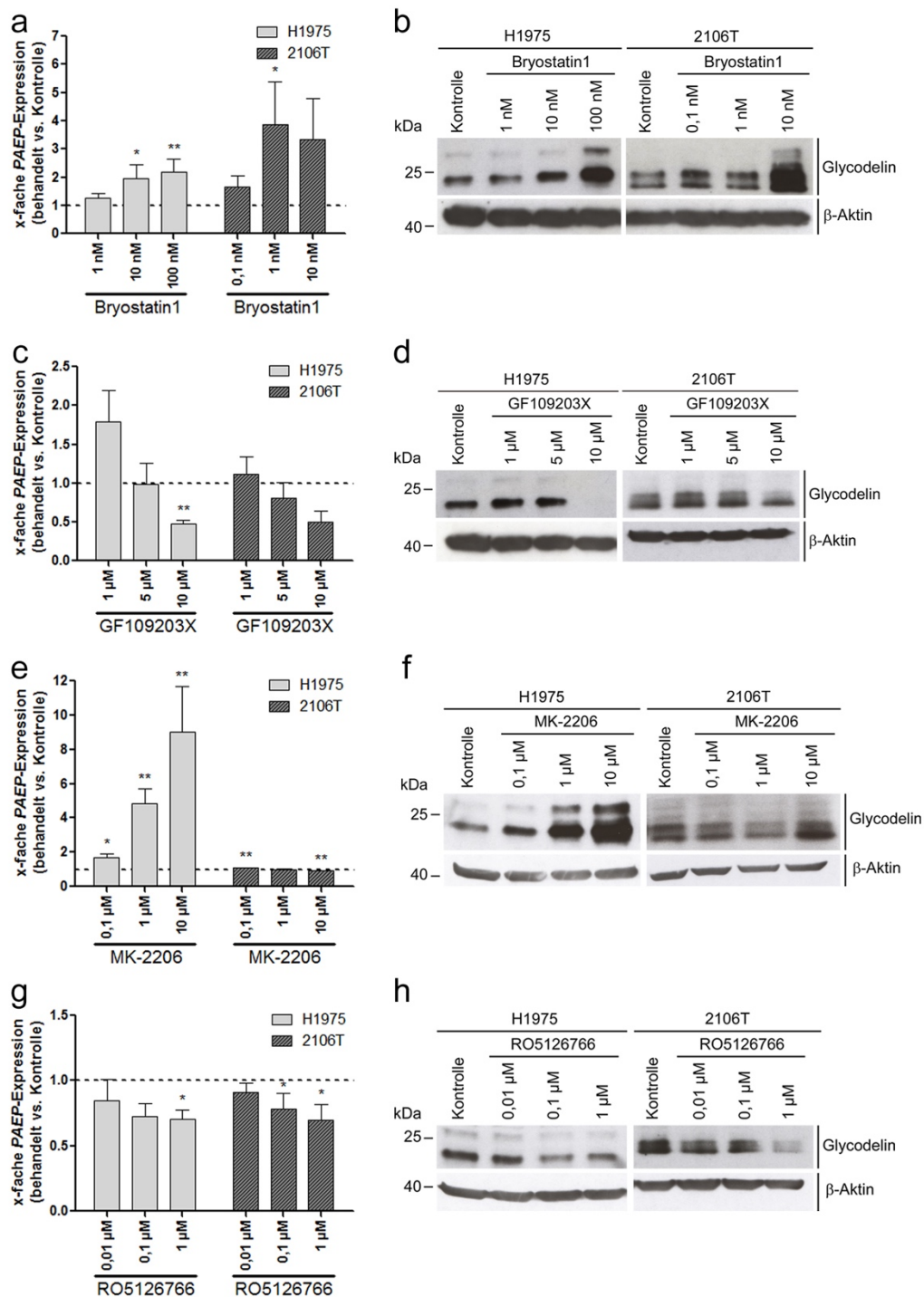


Abbildung 4.6: Die PAEP/Glycodelin-Expression wird durch die Inhibierung von PKC, AKT und RAF/MEK beeinflusst

Die Zelllinien H1975- sowie 2106T-Zellen wurden mit Bryostatin1 (PKC-Aktivator) (1 h), GF109203X (PKC-Inhibitor) (24 h), MK-2206 (AKT-Inhibitor) (24 h) oder RO5126766 (RAF/MEK-Inhibitor) (24 h) behandelt. **(a, c, e und g)** Mittels qPCR wurde die PAEP-Expression bestimmt. Die gestrichelte Linie bei 1 entspricht der Expression in den kontrollbehandelten Zellen ($n = 3$; Mittelwerte der normalisierten, relativen C_t -Werte und mittlere SD sind dargestellt). Der P -Wert wurde in Bezug auf die Kontrolle über einen zweiseitigen, gepaarten t -Test bestimmt und ist wie folgt definiert: $*P < 0,05$; $**P < 0,01$. **(b, d, f und h)** Im Western Blot wurden Glycodelin sowie β -Aktin als Ladekontrolle detektiert.

H1975-Zellen sind Träger aktivierender *EGFR*- (T790M, L858R) und *PIK3CA*-Mutationen (G118D), die bereits mit der Aktivierung von AKT assoziiert wurden [125, 133-136]. In 2106T-Zellen sind bezüglich des PI3K/AKT-Signalweges Mutationen innerhalb des Gens *PIK3CB* (G3151A und G1224T oder G1504A, in verschiedenen Transkriptvarianten) bekannt. Die Mutation G3151A wurde in einer vorherigen Studie in Zusammenhang mit einer verstärkten Aktivität von AKT gestellt [137], wohingegen für G1224T und G1504A keine Daten vorliegen. Da der AKT-Inhibitor MK-2206 in H1975-Zellen zu einer reduzierten *PAEP*/Glycodelin-Expression führte, jedoch in 2106T-Zellen keinen Einfluss zeigte, wurde die Aktivität von AKT in den unbehandelten Zellen untersucht. Hierfür wurde die phosphorylierte Form von AKT im Western Blot detektiert und diese im Kontext mit dem Gesamtprotein betrachtet. Im Vergleich zu 2106T-Zellen wurde in H1975-Zellen eine vermehrte Phosphorylierung von AKT nachgewiesen (Abbildung 4.7).

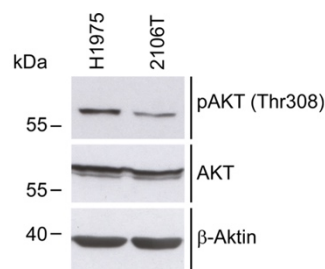


Abbildung 4.7: AKT ist in H1975-Zellen stärker aktiviert als in 2106T-Zellen

Phosphoryliertes AKT, AKT und β -Aktin (Ladekontrolle) wurden in unbehandelten H1975- und 2106T-Zellen nachgewiesen.

Eine konstitutive Aktivität des EGFR infolge von Mutationen stimuliert nicht nur den PI3K/AKT-Signalweg verstärkt, sondern auch die MEK/ERK-Signalkaskade [138, 139]. In H1975-Zellen bedingt die T790M-Mutation zusätzlich eine Resistenz gegen TKIs. Für Patienten mit einer T790M-Mutation wurden alternativ irreversible EGFR-TKIs wie beispielsweise AZD9291, auch bekannt als Osimertinib, entwickelt [120]. Die Auswirkungen einer AZD9291-Behandlung auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression wurden deshalb in H1975-Zellen untersucht. Auf RNA-Ebene (qPCR) zeigten sich keine Unterschiede zwischen kontroll- und medikamentenbehandelten Zellen, allerdings waren die nachgewiesenen Proteinmengen (Western Blot-Analyse) in Folge der AZD9291-Behandlung deutlich geringer (Abbildung 4.8 a und b). Mit einer gesteigerten Inhibierung nahm auch die detektierte Menge β -Aktin ab. Um den Unterschied zwischen RNA- und Proteinexpression zu untersuchen, wurden die Zellen 1 h vor der Zugabe von AZD9291 mit dem 26S-Proteasominhibitor Bortezomib behandelt und eine Western Blot-Analyse

durchgeführt. Möglicherweise könnte AZD9291 den verstärkten Abbau von Glycodelin durch das Proteasom begünstigen. Sehr hohe Bortezomibkonzentrationen führten zu einer minimierten Glycodelin- und β -Aktin-Expression, weshalb für die kombinierte Behandlung die Konzentration 10 nM gewählt wurde (Abbildung 4.8 c). Die Zugabe von Bortezomib änderte allerdings nichts an der reduzierten Glycodelin-Expression infolge der AZD9291-Behandlung (Abbildung 4.8 d). Eine erhöhte Sekretion von Glycodelin wurde ebenfalls nicht detektiert (siehe Anhang Abbildung 7.1). Die gleichzeitige Reduktion von Glycodelin sowie β -Aktin lässt sich somit vermutlich auf eine verringerte Vitalität der Zellen sowie das Sterben von Zellen in Folge der AZD-9291-Behandlung zurückführen. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

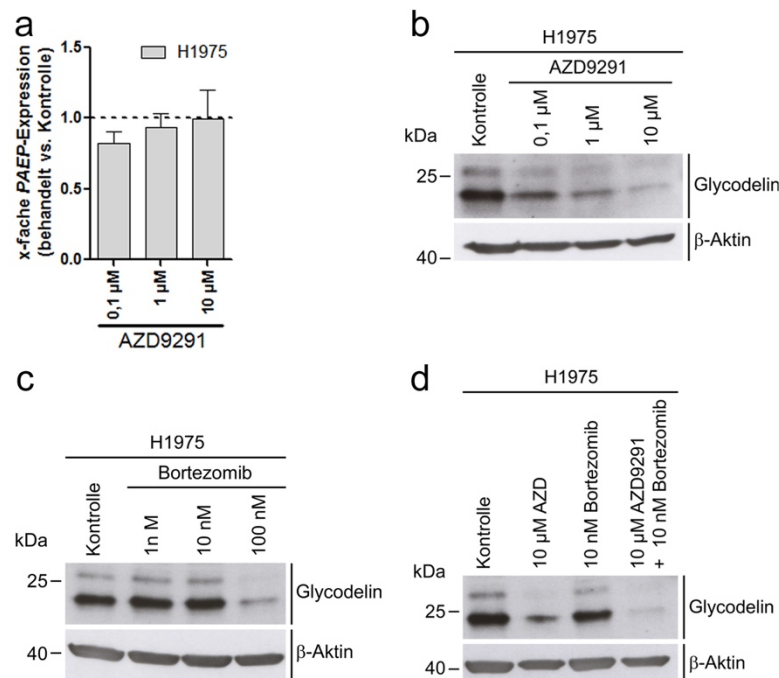


Abbildung 4.8: Der EGFR-TKI vermindert die Glycodelin-Expression ausschließlich auf Proteinebene

Die Behandlung der H1975-Zellen erfolgte mit AZD9291 (Osimertinib, EGFR-TKI) oder Bortezomib für 24 h. Zur kombinierten Behandlung schloss sich der Bortezomib-Inkubation für 1 h die AZD9291-Zugabe für 24 h an. **(a)** qPCR-Bestimmung der *PAEP*-Expression. Die gestrichelte Linie bei 1 entspricht der Expression in den kontrollbehandelten Zellen ($n = 3$; Mittelwerte der normalisierten, relativen C_t -Werte und mittlere SD sind dargestellt). Der *P*-Wert wurde in Bezug auf die Kontrolle über einen zweiseitigen, gepaarten *t*-Test bestimmt und ist hier als nicht signifikant bewertet. **(b – d)** Die Detektion von Glycodelin und der Ladekontrolle β -Aktin erfolgte im Western Blot.

Diese Experimente zeigten durch die Inhibierung bestimmter Signalwegmoleküle deren regulatorische Wirkung auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression. Während die PKC- und die RAF/MEK-Signalkaskade in beiden Zelllinien einen stimulatorischen Effekt hatten, wurde

der PI3K/AKT-Signalweg in H1975-Zellen mit einer reprimierten *PAEP*/Glycodelin-Expression assoziiert. Tabelle 4.3 zeigt die wichtigsten Ergebnisse der letzten beiden Kapitel in der Übersicht (siehe Kapitel 4.1 – 4.2).

Tabelle 4.3: Zusammenfassende Darstellung der bisherigen Ergebnisse

↑ = induzierender Effekt, ↓ = reprimierender Effekt und → = kein Effekt

Regulator	Einfluss auf Glycodelin		Methode
	H1975	2106T	
hCG	↑	↑	qPCR und WB
LPA	→	↑	qPCR und WB
PMA	↑	↑	qPCR und WB
EGF	→	↑	qPCR und WB
HB-EGF	→	↑	qPCR und WB
TGF-β1, -2, -3	→	↑	qPCR und WB
PKC	↑	↑	qPCR und WB Bryostatin1 (Aktivator), GF109203X (Inhibitor)
AKT	↓	→	qPCR und WB MK-2206 (Inhibitor)
RAF/MEK	↑	↑	qPCR und WB RO5126766 (Inhibitor)
EGFR	→	nicht getestet	qPCR und WB AZD9291 (Inhibitor)

4.3 Die Induktion der *PAEP*/Glycodelin-Expression durch die Transkriptionsfaktoren JUNB, NF κ B1 und STAT3

Die vorherigen Untersuchungen zeigten die Wirkung einiger Signalweginduktoren sowie nachgeschalteter Signalwege auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression (siehe Tabelle 4.3). Im nächsten Schritt wurden die regulatorischen Einflüsse von Transkriptionsfaktoren auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression analysiert (Abbildung 4.9).

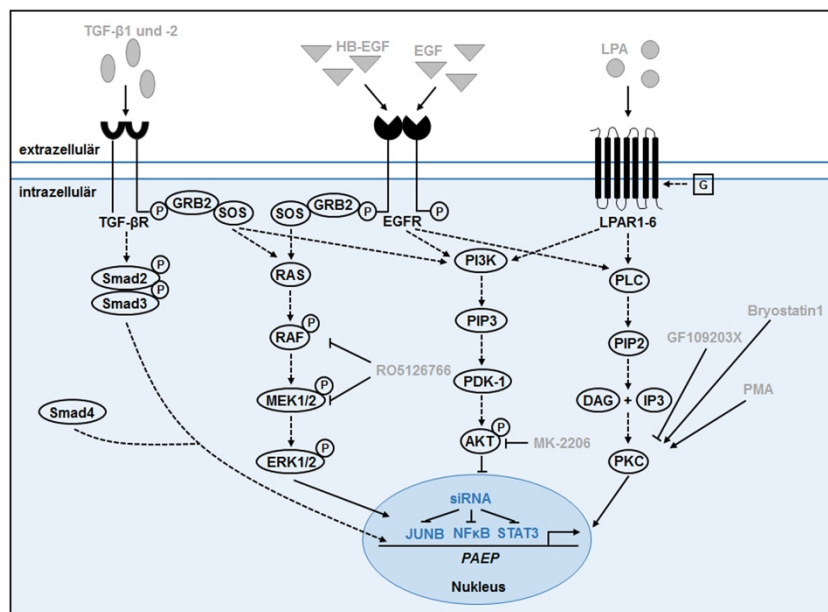


Abbildung 4.9: Übersicht über analysierte Regulatoren der *PAEP*/Glycodelin-Expression und die als nächstes adressierten Transkriptionsfaktoren

Signalweginduktoren und -modulatoren (grau) mit zuvor gezeigten regulatorischen Effekten auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression sowie in diesem Kapitel untersuchte Transkriptionsfaktoren (blau) sind schematisch dargestellt. Untersuchte Einflüsse sind mit durchgehenden Linien abgebildet, während gestrichelte Linien auf Literaturdaten zurückgehen.

Die bioinformatische Analyse (UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh/hg38) Assembly) [114] der Promotorregion von *PAEP* detektierte keine CpG-Inseln. Dies impliziert, dass eine Methylierung in der Regulation der *PAEP*-Expression keine bedeutende Rolle spielt. Des Weiteren wurden Transkriptionsfaktoren, die vor oder innerhalb dieser Region binden können, identifiziert. Aus den potentiell bindenden Transkriptionsfaktoren wurden JUNB und STAT3 für weitere Untersuchungen in Bezug auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression ausgewählt. Beide Transkriptionsfaktoren können von den bereits gezeigten Regulatoren der *PAEP*/Glycodelin-Expression aktiviert werden. Eine Induktion von JUNB durch TGF- β wurde in Studien zuvor beschrieben [126]. Darüber

hinaus wurde postuliert, dass Transkriptionsfaktoren wie JUNB, NF κ B und STAT3 nachgeschaltet an PKC- sowie MEK/ERK-Signalwegen beteiligt sind [123, 124, 140-143]. Sowohl JUN als auch NF κ B1 wurden in den vorherigen *Microarray* Analysen dieser Arbeit als vorgeschaltete Regulatoren einer erhöhten *PAEP*-Expression detektiert (siehe Tabelle 4.2). Somit ergänzte NF- κ B1 die Auswahl der adressierten Transkriptionsfaktoren.

Um *JUNB*-, *NF κ B1*- oder *STAT3*-Transkripte zu reduzieren, wurden H1975- und 2106T-Zellen mit den jeweiligen einzelnen siRNAs, den siRNA-Pools sowie der Kontroll-siRNA transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen abgelöst bzw. lysiert. Sowohl alle einzelnen *JUNB*-siRNAs als auch der Pool reduzierte *JUNB* im Vergleich zur Kontrolle nachweislich in der qPCR auf RNA-Ebene (Pool = 6,25-fach (H1975); 4-fach (2106T); signifikant) und in der Western Blot-Analyse auf Proteinebene (Abbildung 4.10). Dadurch wurde die *PAEP*/Glycodelin-Expression in 2106T-Zellen deutlich gehemmt (Pool = 2,04-fach reprimierte Genexpression; signifikant), während in H1975-Zellen nur eine schwache Reprimierung detektiert wurde (Pool = 1,28-fach reprimierte Genexpression) (Abbildung 4.10). In letzteren Zellen erhöhten die einzelnen siRNAs *JUNB* 1 und 3 die *PAEP*/Glycodelin-Expression sogar leicht. Dies könnte eine Auswirkung des *Off-Target*-Effektes sein, bei dem die siRNA aufgrund der Ähnlichkeit zur Sequenz des Zielgens ebenfalls an andere *messenger* (m)RNAs bindet. Da diese siRNAs die *JUNB*-Expression hemmten und die Ergebnisse nicht selektiv beeinflusst werden sollten, wurden auch diese siRNAs im Pool verwendet.

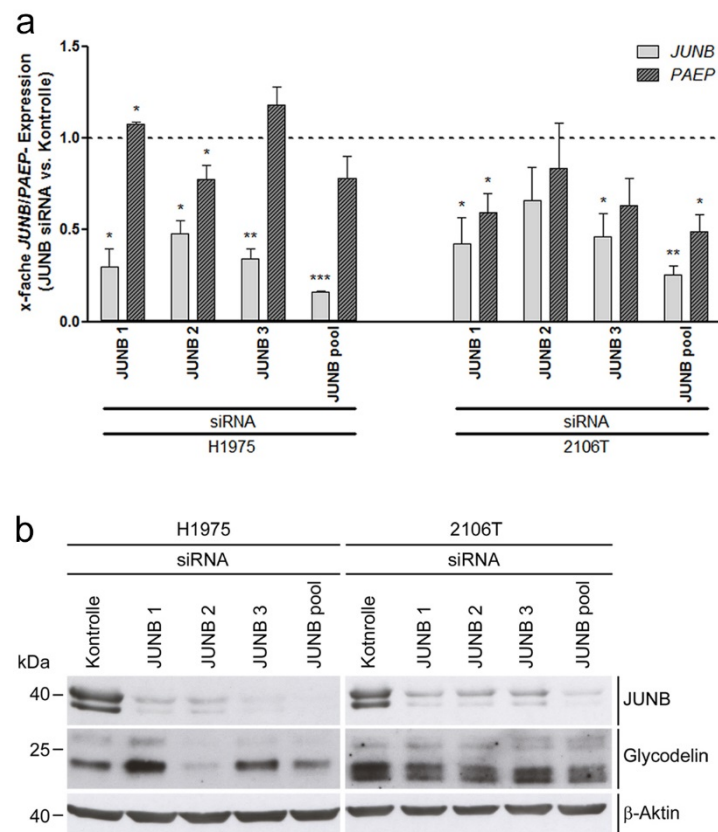


Abbildung 4.10: Das *Silencing* von *JUNB* reprimiert die *PAEP*/Glycodelin-Expression

H1975- und 2106T-Zellen wurden mit drei verschiedenen einzelnen *JUNB*-siRNAs, einem Pool davon sowie einer Kontroll-siRNA transfiziert und für 72 h inkubiert (**a**). Die *JUNB*- sowie *PAEP*-Expression wurden mittels qPCR untersucht. Die gestrichelte Linie bei 1 entspricht der Expression in den kontrollbehandelten Zellen ($n = 3$; Mittelwerte der normalisierten, relativen C_t -Werte und mittlere SD sind dargestellt). Der P -Wert wurde in Bezug auf die Kontrolle über einen zweiseitigen, gepaarten t -Test bestimmt und ist wie folgt definiert: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. (**b**) *JUNB*, Glycodelin sowie β -Aktin (Ladekontrolle) wurden im Western Blot detektiert.

Im Vergleich zur Kontrolle wurde die Expression von *NF κ B1* durch die Transfektion aller spezifischen *NF κ B1*-siRNAs sowie deren Pool in beiden Zelllinien reduziert (Pool = 6,66-fach (H1975); 4,76-fach (2106T); signifikant) (Abbildung 4.11 a). Die immunologische Detektion der korrespondierenden Proteine zeigte eine Reprimierung des Vorläuferproteins p105, aber auch der aktiven Form p50 (Abbildung 4.11 b), welche durch die proteolytische Prozessierung im Proteasom entsteht. Das *Silencing* von *NF κ B1* bedingte in H1975- und 2106T-Zellen ebenfalls eine deutlich verminderte *PAEP*/Glycodelin-Expression (Pool = 2,08-fach (H1975); 2,22-fach (2106T) reprimierte Genexpression; signifikant) (Abbildung 4.11).

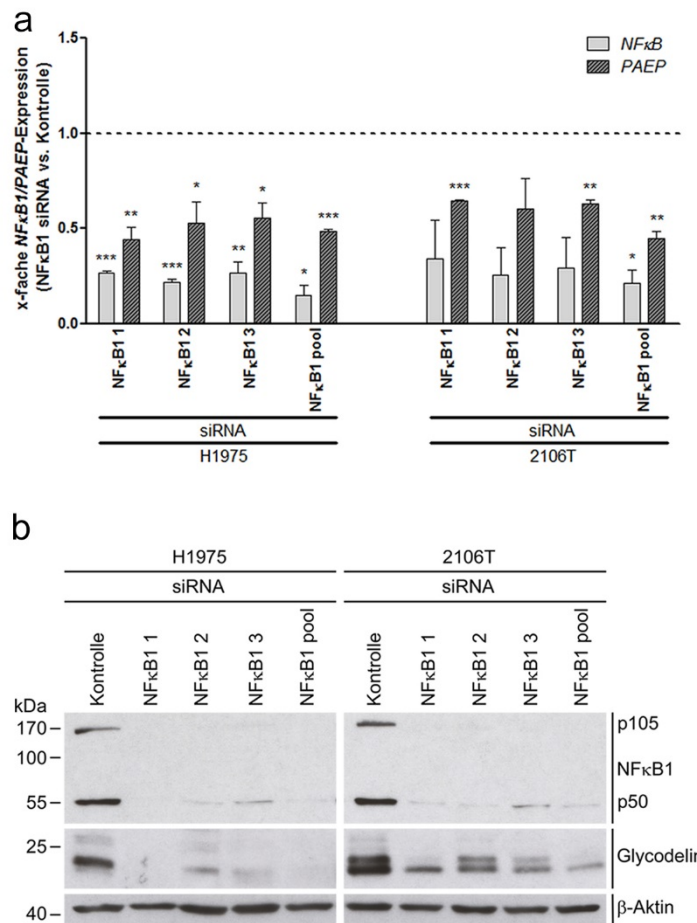


Abbildung 4.11: Der Knock-down von *NFκB1* reduziert die *PAEP*/*Glycodelin*-Expression

NFκB1- oder Kontroll-siRNA transfizierte H1975- und 2106T-Zellen wurden für 72 h inkubiert. Dafür wurden drei unterschiedliche einzelne siRNAs sowie deren Pool verwendet. **(a)** In der qPCR wurden die *NFκB1*- und *PAEP*-Expression analysiert. Die gestrichelte Linie bei 1 entspricht der Expression in den kontrollbehandelten Zellen ($n = 3$; Mittelwerte der normalisierten, relativen C_t -Werte und mittlere SD sind dargestellt). Der P -Wert wurde in Bezug auf die Kontrolle über einen zweiseitigen, gepaarten t-Test bestimmt und ist wie folgt definiert: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. **(b)** Im Western Blot wurde das Vorläuferprotein von *NFκB1* (p105), die aktive Form von *NFκB1* (p50), *Glycodelin* und die Ladekontrolle β -Aktin nachgewiesen.

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss von *STAT3* auf die Expression von *PAEP*/*Glycodelin* untersucht werden. Das *Silencing* von *STAT3* wurde mit Hilfe aller verwendeten siRNAs sowie deren Pools in beiden Zelllinien erreicht (Pool = 25-fach (H1975); 7,69-fach (2106T) reprimierte Genexpression; signifikant) (Abbildung 4.12). In H1975-Zellen wurde dadurch die *PAEP*/*Glycodelin*-Expression im Vergleich zur Kontrolle deutlich reprimiert (Pool = 2,94-fach reprimierte Genexpression; signifikant). Lediglich die siRNA *STAT3* 2 zeigte in diesen Zellen keinen starken Einfluss auf der RNA-Ebene und einen induzierenden Effekt auf Proteinebene. Eine Erklärung hierfür könnte ebenfalls der *Off-Target*-Effekt sein. Eine schwächere Reduktion der *PAEP*/*Glycodelin*-Expression wurde von allen siRNAs in

2106T-Zellen gezeigt (Pool = 1,49-fach reprimierte Genexpression). Die siRNA STAT3 3 hatte dabei den geringsten Einfluss.

Zusammen lassen diese Untersuchungen auf eine stimulierende Wirkung der Transkriptionsfaktoren JUNB, NF κ B1 und STAT3 bezüglich der *PAEP*/Glycodelin-Expression in NSCLC-Zelllinien schließen. Dabei war der Einfluss von JUNB in H1975-Zellen und STAT3 in 2106T-Zellen nur schwach ausgeprägt.

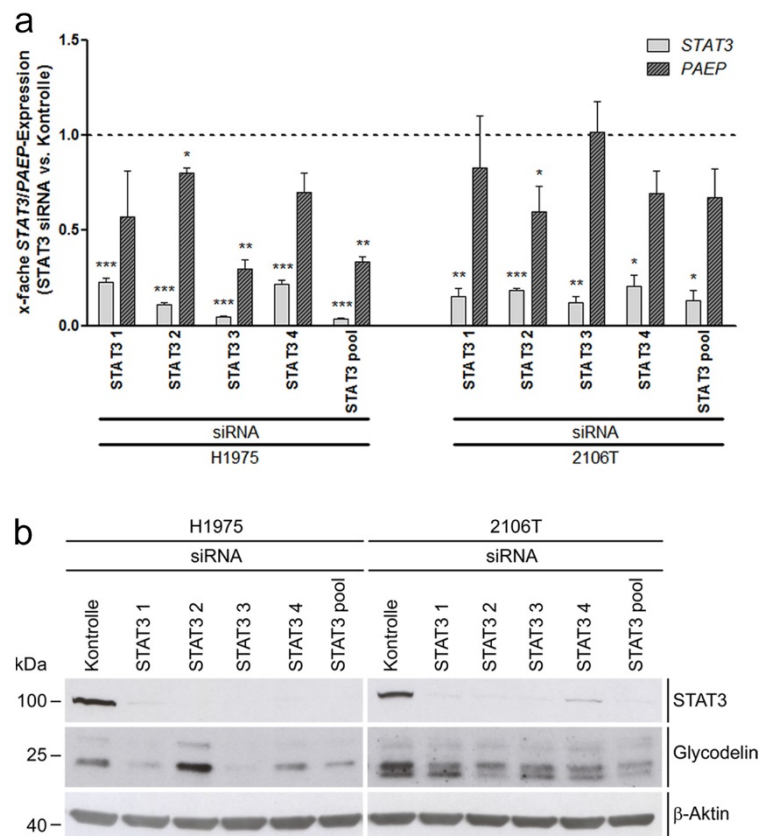


Abbildung 4.12: Die *PAEP*/Glycodelin-Expression wird durch *Silencing* von *STAT3* supprimiert

Nach der Transfektion von H1975- und 2106T-Zellen mit vier diversen einzelnen STAT3-siRNAs, deren Pool sowie einer Kontroll-siRNA erfolgte eine Inkubation für 72 h. **(a)** Mittels qPCR wurden sowohl die *STAT3*- als auch die *PAEP*-Expression ermittelt. Die gestrichelte Linie bei 1 entspricht der Expression in den kontrollbehandelten Zellen ($n = 3$; Mittelwerte der normalisierten, relativen C_t -Werte und mittlere SD sind dargestellt). Der P -Wert wurde in Bezug auf die Kontrolle über einen zweiseitigen, gepaarten t-Test bestimmt und ist wie folgt definiert: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. **(b)** *STAT3*, Glycodelin und die Ladekontrolle β -Aktin wurden im Western Blot immunologisch visualisiert.

4.4 Interaktionen zwischen Signalweginduktoren, intrazellulären Signalwegen und Transkriptionsfaktoren im Hinblick auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die jeweilige Wirkung von Signalweginduktoren, intrazellulären Signalwegen sowie Transkriptionsfaktoren auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression demonstriert. Um weitere Einblicke in die Signalkaskaden der *PAEP*/Glycodelin-Expression zu erhalten, wurden im Folgenden die Interaktionen aller bereits getesteten Moleküle untersucht (Abbildung 4.13).

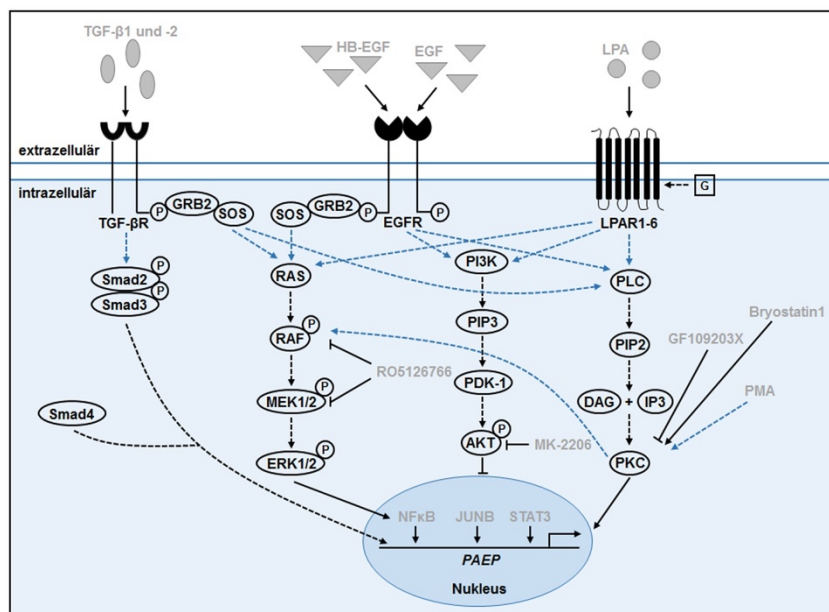


Abbildung 4.13: Übersicht über untersuchte Regulatoren der *PAEP*/Glycodelin-Expression und mögliche Interaktionen

Die regulatorische Wirkung von Signalweginduktoren sowie -modulatoren (grau) auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression und die in diesem Kapitel analysierte Interaktionen (blau) sind schematisch abgebildet. Untersuchte Einflüsse sind mit durchgehenden Linien dargestellt, während gestrichelte Linien auf Literaturdaten zurückgehen.

Zu diesem Zweck wurden H1975- und 2106T-Zellen mit den Signalweginduktoren LPA, PMA, EGF, HB-EGF, TGF-β1, -2 sowie deren entsprechenden Kontrollen behandelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Aktivität von intrazellulären Signalwegen (PKC, MEK/ERK, PI3K/AKT) und Transkriptionsfaktoren (JUNB, NFκB p105, Smad2 und STAT3) mit Hilfe von Western Blot-Analysen. Dafür wurde die Phosphorylierung der jeweiligen Transkriptionsfaktoren detektiert. Zur Untersuchung stimulierter Signalwege wurde die

Phosphorylierung einer Kinase der jeweiligen Signalkaskade nachgewiesen. Die Signale der phosphorylierten Proteine wurden im Vergleich zu den detektierten Gesamtproteinen betrachtet. Im Fall der PKC wurde ein Antikörper benutzt, der phosphorylierte PKC-Substrate wie beispielsweise das ribosomale Protein S6 (RPS6) und die Proteinkinase D (PKD) detektiert, da die Phosphorylierung der PKC selbst nicht zwingenderweise mit ihrer Aktivität korreliert [144]. Vielmehr ist die Aktivierung der meisten PKC-Isoformen von der Bindung an DAG und Phospholipide abhängig, wobei klassische PKCs (PKC α , PKC β und PKC γ) zusätzlich Calcium benötigen [145]. Zunächst wurde jedoch ein geeigneter Zeitpunkt bestimmt, um die Induktion der Phosphorylierung nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden phosphorylierte PKC-Substrate exemplarisch nach diversen PMA-Behandlungsintervallen (5 min – 24 h) sowie zusätzlich Glycodelin in beiden Zelllinien nachgewiesen. Die Aktivierung der PKC erfolgte bereits nach 5 min und erreichte ihren Höhepunkt zwischen 30 min und 1 h (Abbildung 4.14). Danach sank die Aktivität wieder kontinuierlich ab, wohingegen eine Stimulation von Glycodelin erst nach 24 h detektiert wurde (Abbildung 4.14). Kürzere Behandlungsintervalle von bis zu 4 h induzierten die Glycodelin-Expression lediglich minimal. Aufgrund dessen erfolgte die Detektion aktiver intrazellulärer Signalwege in nachfolgenden Experimenten 30 min oder 1 h nach der jeweiligen Behandlung und der Nachweis von Glycodelin nach 24 h.

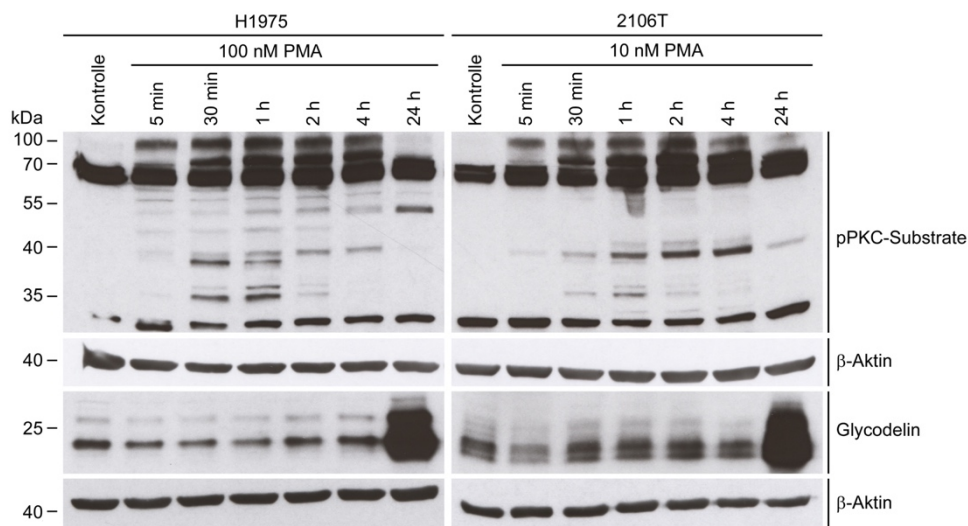


Abbildung 4.14: Zeitabhängige Stimulation der PKC-Aktivität durch PMA

H1975-Zellen und 2106T-Zellen wurden mit PMA in den angegebenen Konzentrationen für 5 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 24 h behandelt. Im Western Blot wurden phosphorylierte Substrate der klassischen PKC, Glycodelin und die Ladekontrolle β -Aktin detektiert.

Entsprechend den Ergebnissen der vorherigen Experimente zeigen sowohl Abbildung 4.15 als auch Abbildung 4.16, dass die Glycodelin-Expression in H1975-Zellen ausschließlich nach PMA-Zugabe erhöht war. Hingegen bedingte jeder der eingesetzten Signalweginduktoren verstärkte Glycodelin-Signale in 2106T-Zellen.

Die PKC-Aktivität war in H1975-Zellen nach der PMA- sowie nach der LPA-Behandlung stimuliert (Abbildung 4.15 a). In Anbetracht der vorherig gezeigten PKC-assoziierten Stimulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression ließe die Aktivierung der PKC eine erhöhte *PAEP*/Glycodelin-Expression erwarten. Dies konnte allerdings in H1975-Zellen nach der LPA-Behandlung nicht beobachtet werden. EGF, HB-EGF, TGF- β 1 und -2 hatten keinen Einfluss auf die Induktion der PKC in H1975-Zellen (Abbildung 4.15 a). In 2106T-Zellen wurde die PKC von LPA, PMA und im geringeren Ausmaß ebenfalls von EGF sowie HB-EGF stimuliert (Abbildung 4.15 b). Auch in diesen Zellen nahmen TGF- β 1 und -2 keinen Einfluss auf die PKC-Aktivität.

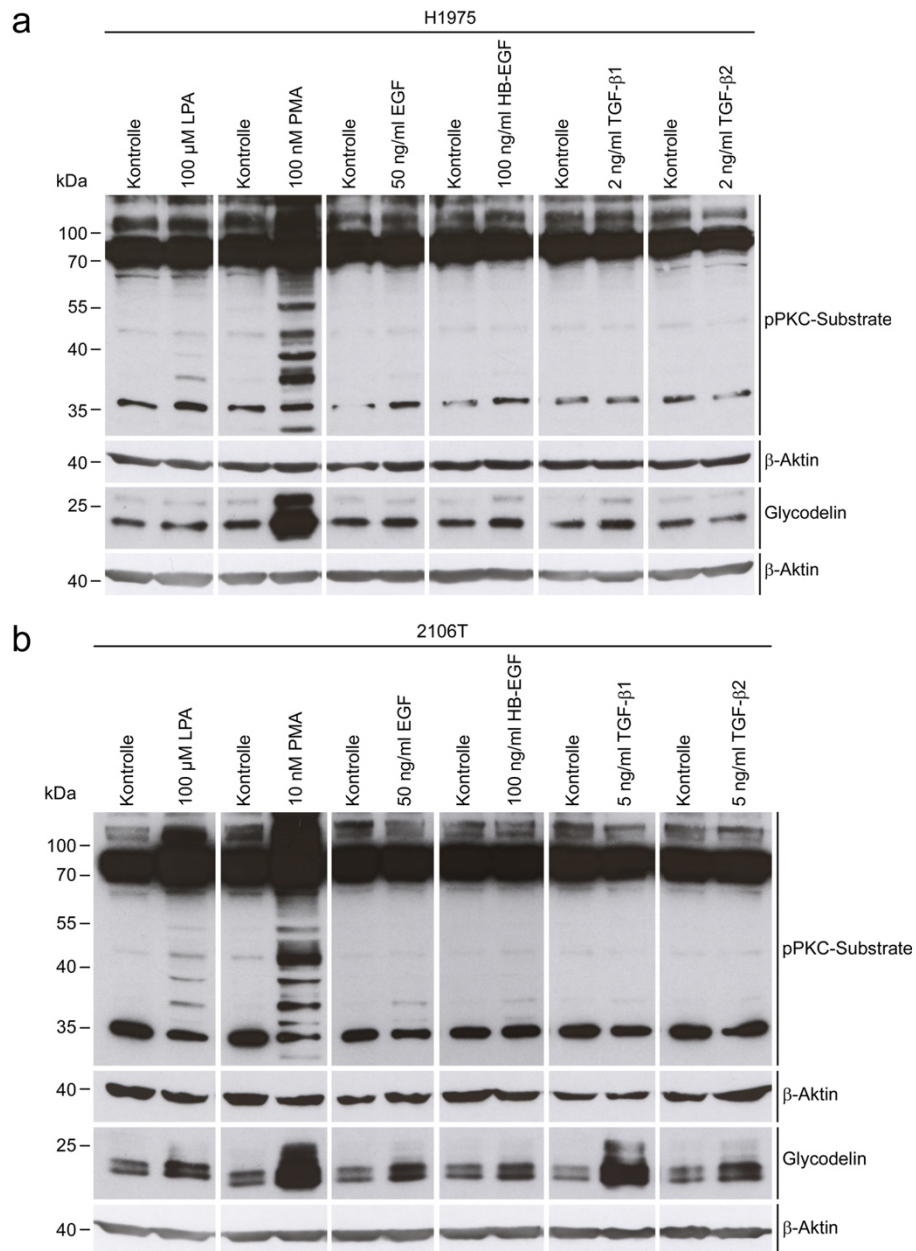


Abbildung 4.15: LPA-, PMA-, EGF- und HB-EGF induzieren Glycodelin-Expression PKC-abhängig

Die Behandlung der Zelllinien H1975- sowie 2106T-Zellen erfolgte mit LPA, PMA, HB-EGF, TGF- β 1 und -2. Phosphorylierte Substrate der klassischen PKC wurden nach 1 h detektiert. Der Nachweis von Glycodelin erfolgte nach 24 h. β -Aktin diente in beiden Fällen als Ladekontrolle.

Abbildung 4.16 zeigt einen Überblick über die Aktivitäten des MEK/ERK-Signalweges, für welchen pERK1/2 repräsentativ nachgewiesen wurde, sowie über die Transkriptionsfaktoren JUNB, NFκB p105, Smad2 und STAT3. Üblicherweise wird STAT3 durch die Phosphorylierung an Tyrosin (Tyr)705 von der Januskinase (JAK) stimuliert [146]. Allerdings sollte die Aktivierung von STAT3 in Folge von ERK und PKC [146] untersucht werden, weshalb die Phosphorylierung an Serin (Ser)727 nachgewiesen wurde [147]. Es wurde bereits gezeigt, dass STAT3 allein durch eine Phosphorylierung an Ser727 aktiviert werden kann [147]. Auf eine TGF-β1 und -2-Behandlung wurde im Fall der H1975-Zellen verzichtet, da in den vorherigen Untersuchungen kein Zusammenhang mit der *PAEP*/Glycodelin-Expression gesehen worden war. Durch LPA, PMA, EGF und HB-EGF wurde die Phosphorylierung von ERK1/2, JUNB sowie in geringerem Ausmaß von STAT3 in beiden Zelllinien verstärkt (Abbildung 4.16). Überraschend ist dieser Effekt in H1975-Zellen, denn LPA, EGF und HB-EGF beeinflussten die *PAEP*/Glycodelin-Expression in diesen Zellen nicht. Des Weiteren wurde die Phosphorylierung von NFκB p105 vermehrt in PMA-behandelten H1975- und 2106T-Zellen nachgewiesen. NFκB p105 kann durch die Bindung an NFκB-Dimere eine Retention im Zytoplasma erwirken und diese damit inhibieren [148]. Eine Phosphorylierung dieses Proteins bedingt dessen Degradierung und gibt dadurch Hinweise auf die Aktivität von NFκB. Smad2 wurde in 2106T-Zellen hauptsächlich von TGF-β1 sowie -2 stimuliert, wohingegen LPA ebenfalls einen leicht induzierenden Effekt zeigte (Abbildung 4.16).

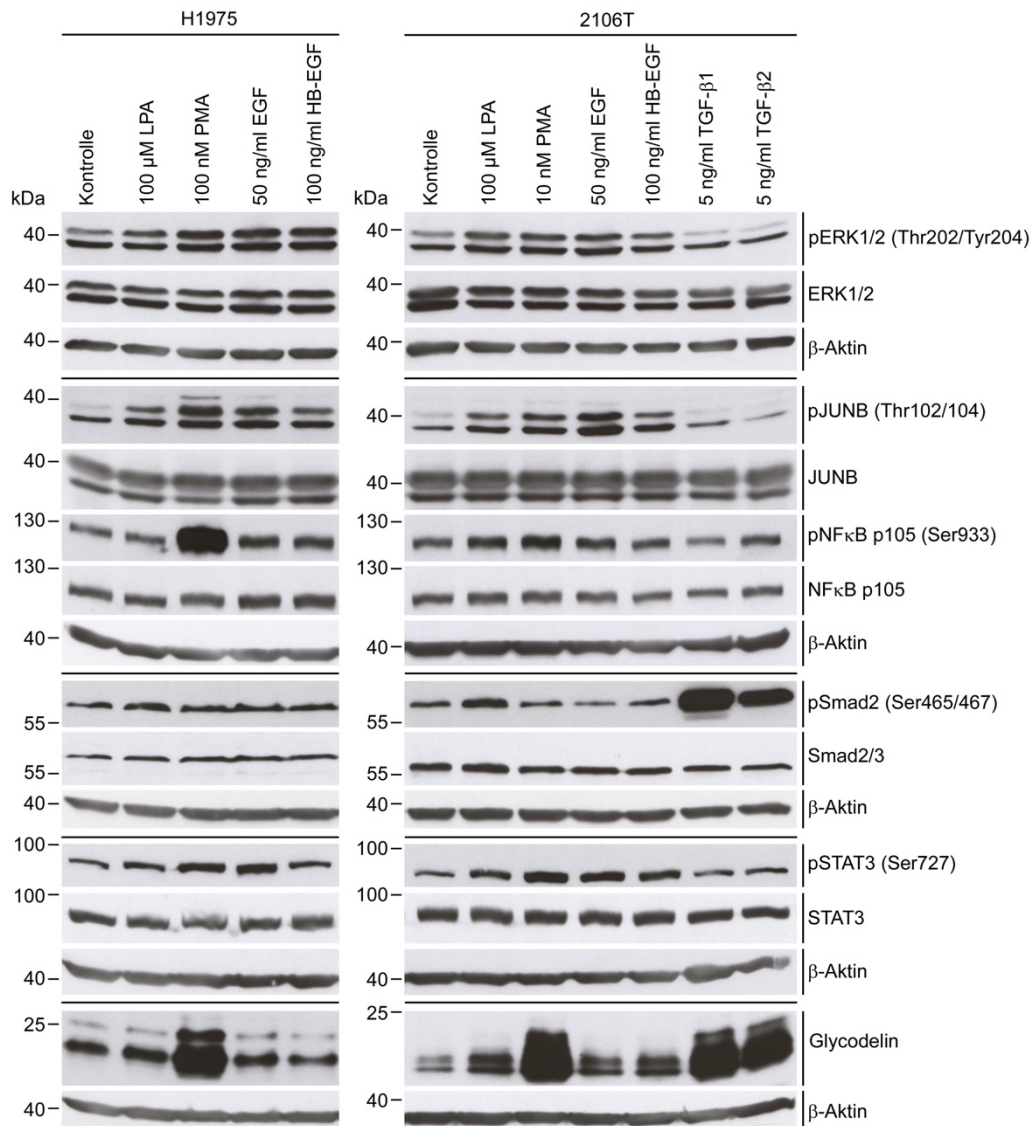


Abbildung 4.16: Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges sowie der Transkriptionsfaktoren JUNB, NFκB, Smad2 und STAT3 durch verschiedene Induktoren

Die Zelllinien H1975 und 2106T wurden mit LPA, PMA, EGF und HB-GF behandelt. Für 2106T-Zellen wurden zusätzlich TGF-β1 und -2 eingesetzt. Die Phosphorylierung von ERK, JUNB, NFκB p105, Smad2, STAT3 und deren Gesamtprotein wurde 30 min nach der Behandlung detektiert. Glycodelin wurde nach 24 h nachgewiesen. Als Ladekontrolle zu den verschiedenen Zeitpunkten diente β-Aktin.

Aus den Experimenten in H1975-Zellen gingen Ergebnisse hervor, die weitere Fragen aufwarfen. Die Aktivierung der PKC durch LPA sowie die Stimulierung von ERK und STAT3 durch LPA, EGF und HB-EGF ließ aufgrund der vorherigen Ergebnisse eine Induktion der *PAEP*/Glycodelin-Expression erwarten. Allerdings hatten diese Signalweginduktoren keinen Einfluss darauf. In Folge dessen wurde der Einfluss von LPA, EGF und HB-EGF auf die Stimulierung des PI3K/AKT-Signalweges untersucht, um die mögliche Beteiligung eines antagonistischen Signalweges zu überprüfen. Zuvor durchgeführte Analysen lassen darauf

schließen, dass der PI3K/AKT-Signalweg die *PAEP*/Glycodelin-Expression in H1975-Zellen hemmt. Die LPA-Behandlung führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer starken Phosphorylierung von AKT, während EGF und HB-EGF eine schwächere Steigerung auslösten (Abbildung 4.17).

Fasst man die Ergebnisse beider Zelllinien zusammen, ergaben diese Analysen eine nachgeschaltete Aktivierung des PKC- sowie des MEK/ERK-Signalweges infolge einer Behandlung mit den Induktoren LPA, PMA, EGF und HB-EGF. Die Transkriptionsfaktoren JUNB und STAT3 wurden ebenfalls induziert, wohingegen NF κ B hauptsächlich von PMA und Smad2 von TGF- β stimuliert wurde. Die ausbleibende Stimulierung der Glycodelin-Expression durch LPA, EGF und HB-EGF in H1975-Zellen kann durch die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges erklärt werden.

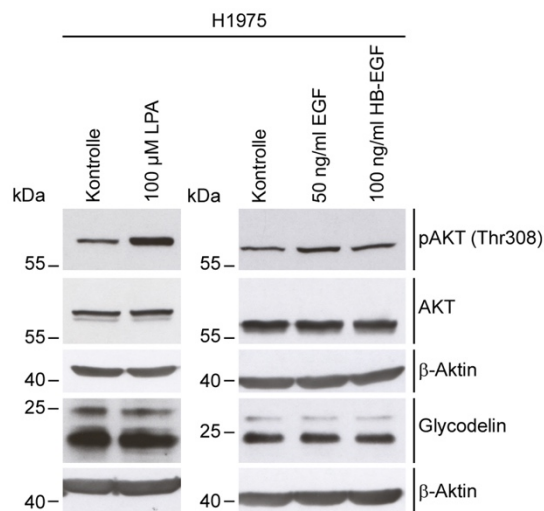


Abbildung 4.17: LPA, EGF und HB-EGF induzieren den PI3K/AKT-Signalweg ohne die Glycodelin-Expression zu beeinflussen

Die Behandlung von H1975-Zellen erfolgte mit LPA, EGF und HB-EGF. Die Phosphorylierung von AKT und das Gesamtprotein wurden nach 1 h nachgewiesen. Die Detektion von Glycodelin erfolgte nach 24 h. β -Aktin der jeweiligen Proben diente als Ladekontrolle.

4.5 Die Regulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression in Tumorgewebe

Vorherige Analysen zeigten bereits einige Regulatoren der *PAEP*/Glycodelin-Expression im Zellkultursystem. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss dieser in NSCLC-Patientengeweben validiert. Dafür wurden qPCR-generierte Daten einer früheren Studie verwendet [71]. Jeweils 20 ADC- und 15 SQCC-Patientenproben (Tabelle 4.4) mit der höchsten sowie der niedrigsten *PAEP*-Expression wurden ausgewählt und *Microarray* Genexpressionsanalysen durchgeführt. Diese Datensätze sind in der NCBI GEO-Datenbank verfügbar (GSE115458; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE115458>). Bezüglich der Expressionsprofile von *PAEP* und zuvor identifizierter Regulatoren ergaben sich keine Korrelationen (Daten nicht gezeigt).

Bei der Regulation von Signalwegen spielt neben der Expression von Molekülen allerdings ebenfalls die Phosphorylierung eine wichtige Rolle. Wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben, wird die Aktivität vorgeschalteter Regulatoren bei einer Analyse mittels der *Software* IPA (*upstream regulator analysis*) berücksichtigt. Somit wurden differentiell exprimierte Gene ($< 1,5$ oder $> 1,5$) der NSCLC-Tumorproben (Tabelle 4.5) im Folgenden mit dieser *Software* analysiert. Interessanterweise wurden die meisten Regulatoren, welche die *PAEP*/Glycodelin-Expression in den Zelllinien erhöhte, ebenfalls als vorgeschaltete Regulatoren in NSCLC-Tumoren mit einer hohen *PAEP*-Expression identifiziert (Tabelle 4.6). Entsprechend den Beobachtungen im Zellkultursystem waren vorgeschaltete Regulatoren in SQCC-Patientenproben stärker aktiviert als in den ADC-Tumoren. Lediglich die Aktivität von STAT3 und TGF- β 1 war in beiden NSCLC-Subtypen ähnlich stark erhöht. Da eine Inhibierung von AKT die Expression von *PAEP*/Glycodelin in H1975-Zellen erhöhte, wäre dementsprechend eine reduzierte Aktivität in ADC-Patientenproben mit hoher *PAEP*-Expression zu erwarten gewesen. Jedoch war auch hier die Aktivität leicht erhöht.

Die Ergebnisse bestätigten somit die im Zellkultursystem identifizierten Regulatoren der *PAEP*/Glycodelin-Expression. Ausschließlich in ADCs wäre entsprechend den Daten in den Zelllinien keine gesteigerte Aktivität von TGF- β und eine Inhibierung von AKT in ADCs zu erwarten gewesen.

Tabelle 4.4: Patienten- und Tumorcharakteristika

Abkürzungen: Adenokarzinom (ADC), Plattenepithelkarzinom (SQCC), Gesamtanzahl (n), Operation (OP), Radiotherapie (RT), Chemotherapie (CT), pathologisches (p)-Stadium (7. Edition), *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG)

Parameter	ADC n = 40	SQCC n = 30
Alter		
Median (Bereich)	65 (40 – 81)	64 (42 – 83)
Geschlecht		
männlich	25	26
weiblich	15	4
Raucherstatus		
Raucher	13	10
Nichtraucher < 6 Monate	10	5
Nichtraucher > 6 Monate	14	14
Nieraucher	3	1
Therapie		
OP	21	19
OP/RT	1	1
OP/CT	14	10
OP/RT/CT	4	0
P-Stadium		
IA	4	4
IB	18	13
IIA	0	0
IIB	10	7
IIIA	8	6
ECOG		
0	37	28
1	3	1
2	0	1

Tabelle 4.5: Informationen zu differentiell exprimierten Genen (Faktor < -1,5 oder > 1,5) in NSCLC-Gewebe mit hoher PAEP-Expression

↓ = runterregulierte Gene und ↑ = hochregulierte Gene

Histologie	n	Anzahl der Gene mit Faktor < -1,5 oder > 1,5	Bereich des Faktors
ADC	40	1255 (606↓; 649↑)	-9,23 – 83,29
SQCC	30	1510 (654↓; 856↑)	-9,43 – 43,81

Tabelle 4.6: Ingenuity Pathway Analysis (IPA) vorgeschalteter Regulatoren in NSCLC-Gewebe mit hoher PAEP-Expression

Dargestellt sind die *activation z-scores* (signifikant bei > 2 oder < -2), die mittels der *Software* IPA generiert wurden. Der Farbverlauf von gelb (hoch) bis blau (niedrig) gibt die Höhe der Werte wieder. Ausschließlich Regulatoren, die in den Zellen untersucht wurden, wurden aus den 500 signifikantesten vorgeschalteten Regulatoren selektioniert.

vorgeschaltete Regulatoren	Adenokarzinom	Plattenepithelkarzinom
AKT	0,98	2,67
EGF	3,34	5,17
HBEGF	1,78	2,72
JUNB	2,31	3,20
LPA	N/A	1,00
Mek	1,84	2,14
NFKB1	2,79	3,41
PKC(s)	1,79	2,46
PMA	2,14	6,58
RAF1	1,86	5,59
SMAD2	1,45	3,10
STAT3	3,50	3,35
TGFB1	6,08	5,82
TGFB2	1,49	2,36
TGFB3	2,50	3,86

5 Diskussion

5.1 Die Regulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression im Zellkultursystem

Eine Aufklärung über die Regulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression liefert wichtige Hinweise für die Verwendung dieses Proteins als möglichen Verlaufsmarker und potentiell Zielmolekül neuer Immuntherapien für NSCLC-Patienten [71]. Zum jetzigen Zeitpunkt sind nur sehr wenige Signalwege beschrieben, welche die *PAEP*/Glycodelin-Expression in Tumorerkrankungen regulieren. Für NSCLC wurden diesbezüglich noch keine Daten gezeigt. Aufgrund dessen wurden im Rahmen dieser Arbeit die bislang unbekannt Mechanismen der *PAEP*/Glycodelin-Expression in NSCLC Zelllinien und Patientengewebe untersucht.

Bisher ist die Expression von *PAEP*/Glycodelin im NSCLC noch nicht ausreichend untersucht. Schneider et al. zeigten, dass *PAEP* in circa 80 % der in der Studie analysierten NSCLC-Tumore im Vergleich zu deren korrespondierenden Normalgewebe überexprimiert war. Im Gegensatz dazu wurden nur wenige Lungenkarzinomzelllinien wie H1975 und 2106T identifiziert, die *PAEP*/Glycodelin exprimierten [71]. In einigen vorhergehenden Studien wurden inhibitorische Einflüsse von Glycodelin auf die Apoptose, Proliferation und Aktivität von Immunzellen beobachtet. Dabei waren T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Dendritische Zellen und Monozyten betroffen [82]. Darüber hinaus bestehen bezüglich der Proliferation, Invasion sowie Immuntoleranz einige Parallelen zwischen einer Schwangerschaft und einer Tumorerkrankung. Diesbezüglich reprimieren sowohl Trophoblast- als auch Karzinomzellen die Immunantwort [149]. Eine immunsuppressive Wirkung von Glycodelin während der Etablierung der Schwangerschaft ist bekannt [54]. Vermutlich bilden auch NSCLC-Tumore Glycodelin, um der körpereigenen Immunabwehr zu entgehen. Daraus lässt sich folgern, dass die Tumormikroumgebung bei der Expression von *PAEP*/Glycodelin eine wichtige Rolle spielt und somit viele NSCLC-Zellen außerhalb ihres natürlichen Milieus *in vitro* die Expression von Glycodelin einstellen.

Exemplarisch für die nachfolgend getesteten Hormone (hCG) und Signalweginduktoren (LPA, EGF, HB-EGF, TGF- β 1, -2 und -3) wurde eine Induktion von Glycodelin durch PMA nach 4 h nachgewiesen. Danach reicherte sich das Protein kontinuierlich bis zum letzten gemessenen Zeitpunkt von 24 h in den Zellen an. Als Glycoprotein ist Glycodelin über mehrere Stunden intrazellulär stabil. Zudem könnte der Serumentzug der Zellen eine

verminderte Sekretion von Glycodelin verursacht haben und daher zu einer intrazellulären Anreicherung des Proteins beitragen. Der Zeitpunkt 24 h wurde repräsentativ für den Nachweis der Glycodelin-Expression verwendet.

Im weiblichen Genitaltrakt wird die Synthese von Glycodelin vor allem hormonell durch Progesteron [100, 101] beeinflusst. Als Antwort auf die Progesteron-Sekretion ist Glycodelin im normalen Zyklus 4 – 5 Tage nach der Ovulation nachweisbar und erreicht seinen Höchststand nach circa 10 Tagen [52]. Die Sekretion von Progesteron und Glycodelin ist somit zeitlich versetzt, jedoch korrelieren die Mengen von Glycodelin in der späten Lutealphase mit denen von Progesteron in der mittleren Lutealphase [57]. Glycodelin wird ebenfalls während der Schwangerschaft exprimiert. Die Höchstwerte liegen hier in den Schwangerschaftswochen 10 – 18 [52]. Zusätzlich ähneln die Sekretionsprofile der Hormone hCG [56] und Relaxin [150] dem von Glycodelin während der Schwangerschaft. Eine Stimulation der Glycodelin-Expression durch hCG [102, 103] und Relaxin [104] wurde bereits in Zellen des weiblichen Genitaltraktes beobachtet. Vorherige Analysen innerhalb der Arbeitsgruppe zeigten keine Auswirkungen von Progesteron und Relaxin auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression in NSCLC-Zellen (Daten bisher nicht publiziert), was das Fehlen entsprechender Rezeptoren folgern lässt. Ausschließlich die in dieser Arbeit untersuchten hohen hCG-Konzentrationen stimulierten die *PAEP*/Glycodelin-Expression tendenziell, allerdings kam es zu Veränderungen in der Zellmorphologie und Anordnung im Zellverband. Auch wenn hCG während der Schwangerschaft im Plasma deutlich über die hier verwendeten Konzentrationen steigt [151], scheinen hCG-Konzentrationen von 1000 U/ml und darüber hinaus nicht mehr physiologisch für die NSCLC-Zelllinien zu sein. Daraus lässt sich schließen, dass diese schwangerschaftsassozierten Hormone hinsichtlich der Regulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression in NSCLC-Zellen keine bedeutende Rolle spielen.

Morrow et al. postulierten die Stimulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression in einer myeloischen Leukämiezelllinie durch die Konditionierung des Kulturmediums mit PMA [105]. Zudem wurde gezeigt, dass eine LPA-Behandlung die *PAEP*/Glycodelin-Expression in Cervix-, Endometrium-, Ovarialkarzinom und myeloischen Leukämiezelllinien induziert [106]. Dies lässt ebenfalls einen Einfluss in NSCLC-Zelllinien erwarten. In der Tat wurde die *PAEP*/Glycodelin-Expression in H1975-Zellen durch PMA und in 2106T-Zellen durch LPA sowie PMA stimuliert (Abbildung 5.1). Beide sind Stimulatoren der PKC [107, 108], was eine Beteiligung an der *PAEP*/Glycodelin-Expression in nachgeschalteten Signalwegen anzeigt. Zudem induzierten EGF, HB-EGF, TGF- β 1 und -2 die Expression von *PAEP*/Glycodelin in 2106T-Zellen, jedoch nicht in H1975-Zellen. EGF und HB-EGF

stimulieren als Liganden den EGFR, der wiederum Signalkaskaden wie den MEK/ERK- oder PI3K/AKT-Signalweges aktiviert [22]. TGF- β kann über den nicht-kanonischen Weg ebenfalls diese beiden Signalkaskaden aktivieren [127]. Bisher gab es keine Analysen, die einen Einfluss von EGF, HB-EGF oder TGF- β auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression adressierten.

Nach den Untersuchungen zur Beteiligung von Signalweginduktoren bei der *PAEP*/Glycodelin-Expression waren nachgeschaltete Signalwege im Fokus. Die Rolle der PKC im NSCLC und ihre Adressierung in der Therapie werden kontrovers diskutiert. Dennoch wurde die Calcium-abhängige Stimulation der PKC als nachgeschaltete Signalkaskade des EGFR, der häufig in NSCLC-Tumoren mutiert ist, beschrieben [152]. Allgemein bekannt, unter anderem im Zusammenhang mit diesem Rezeptor, ist die Deregulation der MEK/ERK- und PI3K/AKT-Signalkaskade im NSCLC. Aktivierende Mutationen im *EGFR* sowie eine *EML4-ALK*-Fusion stimulieren diese Signalwege [22, 29, 138, 139]. Im Fall einer *KRAS*- oder *BRAF*-Mutation ist speziell der MEK/ERK-Signalweg betroffen. Mutationen innerhalb des *PIK3CA*-Gens wirken sich auf die PI3K/AKT-Signalkaskade aus [153]. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse konnten die Beteiligung dieser Signalkaskaden an der Regulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression mit unterschiedlichen Auswirkungen darstellen. Die Analysen mit entsprechenden Inhibitoren und Aktivatoren lassen auf einen stimulierenden Einfluss klassischer und neuer Formen der PKC sowie des MEK/ERK-Signalweges auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression schließen (Abbildung 5.1). Des Weiteren wurde kein Einfluss von AKT in 2106T-Zellen detektiert, während die Ergebnisse in H1975-Zellen eine deutliche AKT-assoziierte Reduktion der *PAEP*/Glycodelin-Expression folgern lassen. Dementsprechend zeigten Xu et al. eine Reprimierung der Glycodelin-Expression durch die Inhibierung von MEK1/2 in endometrialen Adenokarzinomzellen. Passend zu den Daten in 2106T-Zellen stellten sie zudem in der gleichen Studie keine Beeinflussung in Folge eines p38 Mitogen-aktivierten Protein (MAP) Kinase-Inhibitors, der zusätzlich die AKT-Phosphorylierung hemmte, fest [109]. Die inhibierende Wirkung von AKT auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression in H1975-Zellen steht dem jedoch entgegen. Der PI3K/AKT-Signalweg kann sowohl von p110 α als auch p110 β induziert werden. *PIK3CA* und *PIK3CB* codieren jeweils für die katalytische Untereinheit p110 α bzw. p110 β [154]. H1975-Zellen sind Träger verschiedener Mutationen innerhalb des *EGFR*- (T790M, L858R) und *PIK3CA*-Gens (G118D), die bereits mit einer Aktivierung von AKT assoziiert wurden [125, 133-136]. In embryonalen Rattenfibroblasten wurde für eine der in 2106T-Zellen vorliegende *PIK3CB*-Mutation (G3151A) erstmals eine gesteigerte Aktivität von AKT in entsprechend stabil transduzierten, embryonalen

Rattenfibroblasten festgestellt. In dieser Studie wurde zudem unter Verwendung von p110 α - und p110 β -Inhibitoren gezeigt, dass der PI3K/AKT-Signalweg in humanen, *PIK3CB*-mutierten (G3151A) Glioblastomzellen eher von p110 β abhängig ist [137]. In den Ergebnissen dieser Arbeit wurde im Vergleich zu 2106T-Zellen eine stärkere Aktivität von AKT in H1975-Zellen beobachtet. Dies impliziert eine stärkere Induktion von AKT durch *EGFR*- und *PIK3CA*-Mutationen als in Folge von Mutationen innerhalb des *PIK3CB*-Gens in den untersuchten Zelllinien. Somit könnte die stärkere Aktivität von AKT in H1975-Zellen die Ursache der Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien sein. Die Mutation sowohl im *PIK3CA*-Gen (G118D) als auch im *PIK3CB*-Gen (G3151A) sind in der Literatur nicht ausreichend beschrieben. Zudem liegen, soweit bekannt, bisher keine Daten vor, welche die Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges hinsichtlich genau dieser Mutationen vergleicht. Die Ergebnisse bezüglich Wildtyp p110 α (*PIK3CA*) und p110 β (*PIK3CB*) sprechen jedoch p110 α (*PIK3CA*) eine bedeutendere Rolle in der PI3K/AKT-Signalkaskade zu. Die Behandlung von Mammakarzinomzellen mit p110 α -Inhibitoren ergab eine generell reduzierte AKT-Phosphorylierung, wohingegen p110 β -Inhibitoren diesen Effekt ausschließlich in Phosphatase und Tensin-Homolog (PTEN)-mutierten Zellen zeigten [155]. Des Weiteren wurde eine Assoziation von p110 α (*PIK3CA*) mit p110 β (*PIK3CB*) postuliert und dieser Komplex als Voraussetzung für eine optimale p110 β -Aktivität beschrieben [156]. Dementgegen stehen Studien mit Glioblastomzellen, die eine stärkere Induktion der PI3K/AKT-Signalkaskade durch p110 β (*PIK3CB*) zeigten [157].

Der EGFR-TKI AZD9291, auch bekannt als Osimertinib, wird insbesondere zur zielgerichteten Therapie von Lungenkarzinompatienten mit einer T790M-mutationsbedingten TKI-Resistenz eingesetzt [120]. H1975-Zellen, die Träger dieser Mutation sind, zeigten auf RNA-Ebene keine Veränderung der *PAEP*-Expression in Folge der AZD9291-Behandlung. Allerdings kam es zu einer starken Abnahme des Proteins. Durch die kombinierte Behandlung von AZD9291 mit dem Proteasominhibitor Bortezomib wurde ein vermehrter proteosomaler Proteinabbau ausgeschlossen. Die zusätzliche Reduktion von β -Aktin durch AZD9291 gab Hinweise darauf, dass die Reprimierung von Glycodelin auf eine verminderte Vitalität und das Absterben der Zellen zurückzuführen ist. Zukünftige Experimente wie ein Lactatdehydrogenase-Assay könnten hierzu weitere Informationen bieten. Dennoch lässt sich aus diesen Experimenten schließen, dass eine AZD9291-Behandlung von H1975-Zellen die *PAEP*/Glycodelin-Expression nicht maßgeblich beeinflusst. Vorherige Studien zeigten eine verringerte Aktivität von ERK sowie von AKT in Folge der Behandlung von H1975-Zellen mit AZD9291 [120, 158, 159]. Da somit

sowohl der stimulierende MEK/ERK- als auch der reprimierende PI3K/AKT-Signalweg gehemmt werden, wäre dies eine plausible Erklärung für die unveränderte *PAEP*/Glycodelin-Expression.

Eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren JUNB, NFκB und STAT3 an PKC- sowie MEK/ERK-Signalwegen ist bereits bekannt [123, 124, 140-143]. Darüber hinaus wurde ein Zusammenhang zwischen der Induktion von JUNB und TGF-β zuvor beschrieben [124, 126]. Durch das *Silencing* der entsprechenden Gene wurde auf deren regulatorischen Effekt bezüglich der *PAEP*/Glycodelin-Expression geschlossen. JUNB veränderte die Expression von *PAEP*/Glycodelin in H1975-Zellen nur geringfügig, stimulierte sie jedoch in 2106T-Zellen (Abbildung 5.1). Zudem wurde in beiden Zelllinien eine Induktion der *PAEP*/Glycodelin-Expression mit NFκB1 assoziiert. Für den Transkriptionsfaktor STAT3 ergaben sich ebenfalls Unterschiede hinsichtlich der Stärke des Einflusses auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression. In beiden Zelltypen stimulierte STAT3 die *PAEP*/Glycodelin-Expression, jedoch waren H1975-Zellen stärker betroffen als 2106T-Zellen. Bislang wurde keiner dieser Transkriptionsfaktoren im Hinblick auf die Expression von *PAEP*/Glycodelin analysiert. Um konkret eine Bindung der Transkriptionsfaktoren an die Sequenz von *PAEP* nachzuweisen, würden sich für zukünftige Untersuchungen Chromatin-Immunpräzipitationen mit der Promotorregion von *PAEP* anbieten.

Analysen bezüglich des Zusammenhangs verwendeter Signalweginduktoren und der PKC als nachgeschalteten Signalweg ergaben eine Aktivierung der Kinase in Folge von LPA und PMA in beiden Zelllinien (Abbildung 5.1). Da PMA die Wirkungsweise des natürlichen PKC-Aktivators DAG imitiert, war die Phosphorylierung dieser Kinase in Folge einer PMA-Behandlung zu erwarten. LPA wurde ebenfalls bereits zuvor als Induktor der PKC-Signalkaskade beschrieben [108]. Des Weiteren wurde eine leichte Stimulation der PKC durch EGF und HB-EGF ausschließlich in 2106T-Zellen detektiert. Übereinstimmend damit wurde bereits eine Calcium-abhängige Aktivierung der PKC durch die Stimulierung des EGFR beschrieben [152]. Erwartungsgemäß zeigten TGF-β1 und -2 keinen Einfluss auf das Aktivitätsmuster dieser Kinase.

In beiden Zelllinien wurde eine Aktivierung des RAF/MEK-Signalweges von JUNB sowie in geringerem Ausmaß von STAT3 mit allen analysierten Induktoren beobachtet (Abbildung 5.1). TGF-β1 und -2 hatten diesbezüglich keinen Einfluss, stimulierten jedoch Smad2 in 2106T-Zellen. Deutlich schwächer wurde Smad2 in dieser Zelllinie durch LPA aktiviert. NFκB1 wurde ausschließlich durch PMA erkennbar induziert. Diesen Ergebnissen entsprechend zeigten vorherige Studien eine Stimulation des RAF/MEK-Signalweges durch die Phosphorylierung des EGFR sowie der PKC [125, 131]. Ebenso passend dazu ist die

bereits erwähnte Beteiligung von JUNB und STAT3 in Folge einer Aktivierung des PKC- sowie MEK/ERK-Signalweges [124, 140-142]. Mit diesen Signalwegen wurde auch NF κ B in der Literatur assoziiert [123, 143], allerdings lassen die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine Stimulierung von NF κ B nur in Folge einer hohen PKC-Aktivität schließen. Ein Zusammenhang zwischen einer TGF- β -Behandlung und der Induktion von JUNB wurde hier nicht beobachtet. Jedoch steht die TGF- β - und LPA-induzierte Smad2-Phosphorylierung in Übereinstimmung mit vorherigen Studien [160, 161]. Damit geht aus diesen Ergebnissen hervor, dass TGF- β in 2106T-Zellen nachgeschaltet nur den kanonischen Signalweg über Smad stimuliert. Da Glycodelin ein Bindungspartner von Smad3 ist [162], könnte darüber hinaus möglicherweise ebenfalls eine Autoregulierung eine Rolle spielen. Der MEK/ERK-Signalweg, welcher Teil der nicht-kanonischen Signalkaskade ist [127], blieb durch die TGF- β -Behandlung unbeeinflusst.

Innerhalb der Ergebnisse in H1975-Zellen zeigten sich einige Diskrepanzen. LPA aktivierte die PKC und LPA, EGF sowie HB-EGF den MEK/ERK-Signalweg ohne dabei die Expression von *PAEP*/Glycodelin zu beeinflussen. Vorhergehende Experimente deuteten jedoch auf einen induzierenden Einfluss sowohl der PKC als auch von RAF/MEK bezüglich der *PAEP*/Glycodelin-Expression hin. Da AKT die Expression von *PAEP*/Glycodelin in H1975-Zellen hemmte, wurde die Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges nach der Behandlung mit diesen Induktoren analysiert. In der Tat wurde AKT durch LPA, EGF und HB-EGF in H1975-Zellen stimuliert, was einen antagonistischen Einfluss des PI3K/AKT-Signalweges auf die PKC- und MEK/ERK-Signalkaskaden folgern lässt (Abbildung 5.1). Entsprechend dazu geht aus Literaturdaten sowohl eine LPA- als auch eine EGFR-abhängige Stimulation des PI3K/AKT-Signalweges hervor [128, 129]. Der Einfluss des PI3K/AKT-Signalweges auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression könnte abhängig von den aktivierenden *EGFR*- (T790M, L858R) und *PIK3CA*-Mutationen (G118D) in den H1975-Zellen sein. Diese Mutationen wurde bereits mit der Aktivierung von AKT assoziiert [125, 133-136]. Somit würde die verstärkte Stimulation von AKT in Folge dieser Mutationen reprimierend auf die Glycodelin-Expression wirken. 2106T-Zellen, bei denen eine *PIK3CB*-Mutation vorliegt (G3151A), zeigten eine schwächere AKT-Aktivität als H1975-Zellen und demzufolge keine Modulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression in Folge der AKT-Inhibierung. In H1975-Zellen hatten TGF- β 1 und -2 keinen Einfluss auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression, aktivierten jedoch auch nicht AKT (Daten nicht gezeigt). Somit ist die Ursache für die unterschiedlichen Einflüsse von TGF- β in H1975- und 2106T-Zellen bisher unklar. TGF- β wird bezüglich der Tumorprogression zwei unterschiedliche Rollen zugesprochen. In frühen Stadien der Tumorentwicklung agiert der TGF- β -Signalweg

tumorsupprimierend, indem er die Zellproliferation inhibiert, die Apoptose induziert und die Immortalisierung der Zellen hemmt. Dagegen werden in späteren Stadien die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), die Zelladhäsion, die Migration, die Invasion, die Metastasierung, die Immunsuppression und die Angiogenese von TGF- β unterstützt [163]. Nicht nur die Tumorzellen selbst sondern auch tumorassoziierte Fibroblasten, die in der Tumormikroumgebung eine wichtige Rolle spielen, sezernieren TGF- β [164]. Daher wäre es interessant, die Ursache der Unterschiede zwischen H1975- und 2106T-Zellen bezüglich der TGF- β -induzierten *PAEP*/Glycodelin-Expression in zukünftigen Experimenten zu adressieren.

Zusammenfassend geht aus diesen Daten hervor, dass häufig im NSCLC deregulierte Signalwege einen Einfluss auf die Regulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression und somit auch auf die immunsuppressive Funktion in den hier untersuchten NSCLC-Zellen nehmen. Die *PAEP*/Glycodelin-Expression wurde hauptsächlich von der kanonischen TGF- β -Signalkaskade in 2106T-Zellen und dem PKC-Signalweg in beiden Zelllinien stimuliert. Die PI3K/AKT-Signalkaskade ist aufgrund von *EGFR*- und *PIK3CA*-Mutationen in den H1975-Zellen stärker aktiviert als in *PIK3CB*-mutierten 2106T Zellen und inhibierte deshalb die Expression von *PAEP*/Glycodelin ausschließlich in den zuerst erwähnten Zellen. Hierbei lassen die Ergebnisse auf eine antagonistische Rolle gegenüber den anderen untersuchten Signalwegen schließen. Der MEK/ERK-Signalweg induzierte ebenfalls die *PAEP*/Glycodelin-Expression.

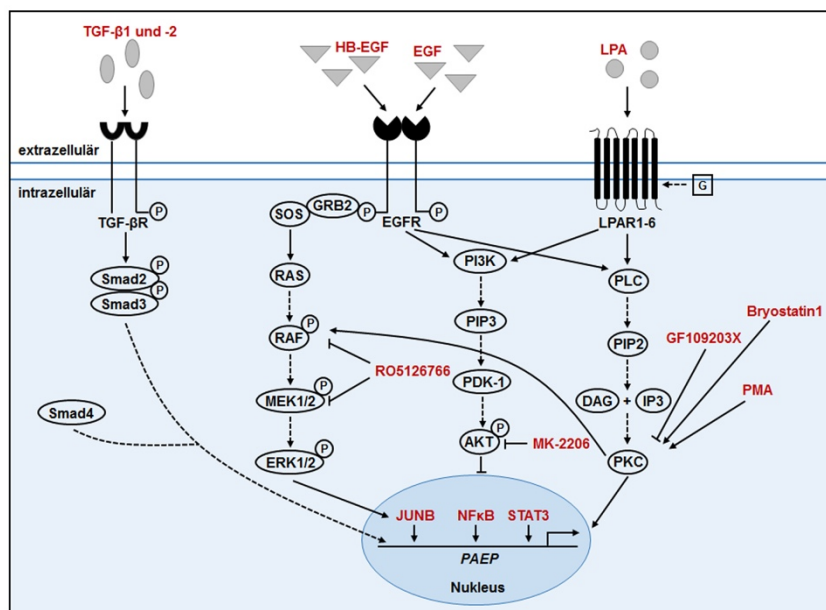


Abbildung 5.1: Zusammenfassende Übersicht über untersuchte Regulatoren der PAEP/Glycodelin-Expression

Die analysierten Regulatoren (rot) der PAEP/Glycodelin-Expression sowie deren entsprechenden Signalwege sind schematisch dargestellt. Untersuchte Einflüsse sind mit durchgehenden Linien dargestellt, während gestrichelte Linien auf Literaturdaten zurückgehen.

5.2 Die Regulation der PAEP/Glycodelin-Expression in Patientengewebe ist vergleichbar mit dem Zellkultursystem

Zellkultursysteme eignen sich um grundlegende Mechanismen *in vitro* zu analysieren. Dennoch sind weiterführende Untersuchungen im entsprechenden Organismus nötig, um die Ergebnisse aus der Zellkultur zu überprüfen. Vor allem in der Onkologie fließen dadurch weitere wichtige Faktoren wie beispielsweise Auswirkungen der Tumormikroumgebung mit ein. Deshalb wurden die im Zellkultursystem identifizierten Regulatoren der PAEP/Glycodelin-Expression in NSCLC-Patientengewebe untersucht. Dafür wurden jeweils 20 ADC- und 15 SQCC-Patientenproben mit hoher sowie niedriger PAEP-Expression (in einer vorherigen Studie mittels qPCR bestimmt [71]) miteinander verglichen. Bezüglich des Expressionsprofils von PAEP und den im Zellkultursystem identifizierten Regulatoren wurden keine deutlichen Korrelationen detektiert (Daten nicht gezeigt). Jedoch ist die Aktivierung von Signalwegen vor allem von der Phosphorylierung entsprechender Moleküle abhängig. Die Software IPA bezieht mit der Analyse vorgeschalteter Regulatoren (*upstream regulator analysis*) die Aktivität von Molekülen mit ein.

Regulatoren, die im Zellkultursystem mit einer erhöhten *PAEP*/Glycodelin-Expression assoziiert wurden, wurden ebenfalls als vorgeschaltete Regulatoren in NSCLC-Tumoren mit einer erhöhten *PAEP*-Expression identifiziert. Gemäß den Daten der Zelllinien war die Aktivität vorgeschalteter Regulatoren in SQCC-Patientenproben höher als in denen von ADCs. Allerdings waren STAT3 und TGF- β 1 in beiden NSCLC-Subtypen ähnlich stark erhöht. In der ADC-Zelllinie H1975 hatte TGF- β keinen deutlichen Einfluss auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression. Der Grund dieser Diskrepanz ist bislang nicht bekannt und liegt möglicherweise im Mutationsprofil der H1975-Zellen. Die Patientenproben sprechen somit gegen einen generellen Unterschied der ADCs und SQCCs bezüglich der Beteiligung von TGF- β an der *PAEP*/Glycodelin-Expression. Zudem war AKT in Patienten mit erhöhter *PAEP*-Expression leicht aktiviert. Wie bereits erwähnt, beeinflusst nur ein aktivierter PI3K/AKT-Signalweg, wie er in Folge von T790M (*EGFR*), L858R (*EGFR*)- und G118D (*PIK3CA*)-Mutationen [125, 133-136] in H1975-Zellen gezeigt wurde, die *PAEP*/Glycodelin-Expression. Der Mutationsstatus der Patienten des Kollektivs ist nicht bekannt, da operierte Patienten im Rahmen der Diagnostik nicht auf molekulare Alterationen untersucht werden. Allerdings lassen Studien mit Lungen-ADCs folgern, dass ein aktivierter PI3K/AKT-Signalweg nur in einem Teil des Kollektivs (circa 25 %) vorkommt [20]. Aufgrund dessen könnten sich die Ergebnisse der Zellkulturen von den Ergebnissen der Patientengewebe unterscheiden.

Gemeinsam betrachtet konnten die Daten basierend auf dem Zellkultursystem, mit Ausnahme von TGF- β und AKT in H1975-Zellen, im NSCLC-Gewebe bestätigt werden. In der ADC-Zelllinie H1975 hatte TGF- β keinen Einfluss und AKT eine reprimierende Wirkung auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression. Beide waren in Patientenproben dieses NSCLC-Subtyps mit einer hohen *PAEP*-Expression aktiviert. Aktivierende *EGFR*- und *PIK3CA*-Mutationen der H1975-Zellen könnten die Ursache für den Unterschied hinsichtlich AKT sein.

5.3 Glycodelin als ein mögliches Zielmolekül in der Behandlung von NSCLC

Das Ziel jeder NSCLC-Behandlung ist ein möglichst langes progressionsfreies Überleben oder darüber hinaus die Heilung des Patienten. Trotz der großen Fortschritte bezüglich Früherkennung und Therapie in den letzten zwei Jahrzehnten bleiben die Heilungs- und Überlebensraten beim NSCLC gering [165]. Daher sind Zielmoleküle insbesondere für eine

effektivere zielgerichtete Therapie Gegenstand der aktuellen Forschung. Die wohl erfolgreichsten medikamentösen Strategien, die derzeit zur Behandlung geeigneter NSCLC-Patienten eingesetzt werden, sind TKIs sowie Immuncheckpointinhibitoren. Unter diesen Immuncheckpointinhibitoren hat sich vor allem die Hemmung der Interaktion des T-Zellrezeptors PD-1 mit dessen Liganden PD-L1 durchgesetzt. Die Therapien verlängerten das Überleben von NSCLC-Patienten signifikant, jedoch sprechen nicht alle Patienten darauf an. Eine intakte Bindung von PD-L1 an PD-1 führt zu einer Hemmung von T-Zellen [18]. Der Tumor nutzt die Expression von PD-L1, um sich vor der körpereigenen Immunantwort zu schützen. Eine ähnliche Funktion wird ebenfalls Glycodelin zugesprochen. In einer vorherigen Studie wurde neben einer Korrelation der Serummengen von Glycodelin mit dem Ansprechen auf eine Behandlung in NSCLC-Patienten ebenso eine immunmodulatorische Wirkung in NSCLC-Zellen gezeigt [71]. Im Einklang mit der Funktion in der Etablierung der Schwangerschaft lassen diese Ergebnisse erwarten, dass einige NSCLC-Tumore Glycodelin exprimieren, um die Überwachung des Immunsystems zu umgehen. Bisher fehlen noch umfassende Analysen, welche eine Glycodelin-assoziierte Immunsuppression in Tumorzellen zeigen. Dennoch könnte Glycodelin ein Zielmolekül für medikamentöse Strategien sein, um in geeigneten Patienten die Immunabwehr von NSCLC-Tumoren zu schwächen.

In einer vorangegangenen Studie ergab das *Silencing* von *PAEP* eine vermehrte Expression nicht nur immunsystemstimulierender Faktoren wie *C-X-C motif chemokine* (CXCL)5 und CXCL16, sondern auch immunsystemsprimierender Faktoren wie *MHC class I polypeptide-related sequence B* (MICB) sowie PDL1/2 [71]. Letztere könnte in diesem Zusammenhang eine Reaktion des Tumors sein, um die fehlende *PAEP*-Expression und die damit fehlende immunsuppressive Funktion auszugleichen. Da tumorinfiltrierende Lymphozyten mit einem verbesserten Überleben von NSCLC-Patienten assoziiert wurden [166], könnte eine Kombination aus PD-L1- und Glycodelin-Inhibitoren eine noch effektivere Immuntherapie für geeignete NSCLC-Patienten darstellen.

In dieser Arbeit wurden mehrere Signalwege gezeigt, welche die *PAEP*/Glycodelin-Expression in NSCLC regulieren. Einige davon werden bereits von zugelassenen oder in klinischen Studien verwendeten Medikamenten adressiert. Gemäß den vorherigen Experimenten würde ein für die Therapie von NSCLC-Patienten oftmals verwendeter EGFR-TKI durch die Inhibierung des MEK/ERK-Signalweges die Expression von *PAEP*/Glycodelin hemmen. Sowohl MEK/ERK als auch nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren wirkten stimulierend auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression. Eine Ausnahme diesbezüglich scheinen Mutationen innerhalb des *EGFR*- und *PIK3CA*-Gens zu

sein, denn in H1975-Zellen beeinflusste der EGFR-TKI AZD9291 die *PAEP*/Glycodelin-Expression nicht. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass gemeinsam mit dem MEK/ERK-Signalweg auch die antagonistisch wirkende PI3K/AKT-Signalkaskade reprimiert wurde.

2017 zeigten Planchard et al. durch die Kombination des BRAF-Inhibitors Dabrafenib und des MEK-Inhibitors Trametinib eine neue zielgerichtete Therapie für NSCLC-Patienten mit einer BRAF-V600E-Mutation [167]. Diese Inhibitoren hemmen den MEK/ERK-Signalweg [168], der in Folge der Mutation aktiviert ist. Die hier gezeigten Ergebnisse geben Hinweise, dass diese Medikation die *PAEP*/Glycodelin-Expression vermindern könnte.

Zurzeit sind verschiedene PI3K- und AKT-Inhibitoren in klinischer Entwicklung [169, 170]. Entsprechend den Daten dieser Arbeit würde eine Behandlung von Patienten mit einer *EGFR*- und *PIK3CA*-mutationsbedingten Aktivierung von AKT die Expression von *PAEP*/Glycodelin erhöhen und somit den immunsuppressiven Effekt der Tumorzellen unterstützen.

In Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit werden bereits einige Medikamente in der Therapie von NSCLC-Patienten angewendet, welche die *PAEP*/Glycodelin-Expression und damit ebenso die immunsuppressive Wirkung des Proteins beeinflussen könnten.

5.4 Schlussfolgerung

Das Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung von Signalwegen, die an Regulation der Gen- und Proteinexpression von *PAEP*/Glycodelin im NSCLC beteiligt sind. Für die Analysen wurden NSCLC-Zelllinien verwendet und die Ergebnisse in Patientenproben validiert.

Dementsprechend wurden einige Regulatoren der *PAEP*/Glycodelin-Expression in ADC- und SQCC-Zelllinien identifiziert. Die *PAEP*/Glycodelin-Expression wurde hauptsächlich durch den kanonischen TGF- β -Signalweg in SQCC-Zellen stimuliert sowie durch die PKC-Signalkaskade in beiden Zelllinien. Des Weiteren wurde eine etwas schwächere Induktion der *PAEP*/Glycodelin-Expression mit dem MEK/ERK-Signalweg assoziiert. Der PI3K/AKT-Signalweg inhibierte die Expression von *PAEP*/Glycodelin in ADC-Zellen mit aktivierenden *EGFR*- und *PIK3CA*-Mutationen und lässt auf einen antagonistischen Einfluss gegenüber den anderen untersuchten Signalwegen schließen. Diese Ergebnisse wurden größtenteils in den NSCLC-Patientenproben bestätigt. Die Unterschiede zwischen der ADC-Zelllinie und dem ADC-Patientengewebe bezüglich der Aktivierung von AKT sprechen jedoch für einen Einfluss aktivierender *EGFR*- und *PIK3CA*-Mutationen.

Sowohl der MEK/ERK- als auch der PI3K/AKT-Signalweg werden von verschiedenen NSCLC-Medikamenten adressiert. Die hier gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Inhibierung spezifischer Signalwege die Expression von Glycodelin und dadurch ebenso den immunsuppressiven Einfluss dieses Proteins mutationsabhängig in NSCLC-Patienten beeinflussen könnte. Zudem werden Hinweise für therapeutische Ansätze geboten, um die Immunabwehr Glycodelin-exprimierender NSCLC-Tumoren zu schwächen. Dafür sind jedoch weitere Kenntnisse über die Regulation und die Rolle von Glycodelin im NSCLC erforderlich.

5.5 Ausblick

Nachdem diese Arbeit einen ersten Überblick über Regulatoren der *PAEP*/Glycodelin-Expression im NSCLC bietet, wäre es interessant, in zukünftigen Analysen einige Ergebnisse weiter zu vertiefen und zusätzlich die immunsuppressive Funktion von Glycodelin zu adressieren.

Im Gegensatz zu NSCLC-Tumoren konnten Schneider et al. Glycodelin in nur wenigen Lungenkarzinomzelllinien nachweisen [71]. Da Glycodelin einen immunsuppressiven Einfluss hat, wird vermutlich die Expression von *PAEP*/Glycodelin in der Abwesenheit von Immunzellen reduziert. Dies deutet auf eine wichtige Rolle der Tumormikroumgebung in der *PAEP*/Glycodelin-Expression hin. Aufgrund dessen wäre es interessant in ergänzenden Analysen die Regulation der *PAEP*/Glycodelin-Expression im Kontext der Tumormikroumgebung näher zu untersuchen. Kokulturrexperimente mit einer Glycodelin-exprimierenden Zelllinie und Fibroblasten könnten diesbezüglich nähere Einblicke bieten. Zudem ist es bekannt, dass Fibroblasten Zytokine, wie unter anderem TGF- β , sekretieren [164]. Da in 2106T-Zellen bereits ein Einfluss ausgehend von TGF- β auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression nachgewiesen wurde, ist hierbei ein starker Effekt zu erwarten. In diesem Zusammenhang könnten zusätzlich die beobachteten Unterschiede zwischen H1975- und 2106T-Zellen bezüglich der TGF- β -assoziierten *PAEP*/Glycodelin-Expression adressiert werden. Zudem würden sich Kokulturrexperimente mit einer Glycodelin-exprimierenden Zelllinie und Immunzellen anbieten.

Weiterhin legen die Unterschiede zwischen der ADC-Zelllinie H1975 und der SQCC-Zelllinie 2106T nahe, dass aktivierende *EGFR*- und *PIK3CA*-Mutationen die Expression von *PAEP*/Glycodelin beeinflussen könnten. Somit wäre es interessant, einige der durchgeführten Analysen auf weitere Lungen-ADC-Zelllinien ohne diese spezifischen Mutationen auszuweiten. Dies war bisher aufgrund des Mangels einer adäquaten Zelllinie

nicht möglich. In der Zwischenzeit konnte jedoch aus primären Tumorzellen eine permanente Zelllinie, die Glycodelin exprimiert und keine *EGFR*- oder *PIK3CA*-Mutation enthält, etabliert werden.

Die Hypothese, dass NSCLC-Tumore Glycodelin exprimieren, um der körpereigenen Immunabwehr zu entgehen, rückt die Verwendung dieses Proteins als Zielmolekül in der NSCLC-Therapie in den Fokus. EGFR oder verschiedene intrazelluläre Signalwege, deren Einfluss auf die *PAEP*/Glycodelin-Expression hier gezeigt wurde, werden von bereits angewendeten NSCLC-Medikamenten wie Gefitinib, Erlotinib (EGFR-TKI) sowie einer Kombination aus Dabrafenib (BRAF-Inhibitor) und Trametinib (MEK-Inhibitor) inhibiert. Somit liegt es nahe, den konkreten Einfluss dieser Medikamente auf die Expression von *PAEP*/Glycodelin in NSCLC-Zelllinien zu evaluieren.

In vorherigen Analysen wurde postuliert, dass das *Silencing* von *PAEP* in NSCLC-Zelllinien zu einer erhöhten Expression immunsystemregulierender Liganden führt [71]. Allerdings fehlen Studien, die diese Ergebnisse ausreichend belegen. Daher sind weitere Untersuchungen nötig, um Glycodelin als Zielmolekül für NSCLC-Therapien begründen zu können.

6 Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: **Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.** *Int J Cancer* 2015, **136**(5):E359-386.
2. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P: **Risk factors for lung cancer worldwide.** *Eur Respir J* 2016, **48**(3):889-902.
3. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ: **The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke.** *BMJ* 1997, **315**(7114):980-988.
4. Samet JM, Eradze GR: **Radon and lung cancer risk: taking stock at the millenium.** *Environ Health Perspect* 2000, **108 Suppl 4**:635-641.
5. Doll R: **Mortality from lung cancer in asbestos workers 1955.** *Br J Ind Med* 1993, **50**(6):485-490.
6. Nielsen LS, Baelum J, Rasmussen J, Dahl S, Olsen KE, Albin M, Hansen NC, Sherson D: **Occupational asbestos exposure and lung cancer--a systematic review of the literature.** *Arch Environ Occup Health* 2014, **69**(4):191-206.
7. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, Hoffmann B, Fischer P, Nieuwenhuijsen MJ, Brunekreef B *et al*: **Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE).** *Lancet Oncol* 2013, **14**(9):813-822.
8. Loomis D, Huang W, Chen G: **The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China.** *Chin J Cancer* 2014, **33**(4):189-196.
9. Cote ML, Liu M, Bonassi S, Neri M, Schwartz AG, Christiani DC, Spitz MR, Muscat JE, Rennert G, Aben KK *et al*: **Increased risk of lung cancer in individuals with a family history of the disease: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium.** *Eur J Cancer* 2012, **48**(13):1957-1968.
10. Davidson MR, Gazdar AF, Clarke BE: **The pivotal role of pathology in the management of lung cancer.** *J Thorac Dis* 2013, **5 Suppl 5**:S463-478.
11. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM: **Lung cancer.** *N Engl J Med* 2008, **359**(13):1367-1380.
12. Pillai RN, Ramalingam SS: **The biology and clinical features of non-small cell lung cancers with EML4-ALK translocation.** *Curr Oncol Rep* 2012, **14**(2):105-110.
13. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R *et al*: **ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers.** *J Clin Oncol* 2012, **30**(8):863-870.
14. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I *et al*: **Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR.** *N Engl J Med* 2010, **362**(25):2380-2388.
15. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, Riely GJ, Varella-Garcia M, Shapiro GI, Costa DB *et al*: **Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer.** *N Engl J Med* 2014, **371**(21):1963-1971.
16. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crino L, Ahn MJ, De Pas T, Besse B, Solomon BJ, Blackhall F *et al*: **Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer.** *N Engl J Med* 2013, **368**(25):2385-2394.
17. Johnson DB, Rieth MJ, Horn L: **Immune checkpoint inhibitors in NSCLC.** *Curr Treat Options Oncol* 2014, **15**(4):658-669.

18. El-Osta H, Shahid K, Mills GM, Peddi P: **Immune checkpoint inhibitors: the new frontier in non-small-cell lung cancer treatment.** *Onco Targets Ther* 2016, **9**:5101-5116.
19. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, Fulop A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S *et al*: **Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer.** *N Engl J Med* 2016, **375**(19):1823-1833.
20. Cancer Genome Atlas Research N: **Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma.** *Nature* 2014, **511**(7511):543-550.
21. Gazdar AF: **Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors.** *Oncogene* 2009, **28** Suppl 1:S24-31.
22. da Cunha Santos G, Shepherd FA, Tsao MS: **EGFR mutations and lung cancer.** *Annu Rev Pathol* 2011, **6**:49-69.
23. Gridelli C, Bareschino MA, Schettino C, Rossi A, Maione P, Ciardiello F: **Erlotinib in non-small cell lung cancer treatment: current status and future development.** *Oncologist* 2007, **12**(7):840-849.
24. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, Seto T, Satouchi M, Tada H, Hirashima T *et al*: **Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial.** *Lancet Oncol* 2010, **11**(2):121-128.
25. Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu XQ, Wang C, Zhang S, Wang J, Zhou S, Ren S *et al*: **Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study.** *Lancet Oncol* 2011, **12**(8):735-742.
26. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG, Halmos B: **EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib.** *N Engl J Med* 2005, **352**(8):786-792.
27. Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, Woo MS, Greulich H, Wong KK, Meyerson M, Eck MJ: **The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(6):2070-2075.
28. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H *et al*: **Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer.** *Nature* 2007, **448**(7153):561-566.
29. Shaw AT, Solomon B: **Targeting anaplastic lymphoma kinase in lung cancer.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(8):2081-2086.
30. Brambilla E, Gazdar A: **Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies.** *Eur Respir J* 2009, **33**(6):1485-1497.
31. Patricelli MP, Janes MR, Li LS, Hansen R, Peters U, Kessler LV, Chen Y, Kucharski JM, Feng J, Ely T *et al*: **Selective Inhibition of Oncogenic KRAS Output with Small Molecules Targeting the Inactive State.** *Cancer Discov* 2016, **6**(3):316-329.
32. Scheffler M, Bos M, Gardizi M, Konig K, Michels S, Fassunke J, Heydt C, Kunstlinger H, Ihle M, Ueckerth F *et al*: **PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies.** *Oncotarget* 2015, **6**(2):1315-1326.
33. Vansteenkiste JF, Canon JL, De Braud F, Grossi F, De Pas T, Gray JE, Su WC, Felip E, Yoshioka H, Gridelli C *et al*: **Safety and Efficacy of Buparlisib (BKM120) in Patients with PI3K Pathway-Activated Non-Small Cell Lung Cancer: Results from the Phase II BASALT-1 Study.** *J Thorac Oncol* 2015, **10**(9):1319-1327.

34. Petrunin DD, Griaznova IM, Petrunina Iu A, Tatarinov Iu S: **[Immunochemical identification of organ specific human placental alpha-globulin and its concentration in amniotic fluid]**. *Akush Ginekol (Mosk)* 1977(1):62-64.
35. Petrunin DD, Kozliaeva GA, Mesnianskina NV, Shevchenko OP: **[Detection of chorionic alpha 2-microglobulin in the endometrium in the secretory phase of the menstrual cycle and in male sperm]**. *Akush Ginekol (Mosk)* 1980(3):22-23.
36. Horne CH, Paterson WF, Sutcliffe RG: **Localization of alpha-uterine protein in human endometrium**. *J Reprod Fertil* 1982, **65**(2):447-450.
37. Bohn H, Kraus W, Winckler W: **New soluble placental tissue proteins: their isolation, characterization, localization and quantification**. *Placenta Suppl* 1982, **4**:67-81.
38. Joshi SG, Ebert KM, Swartz DP: **Detection and synthesis of a progestagen-dependent protein in human endometrium**. *J Reprod Fertil* 1980, **59**(2):273-285.
39. Joshi SG, Henriques ES, Smith RA, Szarowski DH: **Progestogen-dependent endometrial protein in women: tissue concentration in relation to developmental stage and to serum hormone levels**. *Am J Obstet Gynecol* 1980, **138**(8):1131-1136.
40. Bell SC, Patel S, Hales MW, Kirwan PH, Drife JO: **Immunochemical detection and characterization of pregnancy-associated endometrial alpha 1- and alpha 2-globulins secreted by human endometrium and decidua**. *J Reprod Fertil* 1985, **74**(1):261-270.
41. Huhtala ML, Seppala M, Narvanen A, Palomaki P, Julkunen M, Bohn H: **Amino acid sequence homology between human placental protein 14 and beta-lactoglobulins from various species**. *Endocrinology* 1987, **120**(6):2620-2622.
42. Seppala M, Taylor RN, Koistinen H, Koistinen R, Milgrom E: **Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation**. *Endocr Rev* 2002, **23**(4):401-430.
43. Kamarainen M, Julkunen M, Seppala M: **Hinfl polymorphism in the human progesterone associated endometrial protein (PAEP) gene**. *Nucleic Acids Res* 1991, **19**(18):5092.
44. Dell A, Morris HR, Easton RL, Panico M, Patankar M, Oehninger S, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Clark GF: **Structural analysis of the oligosaccharides derived from glycodelin, a human glycoprotein with potent immunosuppressive and contraceptive activities**. *J Biol Chem* 1995, **270**(41):24116-24126.
45. Kontopidis G, Holt C, Sawyer L: **Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function**. *J Dairy Sci* 2004, **87**(4):785-796.
46. Schiefner A, Rodewald F, Neumaier I, Skerra A: **The dimeric crystal structure of the human fertility lipocalin glycodelin reveals a protein scaffold for the presentation of complex glycans**. *Biochem J* 2015, **466**(1):95-104.
47. Morris HR, Dell A, Easton RL, Panico M, Koistinen H, Koistinen R, Oehninger S, Patankar MS, Seppala M, Clark GF: **Gender-specific glycosylation of human glycodelin affects its contraceptive activity**. *J Biol Chem* 1996, **271**(50):32159-32167.
48. Chiu PC, Chung MK, Tsang HY, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Lee KF, Yeung WS: **Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa**. *J Biol Chem* 2005, **280**(27):25580-25589.
49. Kolbl AC, Jeschke U, Dian D, Friese K, Andergassen U: **Glycodelin A - a famous lipocalin and its role in breast cancer**. *Anticancer Res* 2014, **34**(3):1079-1085.
50. Julkunen M, Koistinen R, Sjoberg J, Rutanen EM, Wahlstrom T, Seppala M: **Secretory endometrium synthesizes placental protein 14**. *Endocrinology* 1986, **118**(5):1782-1786.
51. Li TC, Dalton C, Hunjan KS, Warren MA, Bolton AE: **The correlation of placental protein 14 concentrations in uterine flushing and endometrial morphology in the peri-implantation period**. *Hum Reprod* 1993, **8**(11):1923-1927.
52. Uchida H, Maruyama T, Nishikawa-Uchida S, Miyazaki K, Masuda H, Yoshimura Y: **Glycodelin in reproduction**. *Reproductive Medicine and Biology* 2013, **12**(3):79-84.

53. Oehninger S, Coddington CC, Hodgen GD, Seppala M: **Factors affecting fertilization: endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida.** *Fertil Steril* 1995, **63**(2):377-383.
54. Okamoto N, Uchida A, Takakura K, Kariya Y, Kanzaki H, Riittinen L, Koistinen R, Seppala M, Mori T: **Suppression by human placental protein 14 of natural killer cell activity.** *Am J Reprod Immunol* 1991, **26**(4):137-142.
55. Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, Giudice LC: **Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation.** *Endocrinology* 2002, **143**(6):2119-2138.
56. Julkunen M, Rutanen EM, Koskimies A, Ranta T, Bohn H, Seppala M: **Distribution of placental protein 14 in tissues and body fluids during pregnancy.** *Br J Obstet Gynaecol* 1985, **92**(11):1145-1151.
57. Bersinger NA, Birkhauser MH, Yared M, Wunder DM: **Serum glycodelin pattern during the menstrual cycle in healthy young women.** *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009, **88**(11):1215-1221.
58. Chiu PC, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Lee KF, Yeung WS: **Zona-binding inhibitory factor-1 from human follicular fluid is an isoform of glycodelin.** *Biol Reprod* 2003, **69**(1):365-372.
59. Chiu PC, Chung MK, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Ho PC, Ng EH, Lee KF, Yeung WS: **Cumulus oophorus-associated glycodelin-C displaces sperm-bound glycodelin-A and -F and stimulates spermatozoa-zona pellucida binding.** *J Biol Chem* 2007, **282**(8):5378-5388.
60. Tulppala M, Julkunen M, Tiitinen A, Stenman UH, Seppala M: **Habitual abortion is accompanied by low serum levels of placental protein 14 in the luteal phase of the fertile cycle.** *Fertil Steril* 1995, **63**(4):792-795.
61. Tomczak S, Briese V, Kunkel S, Muller H: **Serum placental protein 14 (PP14) levels in patients with threatened abortion.** *Arch Gynecol Obstet* 1996, **258**(4):165-169.
62. Mackenna A, Li TC, Dalton C, Bolton A, Cooke I: **Placental protein 14 levels in uterine flushing and plasma of women with unexplained infertility.** *Fertil Steril* 1993, **59**(3):577-582.
63. Kamarainen M, Halttunen M, Koistinen R, von Boguslawsky K, von Smitten K, Andersson LC, Seppala M: **Expression of glycodelin in human breast and breast cancer.** *Int J Cancer* 1999, **83**(6):738-742.
64. Hackenberg R, Loos S, Nia AH, Kunzmann R, Schulz KD: **Expression of placental protein 14 by the new endometrial cancer cell line MFE-280 in vitro and by endometrial carcinomas in vivo.** *Anticancer Res* 1998, **18**(2A):1153-1158.
65. Kamarainen M, Leivo I, Koistinen R, Julkunen M, Karvonen U, Rutanen EM, Seppala M: **Normal human ovary and ovarian tumors express glycodelin, a glycoprotein with immunosuppressive and contraceptive properties.** *Am J Pathol* 1996, **148**(5):1435-1443.
66. Connor JP, Brudney A, Ferrer K, Fazleabas AT: **Glycodelin-A expression in the uterine cervix.** *Gynecol Oncol* 2000, **79**(2):216-219.
67. Kamarainen M, Miettinen M, Seppala M, von Boguslawsky K, Benassi MS, Bohling T, Andersson LC: **Epithelial expression of glycodelin in biphasic synovial sarcomas.** *Int J Cancer* 1998, **76**(4):487-490.
68. Ren S, Liu S, Howell PM, Jr., Zhang G, Pannell L, Samant R, Shevde-Samant L, Tucker JA, Fodstad O, Riker AI: **Functional characterization of the progesterone-associated endometrial protein gene in human melanoma.** *J Cell Mol Med* 2010, **14**(6B):1432-1442.

-
69. Schneider MA, Muley T, Kahn NC, Warth A, Thomas M, Herth FJ, Dienemann H, Meister M: **Glycodelin is a potential novel follow-up biomarker for malignant pleural mesothelioma.** *Oncotarget* 2016, **7**(44):71285-71297.
70. Kunert-Keil C, Steinmuller F, Jeschke U, Gredes T, Gedrange T: **Immunolocalization of glycodelin in human adenocarcinoma of the lung, squamous cell carcinoma of the lung and lung metastases of colonic adenocarcinoma.** *Acta Histochem* 2011, **113**(8):798-802.
71. Schneider MA, Granzow M, Warth A, Schnabel PA, Thomas M, Herth FJ, Dienemann H, Muley T, Meister M: **Glycodelin: A New Biomarker with Immunomodulatory Functions in Non-Small Cell Lung Cancer.** *Clin Cancer Res* 2015, **21**(15):3529-3540.
72. Hautala LC, Greco D, Koistinen R, Heikkinen T, Heikkila P, Aittomaki K, Blomqvist C, Koistinen H, Nevanlinna H: **Glycodelin expression associates with differential tumour phenotype and outcome in sporadic and familial non-BRCA1/2 breast cancer patients.** *Breast Cancer Res Treat* 2011, **128**(1):85-95.
73. Shabani N, Mylonas I, Kunert-Keil C, Briese V, Janni W, Gerber B, Friese K, Jeschke U: **Expression of glycodelin in human breast cancer: immunohistochemical analysis in mammary carcinoma in situ, invasive carcinomas and their lymph node metastases.** *Anticancer Res* 2005, **25**(3A):1761-1764.
74. Jeschke U, Mylonas I, Kunert-Keil C, Dazert E, Shabani N, Werling M, Kuhn C, Janni W, Gerber B, Friese K: **Expression of glycodelin protein and mRNA in human ductal breast cancer carcinoma in situ, invasive ductal carcinomas, their lymph node and distant metastases, and ductal carcinomas with recurrence.** *Oncol Rep* 2005, **13**(3):413-419.
75. Horowitz IR, Cho C, Song M, Flowers LC, Santanam N, Parthasarathy S, Ramachandran S: **Increased glycodelin levels in gynecological malignancies.** *Int J Gynecol Cancer* 2001, **11**(3):173-179.
76. Lenhard M, Heublein S, Kunert-Keil C, Vrekoussis T, Lomba I, Ditsch N, Mayr D, Friese K, Jeschke U: **Immunosuppressive Glycodelin A is an independent marker for poor prognosis in endometrial cancer.** *BMC Cancer* 2013, **13**:616.
77. Richter C, Baetje M, Bischof A, Makovitzky J, Richter DU, Gerber B, Briese V: **Expression of the glycodelin A gene and the detection of its protein in tissues and serum of ovarian carcinoma patients.** *Anticancer Res* 2007, **27**(4A):2023-2025.
78. Riittinen L: **Serous ovarian cyst fluids contain high levels of endometrial placental protein 14.** *Tumour Biol* 1992, **13**(3):175-179.
79. Scholz C, Heublein S, Lenhard M, Friese K, Mayr D, Jeschke U: **Glycodelin A is a prognostic marker to predict poor outcome in advanced stage ovarian cancer patients.** *BMC Res Notes* 2012, **5**:551.
80. Bischof A, Briese V, Richter DU, Bergemann C, Friese K, Jeschke U: **Measurement of glycodelin A in fluids of benign ovarian cysts, borderline tumours and malignant ovarian cancer.** *Anticancer Res* 2005, **25**(3A):1639-1644.
81. Mandelin E, Lassus H, Seppala M, Leminen A, Gustafsson JA, Cheng G, Butzow R, Koistinen R: **Glycodelin in ovarian serous carcinoma: association with differentiation and survival.** *Cancer Res* 2003, **63**(19):6258-6264.
82. Cui J, Liu Y, Wang X: **The Roles of Glycodelin in Cancer Development and Progression.** *Front Immunol* 2017, **8**:1685.
83. Ren S, Howell PM, Jr., Han Y, Wang J, Liu M, Wang Y, Quan G, Du W, Fang L, Riker AI: **Overexpression of the progestagen-associated endometrial protein gene is associated with microphthalmia-associated transcription factor in human melanoma.** *Ochsner J* 2011, **11**(3):212-219.
84. Koistinen H, Seppala M, Nagy B, Tapper J, Knuutila S, Koistinen R: **Glycodelin reduces carcinoma-associated gene expression in endometrial adenocarcinoma cells.** *Am J Obstet Gynecol* 2005, **193**(6):1955-1960.
-

85. Ohta K, Maruyama T, Uchida H, Ono M, Nagashima T, Arase T, Kajitani T, Oda H, Morita M, Yoshimura Y: **Glycodelin blocks progression to S phase and inhibits cell growth: a possible progesterone-induced regulator for endometrial epithelial cell growth.** *Mol Hum Reprod* 2008, **14**(1):17-22.
86. Hautala LC, Koistinen R, Koistinen H: **Repressed PKCdelta activation in glycodelin-expressing cells mediates resistance to phorbol ester and TGFbeta.** *Cell Signal* 2016, **28**(10):1463-1469.
87. Kamarainen M, Seppala M, Virtanen I, Andersson LC: **Expression of glycodelin in MCF-7 breast cancer cells induces differentiation into organized acinar epithelium.** *Lab Invest* 1997, **77**(6):565-573.
88. Hautala LC, Koistinen R, Seppala M, Butzow R, Stenman UH, Laakkonen P, Koistinen H: **Glycodelin reduces breast cancer xenograft growth in vivo.** *Int J Cancer* 2008, **123**(10):2279-2284.
89. Song M, Ramaswamy S, Ramachandran S, Flowers LC, Horowitz IR, Rock JA, Parthasarathy S: **Angiogenic role for glycodelin in tumorigenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(16):9265-9270.
90. Lee CL, Pang PC, Yeung WS, Tissot B, Panico M, Lao TT, Chu IK, Lee KF, Chung MK, Lam KK *et al*: **Effects of differential glycosylation of glycodelins on lymphocyte survival.** *J Biol Chem* 2009, **284**(22):15084-15096.
91. Mishan-Eisenberg G, Borovsky Z, Weber MC, Gazit R, Tykocinski ML, Rachmilewitz J: **Differential regulation of Th1/Th2 cytokine responses by placental protein 14.** *J Immunol* 2004, **173**(9):5524-5530.
92. Lee CL, Chiu PC, Lam KK, Siu SO, Chu IK, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Lee KF, Yeung WS: **Differential actions of glycodelin-A on Th-1 and Th-2 cells: a paracrine mechanism that could produce the Th-2 dominant environment during pregnancy.** *Hum Reprod* 2011, **26**(3):517-526.
93. Soni C, Karande AA: **Glycodelin A suppresses the cytolytic activity of CD8+ T lymphocytes.** *Mol Immunol* 2010, **47**(15):2458-2466.
94. Yaniv E, Borovsky Z, Mishan-Eisenberg G, Rachmilewitz J: **Placental protein 14 regulates selective B cell responses.** *Cell Immunol* 2003, **222**(2):156-163.
95. Lee CL, Chiu PC, Lam KK, Chan RW, Chu IK, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Lee KF, Yeung WS: **Glycodelin-A modulates cytokine production of peripheral blood natural killer cells.** *Fertil Steril* 2010, **94**(2):769-771.
96. Scholz C, Toth B, Brunnhuber R, Rampf E, Weissenbacher T, Santoso L, Friese K, Jeschke U: **Glycodelin A induces a tolerogenic phenotype in monocyte-derived dendritic cells in vitro.** *Am J Reprod Immunol* 2008, **60**(6):501-512.
97. Mukhopadhyay D, Sundereshan S, Rao C, Karande AA: **Placental protein 14 induces apoptosis in T cells but not in monocytes.** *J Biol Chem* 2001, **276**(30):28268-28273.
98. Alok A, Mukhopadhyay D, Karande AA: **Glycodelin A, an immunomodulatory protein in the endometrium, inhibits proliferation and induces apoptosis in monocytic cells.** *Int J Biochem Cell Biol* 2009, **41**(5):1138-1147.
99. Lee CL, Lam EY, Lam KK, Koistinen H, Seppala M, Ng EH, Yeung WS, Chiu PC: **Glycodelin-A stimulates interleukin-6 secretion by human monocytes and macrophages through L-selectin and the extracellular signal-regulated kinase pathway.** *J Biol Chem* 2012, **287**(44):36999-37009.
100. Laird SM, Hill CJ, Warren MA, Tuckerman EM, Li TC: **The production of placental protein 14 by human uterine tubal epithelial cells in culture.** *Hum Reprod* 1995, **10**(6):1346-1351.
101. Seppala M, Koistinen H, Koistinen R, Hautala L, Chiu PC, Yeung WS: **Glycodelin in reproductive endocrinology and hormone-related cancer.** *Eur J Endocrinol* 2009, **160**(2):121-133.

102. Fazleabas AT, Donnelly KM, Srinivasan S, Fortman JD, Miller JB: **Modulation of the baboon (*Papio anubis*) uterine endometrium by chorionic gonadotrophin during the period of uterine receptivity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(5):2543-2548.
103. Toth B, Roth K, Kunert-Keil C, Scholz C, Schulze S, Mylonas I, Friese K, Jeschke U: **Glycodelin protein and mRNA is downregulated in human first trimester abortion and partially upregulated in mole pregnancy.** *J Histochem Cytochem* 2008, **56**(5):477-485.
104. Tseng L, Zhu HH, Mazella J, Koistinen H, Seppala M: **Relaxin stimulates glycodelin mRNA and protein concentrations in human endometrial glandular epithelial cells.** *Mol Hum Reprod* 1999, **5**(4):372-375.
105. Morrow DM, Xiong N, Getty RR, Ratajczak MZ, Morgan D, Seppala M, Riittinen L, Gewirtz AM, Tykocinski ML: **Hematopoietic placental protein 14. An immunosuppressive factor in cells of the megakaryocytic lineage.** *Am J Pathol* 1994, **145**(6):1485-1495.
106. Ramachandran S, Ramaswamy S, Cho C, Parthasarathy S: **Lysophosphatidic acid induces glycodelin gene expression in cancer cells.** *Cancer Lett* 2002, **177**(2):197-202.
107. Bazzi MD, Nelsestuen GL: **Differences in the effects of phorbol esters and diacylglycerols on protein kinase C.** *Biochemistry* 1989, **28**(24):9317-9323.
108. Sando JJ, Chertihin OI: **Activation of protein kinase C by lysophosphatidic acid: dependence on composition of phospholipid vesicles.** *Biochem J* 1996, **317** (Pt 2):583-588.
109. Xu JW, Yasui N, Ikeda K, Pan WJ, Watanabe J, Shiotani M, Yanaihara A, Miki T, Yamori Y: **Isoflavones regulate secretion of leukemia inhibitory factor and transforming growth factor {beta} and expression of glycodelin in human endometrial epithelial cells.** *J Endocrinol* 2008, **196**(2):425-433.
110. Dydensborg AB, Rose AA, Wilson BJ, Grote D, Paquet M, Giguere V, Siegel PM, Bouchard M: **GATA3 inhibits breast cancer growth and pulmonary breast cancer metastasis.** *Oncogene* 2009, **28**(29):2634-2642.
111. Gao J, Mazella J, Seppala M, Tseng L: **Ligand activated hPR modulates the glycodelin promoter activity through the Sp1 sites in human endometrial adenocarcinoma cells.** *Mol Cell Endocrinol* 2001, **176**(1-2):97-102.
112. Tabbaa ZM, Zheng Y, Daftary GS: **KLF11 epigenetically regulates glycodelin-A, a marker of endometrial biology via histone-modifying chromatin mechanisms.** *Reprod Sci* 2014, **21**(3):319-328.
113. Uchida H, Maruyama T, Ono M, Ohta K, Kajitani T, Masuda H, Nagashima T, Arase T, Asada H, Yoshimura Y: **Histone deacetylase inhibitors stimulate cell migration in human endometrial adenocarcinoma cells through up-regulation of glycodelin.** *Endocrinology* 2007, **148**(2):896-902.
114. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D: **The human genome browser at UCSC.** *Genome Res* 2002, **12**(6):996-1006.
115. Gottschling S, Jauch A, Kuner R, Herpel E, Mueller-Decker K, Schnabel PA, Xu EC, Muley T, Sultmann H, Bender C *et al*: **Establishment and comparative characterization of novel squamous cell non-small cell lung cancer cell lines and their corresponding tumor tissue.** *Lung Cancer* 2012, **75**(1):45-57.
116. Nelson TJ, Alkon DL: **Neuroprotective versus tumorigenic protein kinase C activators.** *Trends Biochem Sci* 2009, **34**(3):136-145.
117. Kortmansky J, Schwartz GK: **Bryostatins: a novel PKC inhibitor in clinical development.** *Cancer Invest* 2003, **21**(6):924-936.
118. Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F *et al*: **The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C.** *J Biol Chem* 1991, **266**(24):15771-15781.

119. Ishii N, Harada N, Joseph EW, Ohara K, Miura T, Sakamoto H, Matsuda Y, Tomii Y, Tachibana-Kondo Y, Ikura H *et al*: **Enhanced inhibition of ERK signaling by a novel allosteric MEK inhibitor, CH5126766, that suppresses feedback reactivation of RAF activity.** *Cancer Res* 2013, **73**(13):4050-4060.
120. Cross DA, Ashton SE, Ghiorghiu S, Eberlein C, Nebhan CA, Spitzler PJ, Orme JP, Finlay MR, Ward RA, Mellor MJ *et al*: **AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer.** *Cancer Discov* 2014, **4**(9):1046-1061.
121. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL *et al*: **The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.** *Clin Chem* 2009, **55**(4):611-622.
122. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
123. Ghosh S, Baltimore D: **Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B.** *Nature* 1990, **344**(6267):678-682.
124. de Groot RP, Auwerx J, Karperien M, Staels B, Kruijer W: **Activation of junB by PKC and PKA signal transduction through a novel cis-acting element.** *Nucleic Acids Res* 1991, **19**(4):775-781.
125. Wee P, Wang Z: **Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways.** *Cancers (Basel)* 2017, **9**(5).
126. Mauviel A, Qiu Chen Y, Dong W, Evans CH, Uitto J: **Transcriptional interactions of transforming growth-factor-beta with pro-inflammatory cytokines.** *Curr Biol* 1993, **3**(12):822-831.
127. Zhang YE: **Non-Smad pathways in TGF-beta signaling.** *Cell Res* 2009, **19**(1):128-139.
128. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW: **Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling.** *Exp Cell Res* 2003, **284**(1):31-53.
129. Riaz A, Huang Y, Johansson S: **G-Protein-Coupled Lysophosphatidic Acid Receptors and Their Regulation of AKT Signaling.** *Int J Mol Sci* 2016, **17**(2):215.
130. Holland WS, Chinn DC, Lara PN, Jr., Gandara DR, Mack PC: **Effects of AKT inhibition on HGF-mediated erlotinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2015, **141**(4):615-626.
131. Griner EM, Kazanietz MG: **Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**(4):281-294.
132. Wada M, Horinaka M, Yamazaki T, Katoh N, Sakai T: **The dual RAF/MEK inhibitor CH5126766/RO5126766 may be a potential therapy for RAS-mutated tumor cells.** *PLoS One* 2014, **9**(11):e113217.
133. Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J: **Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways.** *Science* 2004, **305**(5687):1163-1167.
134. Tracy S, Mukohara T, Hansen M, Meyerson M, Johnson BE, Janne PA: **Gefitinib induces apoptosis in the EGFR L858R non-small-cell lung cancer cell line H3255.** *Cancer Res* 2004, **64**(20):7241-7244.
135. Burke JE, Perisic O, Masson GR, Vadas O, Williams RL: **Oncogenic mutations mimic and enhance dynamic events in the natural activation of phosphoinositide 3-kinase p110alpha (PIK3CA).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**(38):15259-15264.
136. Orloff MS, He X, Peterson C, Chen F, Chen JL, Mester JL, Eng C: **Germline PIK3CA and AKT1 mutations in Cowden and Cowden-like syndromes.** *Am J Hum Genet* 2013, **92**(1):76-80.
137. Whale AD, Colman L, Lensun L, Rogers HL, Shuttleworth SJ: **Functional characterization of a novel somatic oncogenic mutation of PIK3CB.** *Signal Transduct Target Ther* 2017, **2**:17063.

138. Roberts PJ, Der CJ: **Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer.** *Oncogene* 2007, **26**(22):3291-3310.
139. Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, Alfieri RR: **Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer.** *Biochem Pharmacol* 2014, **90**(3):197-207.
140. Jain N, Zhang T, Kee WH, Li W, Cao X: **Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner.** *J Biol Chem* 1999, **274**(34):24392-24400.
141. Levy DE, Lee CK: **What does Stat3 do?** *J Clin Invest* 2002, **109**(9):1143-1148.
142. Hodge C, Liao J, Stofega M, Guan K, Carter-Su C, Schwartz J: **Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1, and junB through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2.** *J Biol Chem* 1998, **273**(47):31327-31336.
143. Dhawan P, Richmond A: **A novel NF-kappa B-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-kappa B activity in melanoma cells.** *J Biol Chem* 2002, **277**(10):7920-7928.
144. Garg R, Benedetti LG, Abera MB, Wang H, Abba M, Kazanietz MG: **Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not.** *Oncogene* 2014, **33**(45):5225-5237.
145. Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron AJ, Boeckeler K, Parker PJ: **PKC and the control of localized signal dynamics.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, **11**(2):103-112.
146. Dutta P, Sabri N, Li J, Li WX: **Role of STAT3 in lung cancer.** *JAKSTAT* 2014, **3**(4):e999503.
147. Qin HR, Kim HJ, Kim JY, Hurt EM, Klarmann GJ, Kawasaki BT, Duhagon Serrat MA, Farrar WL: **Activation of signal transducer and activator of transcription 3 through a phosphomimetic serine 727 promotes prostate tumorigenesis independent of tyrosine 705 phosphorylation.** *Cancer Res* 2008, **68**(19):7736-7741.
148. Pereira SG, Oakley F: **Nuclear factor-kappaB1: regulation and function.** *Int J Biochem Cell Biol* 2008, **40**(8):1425-1430.
149. Holtan SG, Creedon DJ, Haluska P, Markovic SN: **Cancer and pregnancy: parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents.** *Mayo Clin Proc* 2009, **84**(11):985-1000.
150. Stewart DR, Erikson MS, Erikson ME, Nakajima ST, Overstreet JW, Lasley BL, Amento EP, Seppala M: **The role of relaxin in glycodelin secretion.** *J Clin Endocrinol Metab* 1997, **82**(3):839-846.
151. Lenton EA, Neal LM, Sulaiman R: **Plasma concentrations of human chorionic gonadotropin from the time of implantation until the second week of pregnancy.** *Fertil Steril* 1982, **37**(6):773-778.
152. Gazdar AF: **Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: the evolving role of individualized therapy.** *Cancer Metastasis Rev* 2010, **29**(1):37-48.
153. Rudd ML, Price JC, Fogoros S, Godwin AK, Sgroi DC, Merino MJ, Bell DW: **A unique spectrum of somatic PIK3CA (p110alpha) mutations within primary endometrial carcinomas.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(6):1331-1340.
154. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT: **The PI3K Pathway in Human Disease.** *Cell* 2017, **170**(4):605-635.
155. Torbett NE, Luna-Moran A, Knight ZA, Houk A, Moasser M, Weiss W, Shokat KM, Stokoe D: **A chemical screen in diverse breast cancer cell lines reveals genetic enhancers and suppressors of sensitivity to PI3K isoform-selective inhibition.** *Biochem J* 2008, **415**(1):97-110.
156. Perez-Garcia V, Redondo-Munoz J, Kumar A, Carrera AC: **Cell activation-induced phosphoinositide 3-kinase alpha/beta dimerization regulates PTEN activity.** *Mol Cell Biol* 2014, **34**(18):3359-3373.

157. Pridham KJ, Varghese RT, Sheng Z: **The Role of Class IA Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunits in Glioblastoma.** *Front Oncol* 2017, **7**:312.
158. Tang ZH, Jiang XM, Guo X, Fong CM, Chen X, Lu JJ: **Characterization of osimertinib (AZD9291)-resistant non-small cell lung cancer NCI-H1975/OSIR cell line.** *Oncotarget* 2016, **7**(49):81598-81610.
159. Ho CC, Liao WY, Lin CA, Shih JY, Yu CJ, Chih-Hsin Yang J: **Acquired BRAF V600E Mutation as Resistant Mechanism after Treatment with Osimertinib.** *J Thorac Oncol* 2017, **12**(3):567-572.
160. Shi Y, Massague J: **Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.** *Cell* 2003, **113**(6):685-700.
161. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Cho M, Suh DS, Yoon MS, Chang CL, Jung JS *et al*: **Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells.** *Stem Cells* 2008, **26**(3):789-797.
162. Grimsby S, Jaensson H, Dubrovskaya A, Lomnytska M, Hellman U, Souchelnytskyi S: **Proteomics-based identification of proteins interacting with Smad3: SREBP-2 forms a complex with Smad3 and inhibits its transcriptional activity.** *FEBS Lett* 2004, **577**(1-2):93-100.
163. Lebrun JJ: **The Dual Role of TGFbeta in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis.** *ISRN Mol Biol* 2012, **2012**:381428.
164. Kalluri R: **The biology and function of fibroblasts in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2016, **16**(9):582-598.
165. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C: **The biology and management of non-small cell lung cancer.** *Nature* 2018, **553**(7689):446-454.
166. Zeng DQ, Yu YF, Ou QY, Li XY, Zhong RZ, Xie CM, Hu QG: **Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes for clinical therapeutic research in patients with non-small cell lung cancer.** *Oncotarget* 2016, **7**(12):13765-13781.
167. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, Besse B, Helland A, Giannone V, D'Amelio AM, Jr., Zhang P, Mookerjee B *et al*: **Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial.** *Lancet Oncol* 2017, **18**(10):1307-1316.
168. King AJ, Arnone MR, Bleam MR, Moss KG, Yang J, Fedorowicz KE, Smitheman KN, Erhardt JA, Hughes-Earle A, Kane-Carson LS *et al*: **Dabrafenib; preclinical characterization, increased efficacy when combined with trametinib, while BRAF/MEK tool combination reduced skin lesions.** *PLoS One* 2013, **8**(7):e67583.
169. Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F: **Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway?** *Nat Rev Clin Oncol* 2018, **15**(5):273-291.
170. Brown JS, Banerji U: **Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments.** *Pharmacol Ther* 2017, **172**:101-115.
171. So KH, Lee CL, Yeung WS, Lee KF: **Glycodelin suppresses endometrial cell migration and invasion but stimulates spheroid attachment.** *Reprod Biomed Online* 2012, **24**(6):639-645.
172. Koistinen H, Hautala LC, Seppala M, Stenman UH, Laakkonen P, Koistinen R: **The role of glycodelin in cell differentiation and tumor growth.** *Scand J Clin Lab Invest* 2009, **69**(4):452-459.

7 Appendix

7.1 Ergänzende Informationen

PMA-behandelte H1975-Zellen sowie LPA-, PMA-, EGF- und HB-EGF-behandelte 2106T-Zellen, die eine erhöhte *PAEP*-Expression zeigten, wurden mittels *Microarray* Genexpressionsanalysen analysiert. Die Datensätze der *Microarray* Genexpressionsanalysen sind in der NCBI GEO-Datenbank verfügbar (GSE115458; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE115458>). Weitere Untersuchungen differentiell exprimierter Gene (Faktor < -1,5 oder > 1,5) (siehe Tabelle 4.1) erfolgte unter Verwendung der *Software* IPA (*diseases and bio functions*). Dadurch wurden Einflüsse bestimmter biologischer Funktionen ermittelt (siehe Kapitel 3.1). NSCLC-Zellen mit erhöhter *PAEP*-Expression zeigten unter anderem eine verstärkte Aktivität von Funktionen, die bereits für Glycodelin beschrieben wurden: Invasion, Migration, Organisation des Zytoplasmas sowie des Zytoskeletts, Vaskularisierung, Wachstum und Zellmotilität (fett gedruckt in Tabelle 7.1). Schneider et al. postulierten bereits, dass das *Silencing* von *PAEP* in H1975- und 2106T-Zellen zu einer veränderten Zellstruktur führte und darüber hinaus ebenfalls die Migration verringerte. In dieser Studie wurde zudem eine Korrelation zwischen dem Glycodelingehalt im Serum und der Progression der Erkrankung gesehen [71]. Ebenso wurde *PAEP* als ein Promotor der Zellmigration, -invasion sowie des Tumorwachstums in Melanomzellen gezeigt [68]. Dementgegen ergaben andere Untersuchungen eine supprimierte Zellmigration und -Invasion in Endometriumkarzinomzellen [171] sowie eine Reduktion des Tumorwachstums von Mammakarzinomen [88, 172] ausgehend von Glycodelin. Aus einer weiteren Studie in mehreren Karzinomzelllinien ging hervor, dass Glycodelin eine wichtige Rolle in der Neovaskularisierung während der Tumorentstehung spielt [89].

Gemeinsam mit der immunmodulatorischen Wirkung von Glycodelin [71] sprechen diese Daten Glycodelin die Eigenschaften eines Tumorpromotors im NSCLC zu.

Tabelle 7.1: Ingenuity Pathway Analysis (IPA) zu Krankheiten und biologischen Funktionen in NSCLC-Zellen mit einer erhöhten PAEP/Glycodelin-Expression

Dargestellt sind die mittels der Software IPA generierten *activation z-scores* (signifikant bei > 2 oder < -2) der signifikantesten Krankheiten und biologischen Funktionen. Der Farbverlauf von gelb (hoch) bis blau (niedrig) gibt die Höhe der Werte wieder.

Krankheiten und biolog. Funktionen	H1975		2106T		
	PMA	LPA	PMA	EGF	HB-EGF
Binde- oder Weichgewebstumor	0,00	2,34	2,99	2,38	2,27
Chemotaxis	2,34	2,26	1,94	3,26	1,85
Homing von Zellen	2,24	2,37	1,98	3,37	2,03
inflammatorische Antwort	2,13	2,34	2,20	3,06	1,93
Invasion des Tumors	2,85	1,89	2,30	1,01	1,15
Invasion von Tumorzelllinien	1,21	3,41	3,10	0,79	1,04
Migration von Tumorzelllinien	1,88	3,40	2,94	1,19	1,77
Morbidität oder Mortalität	5,23	0,00	-4,27	0,00	0,00
Organisation des Zytoplasmas	-0,89	4,64	2,71	1,64	0,00
Organisation des Zytoskeletts	-0,94	4,64	2,78	1,64	0,00
organismischer Tod	4,91	-2,19	-4,52	0,60	0,00
Proliferation von Muskelzellen	2,55	2,74	1,91	2,35	-0,22
Vaskularisierung	1,49	1,69	2,79	2,58	0,70
Wachstum maligner Tumore	1,37	2,73	2,96	0,80	1,68
Zellinvasion	2,08	3,62	3,58	1,22	1,34
Zellmotilität von Karzinomzelllinien	1,20	2,30	2,17	2,48	2,10
Zellmotilität von Tumorzelllinien	1,81	3,25	3,01	1,66	1,74
Zelltod	3,08	-2,45	-1,07	1,83	-0,96

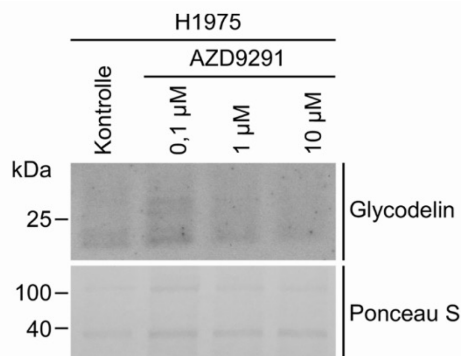


Abbildung 7.1: Der EGFR-TKI beeinflusst die Sekretion von Glycodelin nicht

Über Nacht in serumfreiem Medium kultivierte H1975-Zellen wurden mit AZD9291 (Osimertinib, EGFR-TKI) behandelt. Der Überstand der Zellen wurde aufgetragen und Glycodelin im Western Blot detektiert. Die Ponceau S-Färbung diente als Kontrolle.

7.2 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
α2-PEG	<i>pregnancy-associated endometrial α2-globulin</i>
μ	Mikro
%	Prozent
A	Alanin
A	Ampere
Abs.	Absatz
ADC	Adenokarzinom (<i>adenocarcinoma</i>)
AKT	Proteinkinase B
ALK	anaplastische Lymphomkinase (<i>anaplastic lymphoma kinase</i>)
biolog.	biologisch
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BRAF	<i>B rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
CD3	<i>cluster of differentiation3</i>
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
CDKN2A	Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor 2A
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C _t	<i>threshold cycle</i>
CT	Chemotherapie
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine</i>
D	Asparaginsäure
DAG	Diacylglycerol
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
del	Deletion
dNTPs	Desoxynukleotide
dt	Oligo
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced ChemiLuminescence</i>

ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
EML4	<i>echinoderm microtubule-associated protein-like 4</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERK	Extrazellulär-signalregulierte Kinase
ESD	Esterase D
g	Gramm
G	Glycin
GATA3	GATA-binde Protein3
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
h	Stunde (<i>hour</i>)
H	Histidin
HB-EGF	heparinbindender epidermaler Wachstumsfaktor-ähnlicher Wachstumsfaktor (<i>heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor</i>)
hCG	humanes Choriongonadotropin
HDACI	Histon-Deacetylaseinhibitor
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Hz	Hertz
Ig	Immunglobulin
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
IL	Interleukin
IL-2R	Interleukin-2-Rezeptor
JAK	Januskinase
KLF11	Krüppel-ähnlicher Transkriptionsfaktor (<i>krüppel-like transcription factor11</i>)
KRAS	Kirsten Ratten-Sarkom-Homolog
l	Liter
L	Leucin
LCC	großzelliges Karzinom (<i>large cell carcinoma</i>)
LPA	Lysophosphatidsäure
m	milli
M	Methionin
M	Molar

MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MICB	<i>MHC class I polypeptide-related sequence B</i>
MIQE	Mindestinformation für die Publikation von qPCR- Experimenten (<i>Minimum Information for Publication of qPCR Experiments</i>)
min	Minuten
MITF	Mikrophthalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MUC1	Mucin-1
n	Gesamtanzahl
n	Nano
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
Nr.	Nummer
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (<i>non-small cell lung cancer</i>)
OP	Operation
p-Stadium	pathologisches Stadium (7- Edition)
P-Wert	Wahrscheinlichkeitswert (<i>probability-value</i>)
p.a.	zur Analyse (<i>per analysis</i>)
PAEP	Progesteron-assoziiertes endometriales Protein (<i>progesterone associated endometrial protein</i>)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PEP	<i>progestogen-dependent endometrial protein</i>
PD-1	programmierter Zelltod 1 (<i>programmed death-1</i>)
PD-L1	programmierter Zelltod-Ligand 1 (<i>programmed death-ligand-1</i>)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PIK3CB	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PRKCD	Isoform der PKC
PP14	<i>placental protein 14</i>

qPCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
PTEN	Phosphatase und Tensin-Homolog
R	Arginin
RIN	RNA Integrität (<i>Integrity Number</i>)
RMA	<i>robust multi-array average</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROS1	ROS Protoonkogen 1
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPS6	ribosomales Protein S6
RPS18	40S ribosomales Protein S18
RT	Radiotherapie
RTP	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
Ser	Serin
SQCC	Plattenepithelkarzinom (<i>squamous cell carcinoma</i>)
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom (<i>small cell lung cancer</i>)
SDS-PAGE	SDS-Gelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth with Catabolite repression</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
Sp1	spezifisches Protein1
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
T	Threonin
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor- β (<i>transforming growth factor-β</i>)
TGF- β R	transformierender Wachstumsfaktor- β -Rezeptor (<i>transforming growth factor-β-receptor</i>)
Th1	Typ-1-T-Helferzellen
Th2	Typ-2-T-Helferzellen
TK	Tyrosinkinase
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor

TP53	Tumorprotein P53
Tyr	Tyrosin
U	Unit
UICC	<i>Union of International Cancer Control's</i>
UV	ultraviolett
V	Valin
V	Volt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
x g	fache Gravitationsfeldstärke

8 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits wie folgt veröffentlicht:

Konferenzen

Weber, R., Schneider, M.A., Muley, T., Thomas, M., Sültmann, H. und Meister, M.

Posterpräsentation: *The Regulation of Glycodelin Expression in NSCLC: More than one (Path)way?*

DKFZ *PhD Retreat*, Juli 2016, Weil der Stadt

Weber, R., Schneider, M.A., Muley, T., Thomas, M., Sültmann, H. und Meister, M.
Posterpräsentation: Regulation of Glycodelin Expression – an Immunomodulatory and Pregnancy associated Protein in NSCLC

17. *World Conference on Lung Cancer (WCLC)*, Dezember 2016, Wien (Österreich)

Weber, R., Schneider, M.A., Muley, T., Thomas, M., Sültmann, H. und Meister, M.
Posterpräsentation: Regulation of Glycodelin Expression – an Immunomodulatory and Pregnancy associated Protein in NSCLC

6. DZL-Jahrestreffen, Januar 2017, München

Weber, R., Schneider, M.A., Muley, T., Thomas, M., Sültmann, H. und Meister, M.

Posterpräsentation: Regulation of Glycodelin Expression – an Immunomodulatory and Pregnancy associated Protein in NSCLC

DKFZ *PhD Poster Presentation*, Dezember 2017, Heidelberg

Weber, R., Schneider, M.A., Muley, T., Thomas, M., Sültmann, H. und Meister, M.

Posterpräsentation: Regulation of Glycodelin Expression – an Immunomodulatory and Pregnancy associated Protein in NSCLC

7. DZL-Jahrestreffen, Februar 2018, Bad Nauheim

Paper

Weber, R., Meister, M., Muley, T., Thomas, M., Sültmann, H., Warth, A., Winter, H., Herth, J.F. und Schneider, M.A. *Pathways regulating the expression of the immunomodulatory protein glycodeclin in non-small cell lung cancer*. Aktuell im Review bei *International Journal of Oncology*.

9 Erklärung zur Beteiligung Dritter

Die qPCR-Experimente, welche Grundlage der von mir erstellten Abbildung 4.3 a sind, wurden von Dr. Marc A. Schneider (Sektion Translationale Forschung, Thoraxklinik, Heidelberg) durchgeführt. Die Auswahl der in Tabelle 4.6 verwendeten Patientenproben erfolgte anhand der von Dr. Marc A. Schneider generierten qPCR-Daten. Diese sind Teil der Publikation [71]. Die Sammlung und das Einlagern der Gewebeproben sowie die Dokumentation der dazugehörigen Patientendaten wurde von *Study Nurses* der Sektion Translationale Forschung (Thoraxklinik) übernommen. Diese Proben wurden anschließend von Pathologen der Thoraxklinik bezüglich Histologie und Tumorgehalt evaluiert. Routinemäßig wurden die Kryosektion der Gewebeproben, Hämatoxylin-Eosin-Färbung, RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und *Microarray* Genexpressionanalysen unter technischer Assistenz von Jessica Eschenbach, Martin Fallenbüchel und Elizabeth Chang Xu (Sektion Translationale Forschung, Thoraxklinik) durchgeführt.

10 Danksagung

Auch wenn ich alleiniger Autor dieser Arbeit bin, haben mich dennoch viele Menschen in unterschiedlicher Weise während meines Projektes unterstützt. Diese möchte ich hier dankend erwähnen:

Zuerst möchte ich gerne Herrn **Dr. Michael Meister** und Herrn **Dr. Thomas Muley** für die Möglichkeit meine Dissertation in der Sektion Translationale Forschung an der Thoraxklinik durchführen zu können und für deren Unterstützung während dieser Jahre danken. Diesbezüglich gilt auch ein Dank an Herrn **Prof. Dr. Michael Thomas**.

Zudem danke ich Herrn **Prof. Dr. Holger Sültmann** für die Übernahmen des Zweitgutachtens sowie seine stetige Hilfsbereitschaft. Ebenfalls gilt den **Mitgliedern der Abteilung Krebsgenomforschung**, die ihr Wissen in zahlreichen Seminaren sowie darüber hinaus mit mir teilten, ein Dankeschön.

Einen weiteren großen Dank möchte ich an Herrn **Prof. Dr. Peter Angel** für die Übernahme des Erstgutachtens sowie dessen hilfreiche Kritik insbesondere im Rahmen der TAC-Meetings aussprechen. Zusätzlich bedanke ich mich bei den weiteren Mitgliedern meiner Prüfungskommission Frau **Prof. Dr. Ursula Klingmüller** und Herr **Prof. Dr. Benedikt Brors**.

Ebenfalls danke ich dem **Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)** für die finanzielle Unterstützung (82DZL004A2).

Ganz besonders dankbar bin ich Herrn **Dr. Marc A. Schneider**, der nicht nur das Projekt initiierte, sondern mir auch mit seinem Wissen und seinem Enthusiasmus immer unterstützend zur Seite stand.

Darüber hinaus gilt ein großes Dankeschön für die technische, aber vor allem auch kollegiale, Unterstützung den Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Sektion Translationale Forschung: **Andrea Bopp, Birgit Beelte, Carmen Hoppstock, Christa Stolp, Elizabeth Chang Xu, Daniel Firnkorn, Ingrid Heinzmann-Groth, Jessica Eschenbach, Karin Schnorr-Teichert, Karsten Senghas, Katja Yuskaeva, Martin Fallenbüchel, Dr. Nicolas Kahn, Dr. Sabine Wessels, Sara Richtmann, Saskia Oestringer, Simone Kühn** und **Uta Baier**.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner **Familie** und meinen **Freunden** bedanken. Ihr habt mit mir Höhen und Tiefen während meiner Dissertation durchgestanden und habt

dabei immer an mich geglaubt. Es ist schön, Menschen in seinem Umfeld zu haben, auf die man jederzeit zählen kann.