

**Verlust eines funktionellen Zytoskeletts durch
Hyperphosphorylierung als mögliche Ursache
der Ausbildung eines kleinzelligen Phänotyps in
Lungenkarzinomen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Davide Frasca

aus Rom / Italien

2019

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Lukas Carl Heukamp
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Schweizer

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.04.2019

Aus dem Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. med. Glen Kristiansen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Das Lungenkarzinom	8
1.2 Das Zytoskelett	9
1.2.1 Mikrotubuli	10
1.2.2 Aktin-Mikrofilamente	11
1.2.3 Intermediärfilamente	16
1.3 Zielsetzung	21
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Zellkultur	23
2.2 Tumorproben	23
2.3 Tissue Microarrays.....	24
2.4 Immunhistochemie.....	26
2.5 Small interfering RNA (siRNA)-Transfektion.....	28
2.6 RNA-Isolation.....	29
2.7 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	29
2.8 Polymerasekettenreaktion.....	30
2.9 Agarosegelelektrophorese	31
2.10 Quantitative Real-Time-PCR.....	32
2.11 Proteinisolation	33
2.12 Proteinbestimmung (nach Bradford).....	33
2.13 Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot.....	34
2.14 MTT-Test	35
2.15 Wundheilungsassay (scratch-assay).....	36
2.16 Boyden-Kammer Experiment/ Transwell-Migrations-Assay	36
2.17 Durchflusszytometrie	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Metaanalyse von Expressionsarray-Daten	38
3.2 Generation von Tissue-Microarrays	40
3.3 Etablierung von Färbeprotokollen	41
3.4 Immunhistochemische Validierung der Kandidatengene auf den Tissue- Microarrays	42
3.4.1 AKAP2, AKAP11, PKAC α , PKA2 β	42
3.4.2 DUSP6	49

3.4.3	MARCKS	51
3.4.4	SMG1	54
3.4.5	Zusammenfassung	56
3.5	Validierung der Target-Gene durch RT-PCR.....	56
3.6	Etablierung von Zelltransfektionen mit siRNA	59
3.7	Funktionelle Testung der transfizierten Zellen.....	61
3.8	Validierung phosphospezifischer Bindungen durch FACS.....	64
3.9	Western Blot	66
4.	Diskussion	67
5.	Zusammenfassung.....	71
6.	Abbildungsverzeichnis	72
7.	Tabellenverzeichnis	74
8.	Literaturverzeichnis	75

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
APUD	amine precursor uptake and decarboxylation
AKAP	protein kinase A anchor protein
Arp	actin related protein
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin
Cdc	cell division control protein
cDNA	complementary DNA
CGRP	calcitonin gene-related peptide
ct	cycle threshold
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DTT	1,4-Dithiothreitol
DUSP	dual specificity phosphatase 6
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epithelial growth factor
EGFR	EGF receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
Fab	fragment antigen binding
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fc	crystallisable fragment
FCS	fetal calf serum
FHL-2	four and a half LIM domains 2
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
IMDM	Iscoe's modified Dulbecco's medium
K-Ras	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LyGDI	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta
MAP	microtubule associated protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
MARK	MAP/microtubule affinity-regulating kinase
MEK	MAPK kinase
MLC	myosine light chain
mRNA	messenger RNA
mTOR	mechanistic target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Ncam1	neural cell adhesion molecule 1
NMD	nonsense-mediated mRNA decay
NSCLC	non-small cell lung cancer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase-chain-reaction
PFA	paraformaldehyde
PIK3CA	Phosphoinositide-3-kinase
PKA	proteinkinase A
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
Rac	ras-related C3 botulinum toxin substrate
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma
Rho	ras homologue
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RNA	ribonuclein acid
Rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
Scar	suppressor of cAMP receptor
scr	scrambled
SDS	sodium dodecyl sulfat

Ser	Serin
SCLC	small cell lung cancer
siRNA	small interfering RNA
SMG	supressor with morphogenetic effect on genitalia family members
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris-buffered saline
TEA	TRIS-Acetat-EDTA
TNF	tumour necrosis factor
TMA	tissue microarray
VEGF	vascular endothelial growth factor
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
WAVE	Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous
WHO	world health organization

1. Einleitung

1.1 Das Lungenkarzinom

Das Lungenkarzinom stellt trotz kontinuierlicher Verbesserung der diagnostischen und therapeutischen Ansätze die häufigste tumorbedingte Todesursache in westlichen Industrienationen dar (Jemal, Bray et al.). Es wird von der Weltgesundheitsorganisation anhand seiner Histologie und der damit verbundenen Auswirkungen auf klinisches Management und Prognose der Erkrankung in kleinzellige (small cell lung cancer, SCLC) und nicht-kleinzellige (non-small cell lung cancer, NSCLC) Lungentumoren unterteilt (Brambilla, Travis et al., 2001).

NSCLCs bilden große, zusammenhängende Primärtumoren, die eher spät metastasieren und ein intaktes Keratin- und Aktin-Zytoskelett aufweisen (Abb.1) (Zimmer, Kahl et al., 2009). Sie machen etwa 75-80 % der Fälle aus und lassen sich weiterhin in Plattenepithelkarzinome (ca. 40 %), Adenokarzinome (ca. 25 %, häufigste Form bei Nichtrauchern) und großzellige Bronchialkarzinome (ca. 10 %) unterscheiden (Travis, 2002). Die Stadieneinteilung erfolgt nach der TNM-Klassifikation (8. Auflage, 2017). Die Therapie im Stadium I-IIIa besteht primär aus der chirurgischen Resektion des Tumors. SCLCs hingegen zeigen ein kollabiertes, perinukleär kondensiertes Keratin- und Aktin-Zytoskelett-Muster (Abb.1). Sie tendieren zu einem eher diffusen, „lymphoid-ähnlichen“ Wachstum und einer frühen Metastasierung (hämatogen vor allem in Leber, Gehirn, Nebennieren und Skelett), offenbaren daher auch eine vergleichsweise signifikant schlechtere Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 5 % (Poepel, Jarius et al., 2007). Da das SCLC zum Zeitpunkt der Diagnose meist schon disseminiert ist, benutzt man hier eine vereinfachte Stadieneinteilung und differenziert zwischen very limited disease, limited disease (Stadium I bis III nach TNM) und extensive disease (Stadium IV nach TNM, 70 %). Betroffene Patienten werden primär systemisch mit einer Kombination aus Polychemotherapie und Radiatio behandelt. SCLCs zeigen Eigenschaften neuroendokriner Differenzierung, exprimieren neuroendokrine Marker wie das CGRP oder das Ncam1 (Meuwissen, Linn et al., 2003) und können paraneoplastische Syndrome wie z.B. das Cushing-Syndrom auslösen. Vermutlich leiten sie sich von Zellen des APUD-Systems ab. Die Beobachtung, dass ein Anteil der SCLCs eine Mischung aus

SCLC- und NSCLC-spezifischen Merkmalen aufweist, spricht allerdings für einen „gemeinsamen“ Zellursprung der verschiedenen Subtypen des Bronchialkarzinoms (Semenova, Nagel et al. ; Sutherland and Berns ; Yesner, 2001).

Im Folgenden sollen zunächst das Zytoskelett und seine Komponenten vorgestellt werden, bevor dann zum Abschluss dieser Einleitung genauer auf die Zielsetzung dieser Arbeit eingegangen wird.

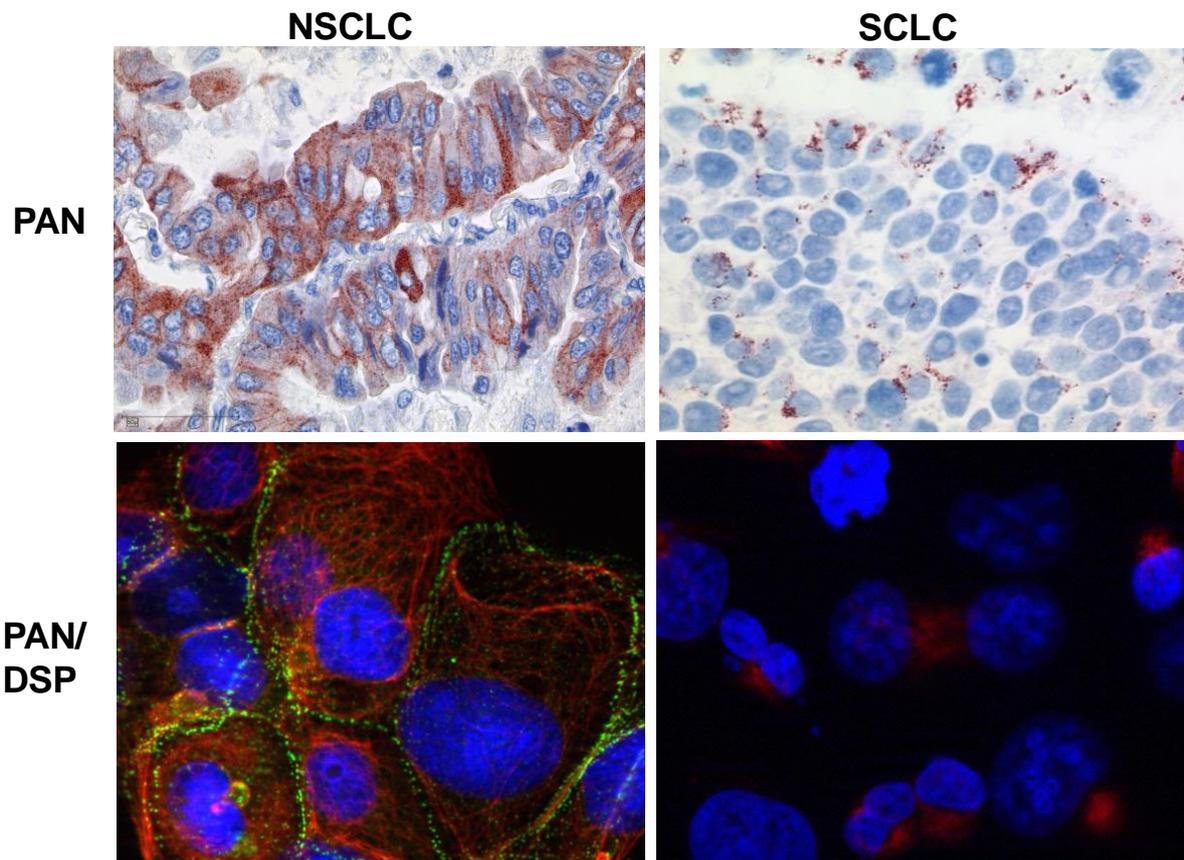


Abb. 1: Panzytokeratin Immun- bzw. Fluoreszenz-Färbung eines nicht-kleinzelligen und eines kleinzelligen Lungentumors im Vergleich. Panzytokeratin (PAN), Desmoplakin (DSP)

1.2 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett ist ein aus Proteinen aufgebautes Netzwerk im Zytoplasma eukaryotischer Zellen. Es ist verantwortlich für die mechanische Stabilisierung der Zelle und ihre äußere Form, für aktive Bewegungen der Zelle als Ganzes sowie für

Bewegungen und Transporte innerhalb der Zelle. Es handelt es sich dabei nicht nur um ein statisches Gerüst, wie es der Name glauben lässt. Vielmehr stellt sich das Zytoskelett als hochdynamische Signal-Plattform dar, die im Fall des Keratin-Zytoskeletts durch komplexe Phosphorylierungsvorgänge reguliert zu sein scheint und in wichtige Funktionen bei Proliferation und Zell-Antwort auf Stress involviert ist (Magin, Vijayaraj et al., 2007; Vijayaraj, Sohl et al., 2007).

Das Wort Zytoskelett wurde 1931 von dem Embryologen Paul Winterbert geprägt, der sich mit der internen Organisation von Eizellen während ihrer Wanderung zum Uterus befasst hat. Die stark einwirkenden Deformationskräfte ließen ihn an die Notwendigkeit der Existenz eines Zytoskeletts denken (Frixione, 2000).

In der eukaryotischen Zelle unterscheidet man drei Klassen von Zytoskelettfilamenten, die jeweils von unterschiedlichen Proteinen bzw. Proteinklassen gebildet werden, spezifische Begleitproteine besitzen und sich auf jeweils verschiedene Weise an den Aufgaben des Zytoskeletts beteiligen: Mikrotubuli, Aktin-Mikrofilamente und Intermediärfilamente. Eine schematische Darstellung findet sich in Abbildung 2.

1.2.1 Mikrotubuli

Mikrotubuli sind langgestreckte Polymere, die innerhalb der Zelle ein Filamentsystem bilden, welches für die Anordnung der Zellorganellen und als Transportwege für die Beförderung von Fracht wie Vesikel, mRNA oder auch Chromosomen durch molekulare Motoren nötig ist. Sie bestehen aus $\alpha\beta$ -Tubulindimeren, die durch longitudinale Assoziation Subfilamente (sogenannte Protofilamente) bilden. Durch laterale Verknüpfung von meist 13 Protofilamenten entstehen letztendlich die endgültigen Hohlzylinder mit einem Durchmesser von 18 bis 25 nm. In der Zelle sind Mikrotubuli typischerweise mit ihrem Minus-Ende (über das α -Tubulin) an ein Mikrotubulus-Organisationszentrum (MTOC) meist in Zellkernnähe gebunden (Webster, Wehland et al., 1990). Der ständige Wechsel aus Wachstum und Schrumpfung, der zwar an beiden Enden stattfindet, sich aber am Plus-Ende deutlich schneller vollzieht, wird auch als Dynamische Instabilität bezeichnet (Mitchison and Kirschner, 1984) und ist von zentraler Bedeutung für die räumliche Verteilung der Mikrotubuli und ihrer Funktion als „Führungsschienen“ (Holy and Leibler, 1994). Unter geeigneten Bedingungen lagern sich

einzelne Tubulinmoleküle mit fest gebundenem Guanosin triphosphat (GTP) an das positive Ende der Mikrotubuli an, wodurch diese wachsen (Polymerisation). Nach kurzer Zeit wird das GTP per Hydrolyse zu Guanosindiphosphat (GDP) abgebaut. Es bleibt jedoch weiterhin an das Tubulin gebunden. Hierdurch entsteht eine Kappe aus GTP-Tubulinen auf der positiven Seite der Mikrotubuli, auf die in Richtung des negativen Endes eine lange Kette aus GDP-Tubulinen folgt. Der Abbau (Depolymerisierung) findet statt, wenn die Hydrolyse schneller voranschreitet als neues GTP-Tubulin gebunden wird. In diesem Fall kann es passieren, dass das GTP des letzten Tubulinmoleküls in der Kette zu GDP zerfällt, wodurch der Mikrotubulus rapide depolymerisiert (engl. catastrophe). Die Depolymerisation wird erst dann unterbrochen, wenn ein neues GTP-Tubulin an den zerfallenden Strang bindet und sich eine neue GTP-Tubulin-Kappe ausbildet (Mitchison and Kirschner, 1984).

Mit den Mikrotubuli sind zahlreiche Proteine assoziiert. Die bekanntesten sind Motorproteine wie Dynein und Kinesin. Zudem gibt es eine ganze Gruppe von Proteinen mit dem Sammelnamen MAPs (microtubule associated proteins). Die meisten MAPs nehmen offenbar regulatorische Funktionen wahr, beeinflussen die Stabilität und Dynamik der Mikrotubuli, indem sie Tubulindimere binden, Polymere stabilisieren oder destabilisieren oder an Mikrotubuli-Enden binden. Als stabilisierende MAPs sind hier zum Beispiel die Proteine der tau-Familie (= tubulin-associated protein) zu nennen, die unter anderem über Phosphorylierung durch MARKs (MAP affinity-regulating kinases) reguliert werden. Zu den destabilisierenden MAPs zählen wiederum Op18/Stathmin oder auch Katanin (Walczak, 2000).

1.2.2 Aktin-Mikrofilamente

Die ATPase Aktin (43 kDa) ist eines der am häufigsten vorkommenden Proteine in eukaryotischen Zellen. Es existiert in zwei Formen in der Zelle: monomer sowie filamentös. Das globuläre Aktin-Monomer (G-Aktin) kann unter physiologischen Bedingungen in einer reversiblen Reaktion zu doppelsträngigen, helikalen Filamenten (F-Aktin) mit einem Durchmesser von ca. 8 nm polymerisieren (Pantaloni, Le Clainche et al., 2001). G-Aktin besteht aus vier Domänen, wobei durch die spezielle Konformation von

zwei der Domänen eine Bindungstasche entsteht, in der ATP sowie Magnesium mit sehr hoher Affinität gebunden werden kann (Schuler, 2001).

Aktinfilamente besitzen eine strukturelle und kinetische Polarität, d.h. sie weisen ein schnell wachsendes (+)-Ende („barbed end“) und ein langsam wachsendes (-)-Ende („pointed end“) auf (Welch and Mullins, 2002). MgATP-gebundenes G-Aktin wird am (+)-Ende in das Aktinfilament eingebaut. Dabei wird das ATP hydrolysiert und anorganisches Phosphat freigesetzt, was zu einer Destabilisierung des F-Aktins führt. Die Affinität des ADP-gebundenen Aktin zum Filament am (+)-Ende ist im Vergleich zu ATP-gebundenem Aktin vermindert (Korn, Carlier et al., 1987). Das ATP wird schnell in ADP und Orthophosphat hydrolysiert, so dass netto am (-)-Ende ADP-Aktin dissoziiert (Pollard and Borisy, 2003). Das ADP-Aktin-Monomer wird dann wiederum mit ATP beladen und zurück zum (+)-Ende transferiert, wo es erneut an das Aktinfilament polymerisiert. Das Aktin-Monomer „durchwandert“ also das Filament jeweils vom (+)- zum (-)-Ende (Wegner, 1976). Diese Erscheinung wird auch „Tretmühlenmechanismus“ (treadmilling) genannt und spielt eine wichtige Rolle im Prozess der Zell-Motilität (Small, Stradal et al., 2002). Es entsteht ein dynamischer Gleichgewichtszustand aus G-Aktin-Dissoziation und -Assoziation, bei dem es schließlich zu keinem Netto-Wachstum des Aktinfilaments mehr kommt.

Spontane Aktinpolymerisation ist ein sehr langsamer Prozess. Für die Neubildung eines Aktinfilaments wird ein sogenannter Nukleationskern benötigt, der aus einem Aktin-Dimer oder -Trimer besteht. Die Formation eines solchen Nukleationskerns ist thermodynamisch ungünstig; sobald er jedoch vorhanden ist, lagern sich weitere Aktin-Monomere an und die Polymerisationsgeschwindigkeit nimmt rapide zu (Cooper, Buhle et al., 1983; Kreishman-Deitrick, Egile et al., 2003). Die gesteigerte Polymerisationsgeschwindigkeit *in vivo* rührt von zellulären Nukleationsfaktoren wie dem Arp2/3-Komplex und dessen Aktivatoren, den Proteinen der WASP/Scar-Familie her (Machesky, Atkinson et al., 1994).

Das Aktinzytoskelett ist ein komplexes, flexibles und dynamisches Netzwerk, das bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Es ist u.a. in die Zellmotilität, die Erhaltung der zellulären Gestalt, die Anheftung der Zelle und ihre Interaktion mit der extrazellulären Matrix involviert. Außerdem ist es an der Zellteilung sowie endo- und phagozytotischen Prozessen beteiligt (Da Costa, Sou et al., 2003). Um diese

verschiedenen Funktionen in der Zelle ausüben zu können, weist das Aktinzytoskelett eine Vielzahl an dynamischen Strukturen auf.

Zu den meist-zitierten Aktinstrukturen gehören Stressfasern, Lamellipodien und Filopodien (Small, Rottner et al., 1999), wobei die beiden zuletzt genannten zu den protrusiven (= den Zellvorschub bewirkenden) Strukturen gehören.

Stressfasern sind lange, dichte Bündel aus parallel angeordneten Aktinfilamenten. Durch eine bipolare Anordnung von Aktin und Myosin II sind sie in der Lage, zu kontrahieren und die Spannung der Zelle aufrecht zu erhalten (Small, Kaverina et al., 1999). Für ihre Entstehung werden sogenannte Fokalkontakte benötigt. Dies sind transmembrane Verbindungen, die die Zelle an der extrazellulären Matrix verankern (Izzard and Lochner, 1976; Parsons, Martin et al., 2000).

Als Lamellipodium bezeichnet man den flachen, breiten Leitsaum an der vorderen Front einer motilen Zelle (Abercrombie, Heaysman et al., 1970; Abercrombie, Heaysman et al., 1971). Die Aktinfilamente innerhalb des Lamellipodiums liegen in einem locker verbundenen, diagonalen oder verzweigtem Netzwerk vor (Small, Stradal et al., 2002). Sie sind mit ihren schnell wachsenden (+)-Enden in Richtung der Zellmembran orientiert, so dass durch die Polymerisation von Aktin-Molekülen in das Filament der Vorschub der Zellmembran bewirkt wird (Tilney, Bonder et al., 1981).

Filopodien sind fingerartige Ausläufer der Zellmembran. Sie setzen sich aus langen, parallel-angeordneten Aktinfilamenten zusammen (Bartles, 2000). Ihre (+)-Enden sind in die Richtung des Vorschubs orientiert, d.h. die Polymerisation findet an den Spitzen dieser Filamente statt (Mallavarapu and Mitchison, 1999). Filopodien dienen möglicherweise als ‚sensorisches Organ‘, das die Extrazelluläre Matrix sowie die Oberfläche benachbarter Zellen ‚abtastet‘ (Wood and Martin, 2002).

Der dynamische Aufbau und die räumliche Organisation von Aktinfilamenten wird durch ein großes Repertoire von Aktin-bindenden Proteinen reguliert (Disanza, Steffen et al., 2005). Diese Proteine lassen sich in diverse Gruppen einteilen: Proteine, die (1) die Nukleation von Aktin begünstigen, (2) die Depolymerisation der Filamente steuern, (3) mit monomerem Aktin assoziieren und (4) die Enden der Aktinfilamente bedecken.

Als Beispiel eines solchen Aktin-bindenden Proteins sollen die Capping-Proteine dienen. Sie können Aktinfilamente am (+)- sowie am (-)-Ende bedecken, was die Polymerisation bzw. die Depolymerisation verhindert. Wird das (+)-Ende bedeckt, so kann eine

Dissoziation von Aktin-Molekülen am (-)-Ende erfolgen, welche wiederum an andere, nicht mit Capping-Proteinen bedeckte (+)-Enden polymerisieren können (Schafer and Cooper, 1995; Carlier, Laurent et al., 1997). Auf diese Art und Weise dienen Capping-Proteine dem räumlich begrenzten und signalabhängigen Wachstum von Aktinfilamenten (Disanza, Steffen et al., 2005).

Mit der Zellmigration wird eine große Anzahl von Signalmolekülen in Zusammenhang gebracht. Unter anderem sind Phospholipasen, Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen in die Kontrolle der Zellwanderung involviert. Die biochemischen Signalwege, die größte Relevanz für die Zellmigration haben, werden jedoch hauptsächlich durch eine spezielle Proteinfamilie reguliert: die Rho-GTPasen.

Rho-GTPasen gehören zu der Familie der Ras-GTPasen. Sie haben ein durchschnittliches Molekulargewicht von 20-40 kDa und werden meist ubiquitär exprimiert. Bis dato wurden 22 Gene in Säugern identifiziert, die für mindestens 25 Proteine kodieren (Aspenstrom, Fransson et al., 2004; Jaffe and Hall, 2005). Die Assoziation mit der aus Lipiden aufgebauten Zellmembran wird in den meisten Fällen durch einen posttranslational an den N- oder C-Terminus angehefteten Fettsäurerest (Farnesyl-, Geranylgeranyl-, Myristyl- oder Palmitylrest) vermittelt. Bei der am häufigsten vorkommenden Prenylierung werden Farnesyl- oder Geranylgeranylreste an ein Cystein gekoppelt, welches Bestandteil des C-terminalen Erkennungsmotivs CaaX (C: Cystein, a: aliphatische Aminosäure, X: Leucin, Methionin, Serin oder Glutamin) ist. Zusätzlich zur Prenylierung erfolgt bei einigen Ras-GTPasen noch eine zweite posttranslationale Modifikation in Form einer Palmitoylierung (beispielsweise H-Ras und N-Ras). In anderen Fällen befinden sich positiv geladenen Aminosäuren in einer polybasischen Region im C-Terminus der kleinen GTPase, die ebenfalls die Membranassoziation durch Interaktion mit negativ geladenen Gruppen im polaren Teil von Membranlipiden unterstützen. (Roberts, Mitin et al., 2008)

Rho-GTPasen fungieren als molekulare Schalter. In aktivem Zustand haben sie GTP gebunden, durch Hydrolyse des GTP zu GDP wechseln sie in die inaktive Form. Dieser GDP-GTP-Zyklus wird dabei durch unterschiedliche Moleküle reguliert. Guanin-Austauschfaktoren (,guanine nucleotide exchange factors'; GEFs) begünstigen den Nukleotidaustausch von GDP zu GTP und somit die Aktivierung, während GTPase aktivierende Proteine (GAPs) die hydrolytische Aktivität der GTPase verstärken und daher

die inaktive Konformation fördern (Moon and Zheng, 2003). Zusätzlich können Guanin-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) die Dissoziation des GDP blockieren. In ruhenden Zellen liegen die Rho-GTPasen im inaktiven Zustand (komplexiert mit GDIs) vor, nach Stimulation der Zelle werden sie aus diesem Komplex entlassen und können mit Hilfe ihres isoprenylierten C-Terminus in der Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran lokalisieren (Olofsson, 1999; Robbe, Otto-Bruc et al., 2003). Dort können sie dann von GEFs aktiviert werden.

Zwei variable Regionen verändern abhängig vom gebundenen Nukleotid ihre Konformation. Man nennt diese Regionen deshalb „switch I“- und „switch II“-Region. Die durch die GTP-Bindung induzierte Konformationsänderung der GTPase ermöglicht über die „switch I“-Region die Interaktion mit sogenannten Effektormolekülen. Dabei handelt es sich definitionsgemäß um Proteine, die vornehmlich mit der aktivierten, GTP-gebundenen Form der GTPase interagieren und auf diese Weise spezifisch lokalisiert und/oder aktiviert werden. Die „switch I“-Region wird deshalb auch häufig „effector loop“ genannt (Vetter and Wittinghofer, 2001).

Rho-GTPasen binden in ihrem aktiven Zustand an diverse Effektormoleküle und induzieren so spezifische zelluläre Antworten auf externe Stimuli (Bishop and Hall, 2000). Der Aufbau und die Organisation des Aktinzytoskeletts werden insbesondere durch die Rho-GTPasen Cdc42, Rac1 und Rho reguliert. Des Weiteren sind sie in Zelladhäsion, Ausbildung und Erhaltung der Zellpolarität, Endozytose, Vesikeltransport, Zelldifferenzierung und Transkription involviert (Nobes and Hall, 1999; Etienne-Manneville and Hall, 2002).

Die drei Rho-GTPasen unterliegen einer gewissen Hierarchie. Cdc42 kann zur Aktivierung von Rac1 führen, und beide Proteine können Rho inhibieren (Nobes and Hall, 1995; Sander and Collard, 1999).

Rho reguliert die Bildung kontraktile Aktin-Myosin-Filamente (Stressfasern) und wird für die Formation und Erhaltung fokaler Adhäsionen benötigt (Ridley, Paterson et al., 1992; Nobes and Hall, 1995). RhoA kann unter anderem mittels ROCKs (Rho-kinases) die Myosin-Leichtketten(MLC)-Phosphorylierung stimulieren, indem es zum einen die MLC-Phosphatase hemmt, zum anderen wohl auch MLC direkt phosphoryliert (Kaibuchi, 1999). Rac1 kann durch Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF („epidermal growth factor“), Insulin und PDGF („platelet derived growth factor“) aktiviert werden und induziert durch

Aktinpolymerisation an der vorderen Zellfront einer motilen Zelle die Bildung von Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ (Ridley and Hall, 1992). Dies geschieht über zwei verschiedene Signalkaskaden: Wie oben beschrieben, sind in ruhenden Zellen die bestehenden Aktin-Filamente an ihren Plus-Enden mit Capping-Proteinen versehen, die eine spontane Aktin-Polymerisation verhindern. Rac1 kann über Phosphatidylinositid 4-Phosphat 5-Kinase (PI(4)P5-K) die Bildung von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P2) anregen, welches an die Capping-Proteine bindet und sie entfernt (Tolias, Hartwig et al., 2000). Rac1 kann ist aber auch an der Schaffung neuer Aktin-Filamente an bereits existierenden beteiligt und zwar mittels der Interaktion mit einem Komplex aus IRSp53 (insulin receptor tyrosine kinase substrate p53) und WAVE-Proteinen (Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous) (Takenawa and Miki, 2001). Dieser aktiviert den Arp2/3-Komplex. Aufgrund der starken strukturellen Homologie von Arp2 und Arp3 (‚Actin related protein‘) zu Aktin geht man davon aus, dass der Komplex durch die Zusammenlagerung dieser beiden Proteine ein Aktin-Dimer nachahmt, welches stabiler als ein Aktin-Dimer ist und somit eine Basis für die Nukleation und rapide Aktinpolymerisation schafft (Kelleher, Atkinson et al., 1995). Die Proteine der WASP/WAVE-Familie gehören dabei zu den bekanntesten NPFs (nucleation promoting factors)

Cdc42 induziert Filopodien und kann über Rac-Aktivierung ebenfalls zur Formation von Lamellipodien führen. Wird die Rac-Aktivierung durch einen Inhibitor unterdrückt, so induziert Cdc42 dementsprechend nur die Bildung von Filopodien.

Außerdem können Rac und Cdc42 in ähnlicher Weise wie Rho die Ausbildung von fokalen Komplexen innerhalb von Lamellipodien und Filopodien induzieren (Nobes and Hall, 1995).

1.2.3 Intermediärfilamente

Im Jahre 1968 konnten Ishikawa et al. (Ishikawa, Bischoff et al., 1968) mit Elektronenmikroskop-Aufnahmen Filamente nachweisen, die einen Durchmesser von 7-11 nm hatten, somit in der Größenordnung zwischen Aktin (5-7 nm) und Mikrotubuli (25 nm) lagen und daher als Intermediärfilamente bezeichnet wurden (bzw. auch 10 nm

Filamente). Sie ließen sich weder mit dem Subfragment 1 dekorieren (wie für Aktin gezeigt), noch durch Colchizin depolymerisieren (wie für Mikrotubuli nachgewiesen).

Die Intermediärfilamente besitzen eine gemeinsame, zentrale, stäbchenartige Domäne, welche aus zwei alpha-helikalen Untereinheiten („coiled-coil“) besteht. Flankiert wird diese zentrale Einheit von einem nicht-alpha-helikalen aminoterminalen „Kopf“ und einem carboxyterminalen „Schwanz“ (Parry, 1995). Diese Homodimere polymerisieren zunächst zu Tetrameren und schließlich zu Filamenten mit einem Durchmesser von etwa 10 nm. Diesen Prozess der Intermediärfilament-Polymerisation teilen Herrmann und Aebi (Herrmann and Aebi, 1998) in drei Schritte auf: erstens, die schnelle Bildung (< 10 Sekunden) von etwa 60 nm langen Filament-Einheiten durch laterale Assoziationen von Tetrameren und Oktameren, welche selbst durch antiparallele Anlagerung (ungefähr um die Hälfte der Länge gegeneinander verschoben) von zwei bis vier Dimeren entstehen. Zweitens, die *Elongation* sogenannter „unreifer“ Filamente durch longitudinales Zusammenschließen („annealing“) zu langen Polymeren (> 20 µm) und drittens, die *Verdichtung* („compaction“) von „unreifen“ Filamenten zu „reifen“ Intermediärfilamenten (nach 5 bis 60-minütiger Elongation). Während der Verdichtung kann es zu einem Umrangieren von Dimeren, Tetrameren oder Oktameren kommen, wodurch sich Intermediärfilamente in ihre Protofilamente entwirren können. Dennoch entstehen Intermediärfilamente nicht - wie zunächst angenommen - allein durch den seitlichen Zusammenschluss von Protofilamenten (Herrmann, Haner et al., 1996). Die Selbst-Anordnung wird dabei durch die unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften der einzelnen Keratin-Polypeptide, durch die Wechselwirkung mit Intermediärfilament-assoziierten Proteine, vor allem aber durch posttranslationale Modifikationen und darunter besonders durch Phosphorylierungsvorgängen beeinflusst (Omary, Ku et al., 1998; Coulombe and Omary, 2002).

Unterteilt werden die Intermediärfilamente in 5 verschiedene Typen: saure und basische Keratine, Desmine (z.B. Desmin und Vimentin, welche in Muskelzellen und mesenchymalen Zellen vorkommen), Neurofilamente und Lamine (Vorkommen im Zellkern).

In epithelialen Zellen bilden die Zytokeratine mit ca. 5 % den größten Anteil des Gesamtproteins und haben hier entscheidenden Einfluss auf die Zellarchitektur, -größe und -proliferation, auch über die durch Plakin und die Aramdillo Proteinfamilie vermittelte

Interaktion mit (Hemi-) Desmosomen (Herrmann, Hesse et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Keratine zudem eine funktionelle Rolle in der Zell-Proliferation, dem Zell-Wachstum, dem Organellen-Transport und in der Signaltransduktion ausüben (Betz, Planko et al., 2006; Kim, Wong et al., 2006; Kim and Coulombe, 2007; Magin, Vijayaraj et al., 2007). Die Zytokeratine lassen sich in 2 Subklassen unterteilen, wobei Keratine I die Subtypen K9-K20, Keratine II die Subtypen K1-K8 umfassen. In der Zelle organisieren sich die Zytokeratine als Heteropolymere bestehend aus einem Subtyp der Klasse I und einem Subtyp der Klasse II (Hatzfeld and Franke, 1985). Die Keratine werden über 2 Genfamilien mit mehr als 50 individuellen Mitgliedern kodiert. Oft exprimieren epitheliale Zellen über 10 verschiedenen Keratine (Hesse, Zimek et al., 2004). Über transkriptionale Genregulation und aufgrund spezifischer Eigenschaften der verschiedenen Proteinsequenzen ergeben sich für die unterschiedlichen epithelialen Gewebetypen ganz spezifische Keratinfunktionen und –regulationsmechanismen (Pallari and Eriksson, 2006). Insgesamt zeichnen sich Keratinfilamente durch eine hohe Viskoelastizität und Flexibilität aus, gleichzeitig zeigen sie aber auch eine hohe Stabilität bei Deformation der Zelle: Das gesamte Keratingerüst ist in der Lage, Deformationen nachzugeben, ohne dabei zerstört zu werden, sich stattdessen am Ende des Deformationsstressses in kürzester Zeit wieder in seine Ausgangssituation zu reorganisieren. Diese Fähigkeit beruht auf der Tatsache, dass sich die Keratinuntereinheiten axial aneinander entlang bewegen und so ihre eigentliche Position im Gesamtgefüge behalten können (Magin, Vijayaraj et al., 2007). Die mechanische Stabilisierung der Zelle bzw. ein cytoprotektiver Effekt von Keratinen zeigt sich unter anderem auch in Mutationen der Keratine 5 und 14, welche zum Krankheitsbild der humanen Epidermolysis bullosa simplex (EBS) führen (Fuchs and Cleveland, 1998). Viele der strukturellen und funktionellen Besonderheiten der Keratine werden durch Phosphorylierungs-abhängige Interaktionen mit dem Adapterprotein 14-3-3 reguliert, welches wiederum unter anderem die Proteinsynthese und die Zell-Proliferation mittels des mTOR-Signalweges steuert (Toivola, Nieminen et al., 2001; Kim, Wong et al., 2006; Margolis, Perry et al., 2006). Auch modulieren Keratine den Signal-Downstream von p38 MAPK, TNF-Rezeptoren und Akt (Ku and Omary, 2006). Durch den spezifischen Effekt einer EGF-Rezeptor-Therapie in NSCLC konnte man darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen Tyrosin-Rezeptor-vermittelten Signalwegen und der Organisation des Keratin-Zytoskeletts finden (Lynch, Bell et al.,

2004). Wie in Experimenten mit Zellkulturen durch den Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Orthovanadat gezeigt werden konnte, scheint Hyperphosphorylierung dabei zu einem Zusammenfall des Keratin-Zytoskeletts zu führen, (Strnad, Windoffer et al., 2003). Innerhalb weniger Minuten kommt es zu der vorübergehenden Bildung granulärer Keratin-Aggregate ähnlich denen in SCLC (Strnad, Windoffer et al., 2002). Weiterhin kann dieser Effekt durch den p38 Kinase-Hemmer SB203580 und in geringerem Maße mit dem MAPK Inhibitor PD98059 erzielt werden (Strnad, Windoffer et al., 2002). P38 MAPK aktivierende Gene sind in SCLC erhöht (Windoffer, Woll et al., 2004). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der Großteil der phosphorylierten Moleküle nicht glykolisiert sind, so dass jede Modifikation eine separate Funktion einzunehmen scheint (Chou and Omary, 1993).

In einfachen Epithelien, wie sie in der Lunge, den Nieren, der Leber, im Darm und im Pankreas zu finden sind, aber auch in Karzinomen, die aus diesen Epithelien hervorgehen, sind Zytokeratin 8 (K8) und 18 (K18) die vorherrschenden Intermediärfilamente (Oshima, Baribault et al., 1996). Daneben finden sich unterschiedliche Anteile „sekundärer“ Keratine wie K7, K19, K20 und K23 (Owens and Lane, 2003). Verschiedene in vivo K8/18 Phosphorylierungsstellen wurden identifiziert, die sich allesamt an Serin-Resten in den entsprechenden Kopf- und Schwanzdomänen befinden, darunter K8 Ser-23, Ser-73, Ser-431 bzw. K18 Ser-33 und Ser-52 (Oshima, 1982). Während K8 Ser-23 unter allen Typ II-Keratinen in hoch konservierter Form vorliegt und der Phosphorylierung hier somit eine allgemeine Funktion zugesprochen wird, steigt die Phosphorylierung von K8 Ser-431 während der Zell-Mitose und bei Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie dem EGF an (Ku and Omary, 1997; Stumptner, Omary et al., 2000). K8 Ser-73 hingegen wird vor allem als Antwort auf zellulären Stress wie Hitze oder Drogenexposition (Liao, Ku et al., 1997) und bei Apoptose-Vorgängen (MacFarlane, Merrison et al., 2000) vermehrt in modifizierter Form vorgefunden. Mechanische Stimuli wie Scherkräfte aktivieren dabei auch Kinasen wie die Protein-Kinase C (Liu and Maurice, 1999). Ähnlich verhält es sich mit dem K18 Ser-52 (Ku, Zhou et al., 1999). Die Phosphorylierung von K18 Ser-33 wiederum reguliert während der Mitose die Keratin-Bindung an die 14-3-3 Protein-Familie (Liao and Omary, 1996). K8 und K18 sind dabei Ziele verschiedener Kinasen, wie z.B. ERK1/2 (K8 Ser-431), JNK und p38 (K8 Ser-73), PKA (K8 Ser-23) und Cdc2 Kinase (K18 Ser-33) (Ku and Omary, 2006; Omary, Ku et al.,

2006). Aber auch Phosphatasen wie die Protein Phosphatasen 1 und 2A scheinen eine wichtige Rolle zu spielen (Tao, Toivola et al., 2006).

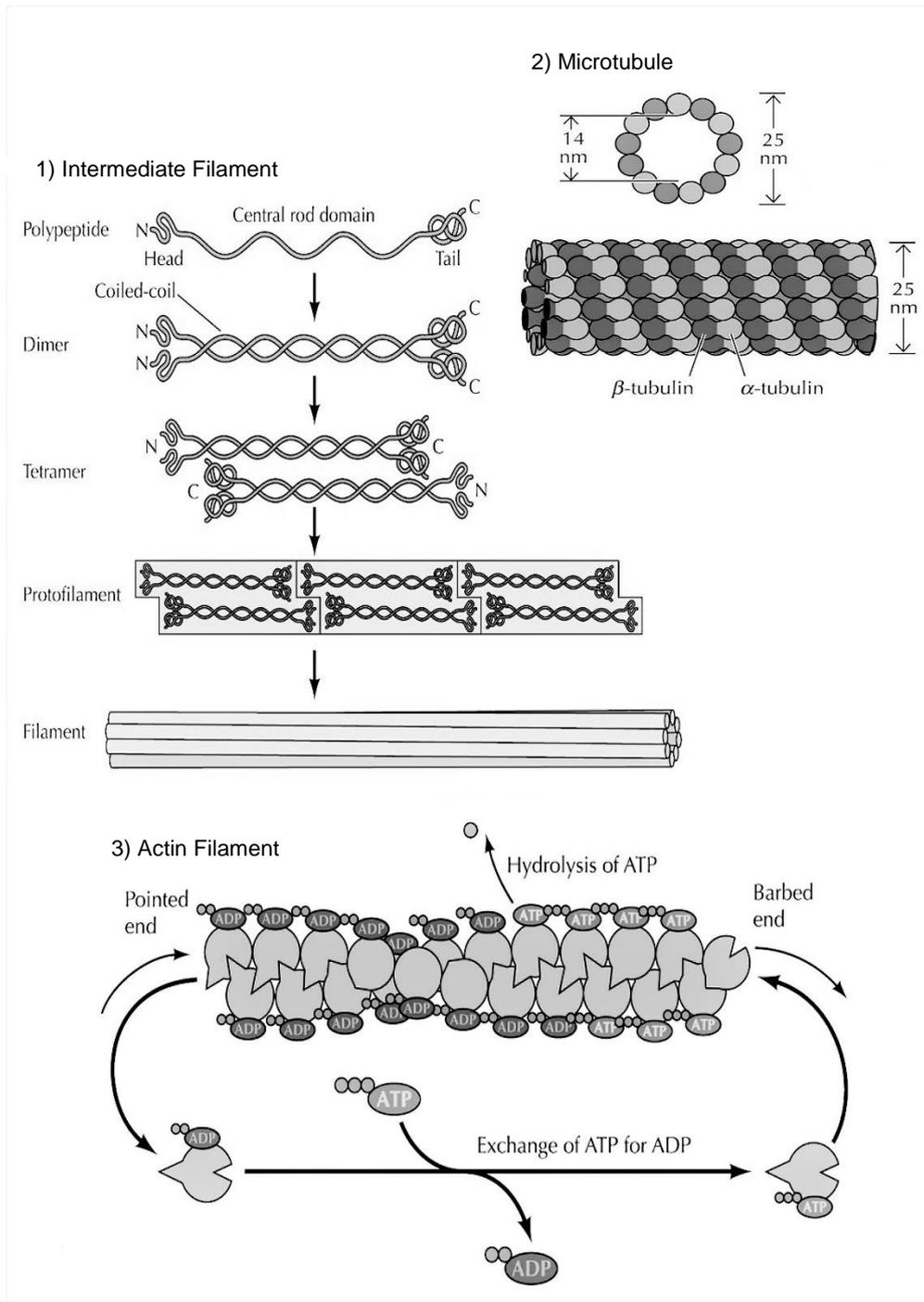
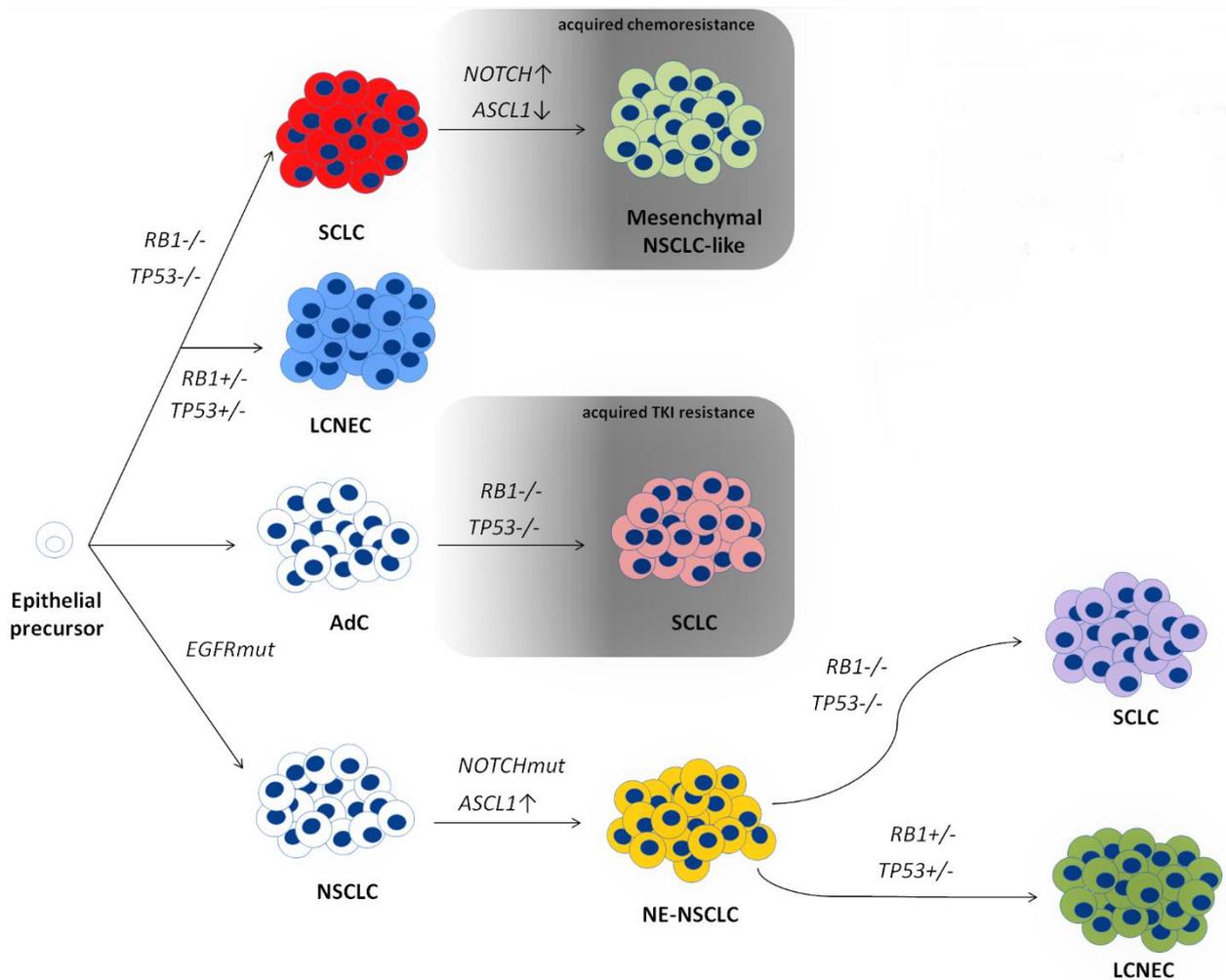


Abb. 2: Die einzelnen Komponenten des Zytoskeletts in einer Übersicht. Die Bilder wurden nach der 4. (1 und 2) bzw. 5. Edition (3) von Bruce Alberts „Molecular biology of the cell“ adaptiert.

1.3 Zielsetzung

Molekularbiologisch konnte gezeigt werden, dass kleinzellige Tumoren von einer neuroendokrinen Vorläuferzelle ausgehen (Abb. 3), während NSCLC ihren Ursprung in einer anderen Stammzelle haben (Sutherland, Proost et al.). Nichtsdestotrotz zeigen Adeno-Karzinome unterschiedlicher Herkunft (Prostata, Ovar etc.) häufig eine Tumorkomponente mit kleinzelliger Differenzierung. Dieser kleinzellige Phänotyp zeichnet sich durch folgende Merkmale aus:

Kleines Zytoplasma, kondensiertes perinukleäres Keratingerüst, Fehlen von E-Cadherin und Desmosomen, Einzelzelligkeit, aggressives Wachstum.



Tumor cells

Abb. 3: Modell einer SCLC-Induktion aus verschiedenen Vorläuferzellen, postuliert von Lydia Meder (Meder, König et al.).

Die Mechanismen, die für die Entwicklung dieses Phänotyps führen, sind klinisch hochrelevant und die zentrale Fragestellung dieser Arbeit. Auf folgende Punkte soll ein besonderes Augenmerk gelegt werden:

1. Führt der Verlust eines funktionellen Zytoskelettes, insbesondere von Keratinen, zu einem kleinzelligen Phänotyp und einer aggressiveren Tumor-Biologie?
2. Welche Kinasen und/ oder Phosphatasen können für den Aufbau des Zytoskeletts von entscheidender Rolle sein? Gibt es hierunter Kinasen/ Phosphatasen, welche über eine Hyperphosphorylierung zum Zusammenfall des Keratin-Zytoskeletts führen?

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

RPMI Medium 1640 (benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute) und PBS (phosphat buffered saline) wurden von GIBCO (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), das fötale Kälberserum (FCS) sowie Trypsin-EDTA von PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) erworben. Die Versuche wurden mit verschiedenen humanen NSCLC und SCLC, die von ATCC (Manassas, Virginia, USA) bzw. dem Institut für klinische Immunologie der Universität Groningen (Groningen, Niederlande, betrifft die Zelllinien GLC-1, GLC-2 und GLC-36) bezogen wurden, durchgeführt. Die verwendeten Zellen (Tab. 1) wurden in RPMI oder IMDM mit je 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % Glutamin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 90 % passagiert.

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten humanen Lungenkarzinom-Zellreihen

NSCLC		SCLC	
Zelllinie	Medium	Zelllinie	Medium
A549	IMDM	GLC1	RPMI
H1838	RPMI	GLC02	RPMI
H1975	RPMI	GLC36	RPMI
H3255	RPMI	H187	RPMI
H358	RPMI	N417	RPMI
HCC827	RPMI		

2.2 Tumorproben

Alle verwendeten Tumorproben stammen aus dem Archiv des pathologischen Instituts der Universität Bonn und wurden anhand folgender Kriterien selektiert:

- ❖ Die Läsion entspricht einem Bronchialkarzinom, entweder mit primärem Sitz in der Lunge oder auch extrapulmonal als Metastase.
- ❖ Ausreichendes Gewebe wurde archiviert.
- ❖ Das Operationsdatum liegt nicht vor 1996.

Routinediagnostik:

Im Rahmen der Routinediagnostik bei Lungentumoren wurden die Bronchialkarzinome formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Histologische Schnitte wurden nach Standardprotokollen gefärbt (z.B. Hämatoxylin-Eosin oder Periodsäure-Leukofuchsin). Alle Läsionen wurden eindeutig als primäre Bronchialkarzinome identifiziert und nach den Leitlinien der WHO klassifiziert.

Lagerung der Proben:

In Paraffin eingebettetes Tumorgewebe wurde im kühlen, trockenen und dunklen Archiv gelagert und chronologisch nach Eingangsdatum sortiert.

2.3 Tissue Microarrays

Der Tissue Microarray (TMA) ist eine Untersuchungsmethode, mit der eine große Anzahl von Gewebeproben kostengünstig und effizient histologisch untersucht werden können. In TMA werden Gewebstanzen verschiedener Proben in einem Paraffinblock vereinigt, wodurch es möglich ist, multiple Proben simultan zu untersuchen und aufgrund derselben Behandlung, denen die verschiedenen Stenzen ausgesetzt sind, zu vergleichen.

Herstellung von Tissue Microarrays (Abb.4):

Zunächst musste ein leerer Paraffinblock als Matrize für die Gewebstanzen gegossen werden (TMA-Block). Hierfür wurde 67 °C warmes Paraffin in eine 1,5 cm x 4 cm x 2 cm große Gussform gefüllt und anschließend für mindestens 2 Stunden zum Abkühlen auf eine Kälteplatte gelagert. Eine glatte und gerade Oberfläche wurde durch Anschneiden im Mikrotom geschaffen. Da sich Paraffin umso leichter schneiden lässt, je härter es ist, wurde der Block vor dem Anschneiden noch kurz auf 4 °C abgekühlt. Wenn keine Risse oder Luftblasen enthalten waren, stand der TMA-Block zur Verwendung bereit.

Nun wurden auf HE-Schnitten repräsentative Tumoreareale markiert, um dann in einem zweiten Schritt gezielt Gewebezylinder aus den originalen Paraffinblöcken zu gewinnen. Die Gewebsstanzen wurden anschließend mittels einer Hohnadel in vorgefertigte Löcher des TMA-Blocks mit einem Durchmesser von 1,5 mm und einer Tiefe von 10 mm eingeschoben.

Pro Probe wurden mindestens drei Tumorgewebszylinder entnommen. Zur Übersicht beim Mikroskopieren wurden die Stanzen in 9er Gruppen (3 x 3) angeordnet. Innerhalb einer Gruppe trennten 1,7 mm Paraffin die einzelnen Stanzen, zwischen den Gruppen waren es 2,4 mm.

Es wurden insgesamt 3 TMA-Blöcke hergestellt, davon einer mit Adenokarzinomen (n=44), 1 mit Plattenepithelkarzinomen (n=44) und 1 mit SCLCs (n=41). Für immunhistochemische Färbungen wurden 2-3 µl dicke Schnitte angefertigt und auf Kapillarspalt-Objektträger aufgezo-

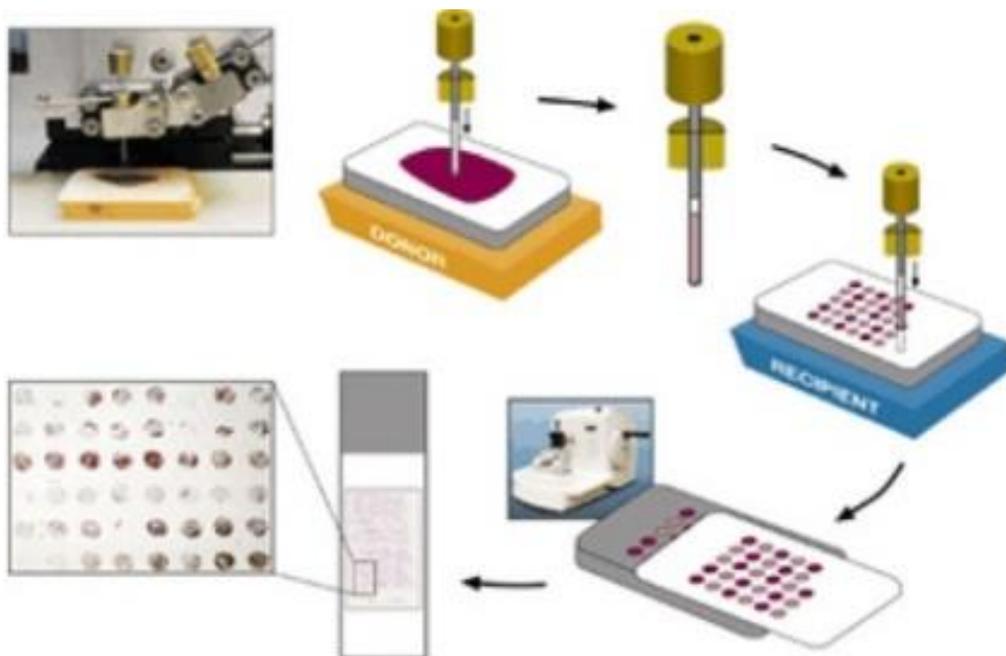


Abb. 4: TMA-Produktion

Tissue Microarrays ermöglichen eine schnelle und kostengünstige Analyse von Gewebeproben. Zunächst werden die gewünschten Tumoreareale auf HE-Schnitte markiert, um gezielt Gewebezylinder aus den Paraffinblöcken zu stanzen. Diese Tumorstanzungen werden dann in vorgebohrte Löcher des TMA-Blocks eingefügt. Histologische Schnitte können nun vom TMA-Block angefertigt werden. (Prasad, Zimmermann et al.)

2.4 Immunhistochemie

Antikörper:

Die Antikörper gegen DUSP6, PKAC α , PKAC2 β , MARCKS und SMG1 wurden kommerziell von Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, Kalifornien, USA) erworben. Der Antikörper gegen AKAP2 stammt von Abcam (Cambridge, England), der Antikörper gegen AKAP11 wiederum von der Abnova Coporation (Tapei, Taiwan). Der FHL-2 Antikörper wurde durch Aviva Systems Biology (San Diego, Kalifornien; USA) bezogen. Die immunhistochemische Darstellung dieser Antigene gehört nicht zum Routineprogramm des Pathologischen Institutes der Universität Bonn. Die Verdünnungen der Primärantikörper mussten daher individuell angepasst werden. Als Ausgangspunkt dienten die empfohlenen Richtwerte der Hersteller. Alle Antikörperverdünnungen wurden primär auf Schnittpräparaten von 10 Adenokarzinomen, 10 Plattenepithelkarzinomen und 10 SCLCs getestet und gemeinsam mit Herrn PD Dr. med. L. Heukamp (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn) ausgewertet. Tabelle 2 gibt die jeweils verwendeten Verdünnungen an. Diese wurden auch für die TMA-Schnitte genutzt.

Tab. 2: Übersicht der immunhistochemisch verwendeten Antikörper. ÜN = über Nacht, MW = Mikrowelle, DK = Dampfkocher

Antikörper	Quelle	Verdünnung	Vorbehandlung
AKAP2	Kaninchen, polyklonal	1:100 ÜN	MW
AKAP11	Kaninchen, polyklonal	1:100	MW
PKACα	Maus, monoklonal	1:200	DK
PKAC2β	Kaninchen, polyklonal	1:500 ÜN	MW
DUSP6	Ziege, polyklonal	1:50 o. 1:100	DK
MARCKS	Ziege, polyklonal	1:100	MW
SMG1	Kaninchen, polyklonal	1:400	MW

Färbung:

Die Schnitte wurden nach der Avidin-Biotin-Methode gefärbt. Diese Methode beruht auf der starken Affinität von Avidin zu dem wasserlöslichen Vitamin Biotin. Avidin ist ein aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliertes Protein mit 4 Bindungsstellen für Biotin. Zuerst wird ein unkonjugierter Primärantikörper eingesetzt, der gegen ein bestimmtes Epitop des im Gewebe gesuchten Antigens gerichtet ist. Ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper ist gegen das Fc/Fab-Fragment des Primärantikörpers gerichtet und reagiert im zweiten Schritt mit diesem. Im dritten Schritt erfolgt die Inkubation mit dem Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex mit daraus resultierender Bindung des Avidin an das Biotin des Sekundärantikörpers. Mit Hilfe einer geeigneten chromogenen Substratlösung – stabile Pufferlösung aus Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) – wird die Peroxidase und somit das gesuchte Antigen in Form eines rosaroten Farbstoffes für das Lichtmikroskop sichtbar gemacht. Als Gegenfärbung wird die blaue Hämatoxylinfärbung benutzt.

Zunächst mussten die Schnitte deparaffinisiert werden. Hierfür wurden sie 10 min in Xylol (Merck) gebadet, anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe – 10 min in absolutem Alkohol, kurz in 96- %igem, 70- %igem und 50- %igem Alkohol - geführt und letztlich in Tris-Puffer (Merck) gespült. Zur Vorbehandlung wurden die Schnitte daraufhin entweder für 30 min bei 600 W in die Mikrowelle oder aber für 30 min bei 125 °C in den Dampfkocher - jeweils in Epitop-Retrieval-Lösung (Citratpuffer, pH 6,0, Merck) – gestellt. Nach einer zwanzigminütigen Abkühlphase bei Raumtemperatur kamen die Schnitte dann zum Abblocken unspezifischer Eiweiße für 10 min in Schweineserum (1:5 in Tris-Puffer verdünnt).

Die Färbung mittels der Avidin-Biotin-Methode erfolgte semiautomatisch mit dem DAKO TechMate 500 (Dako). Zur Inkubation mit den Primärantikörpern wurden diese zu je 250 µl in der entsprechenden Verdünnung mit Antibody-Diluent (Dako) für 1 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4 °C aufgetragen. Die übrigen benötigten Reagenzien – Buffer Kit (Dako), das unter anderem die Sekundärantikörper und den Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex enthaltene Detections Kit (Dako), Blocking Solution (Dako) zum Abblocken der endogenen Peroxidase und Mayer's Hämalaun zur Gegenfärbung - wurden in die Reagenzgefäße pipettiert. Die Färbungen wurden nach

Starten des Gerätes nach Färbeprotokoll durchgeführt. Schließlich wurden die gefärbten Schnitte mit dem wasserlöslichen Eindeckmittel Aquadex (Merck) eingedeckelt.

Auswertung:

Alle Schnitte wurden auf ihre Färbeintensität, Menge und Spezifität beurteilt. Wir implementierten ein 4-stufiges Punkteschema (Abb. 5).

- ❖ keine oder unspezifische Hintergrundfärbung; 0
- ❖ schwache diskontinuierliche Färbung; +1
- ❖ moderate aber eindeutige Färbung; +2
- ❖ starke vollständige Färbung; +3

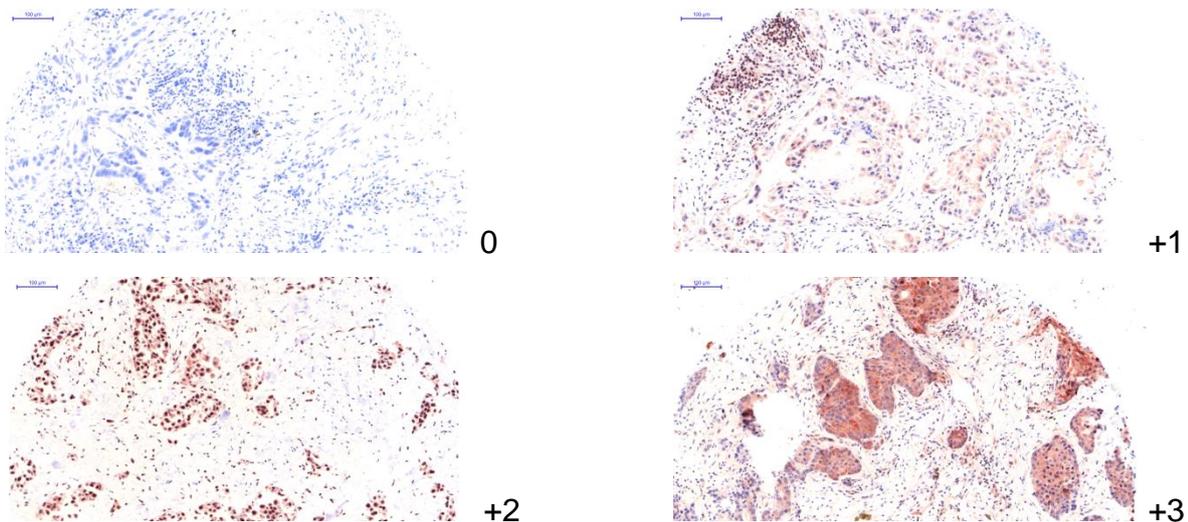


Abb. 5: Bewertungsschema der Färbeintensität

2.5 Small interfering RNA (siRNA)-Transfektion

SiRNA ist ein Spaltprodukt längerer Doppelstrang-RNA und wird durch RNA-abhängige RNA-Polymerasen oder beidseitige Transkription eines Gens hergestellt. Die siRNA wird vom sogenannten RNA-induced silencing complex (RISC) gebunden. In ihm löst sich ein Strang der siRNA, so dass der RISC aktiviert wird. Der gebundene Antisense-Strang der siRNA, auch „guide“-Strang genannt, bindet nun sequenzspezifisch an die mRNA, wodurch diese gespalten und von Endonukleasen abgebaut wird.

Die Transfektion der siRNA in den verschiedenen Zellreihen der NSCLCs und SCLCs erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin (Invitrogen, Karlsruhe). Es besteht aus einer Mischung aus kationischen und neutralen Lipiden und führt so über die Bildung von Liposomen zu einer Endozytose der siRNA und Abgabe dieser in die Zellen. Verwendet wurden die den o.g. Antikörpern entsprechenden siRNA der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Die verwendeten Zellreihen sollten in einer Dichte von 30-50 % vorliegen. Für die Transfektion einer T-75 Kulturflasche mit 10 ml Medium ohne Antibiotika-Zusatz wurden zum einen 980 µl Opti-MEM Reduced Serum Medium with GlutaMAX (Invitrogen, Karlsruhe) mit 20 Lipofectamin, zum anderen die zum Erreichen der jeweils notwendigen Molarität benötigten Menge an siRNA (in µl) und Opti-MEM ad 1ml miteinander gemischt. Die Mixturen wurden zunächst für 5 min, dann nach ihrem Zusammenfügen für weitere 25 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der Inkubation wurde der siRNA/Lipofectamin-Komplex schließlich den Zellen beigegeben. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einer nicht-genomischen siRNA- Sequenz transfiziert wurden, der sog. scrambled-siRNA (scr-siRNA). Die Nukleotide dieser siRNA besitzen eine zufällige Reihenfolge und haben somit keine Zielsequenz im Transkriptom der Zelle. Experimente wurden 24 h nach der Transfektion durchgeführt.

2.6 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Zur photometrischen Quantifizierung kam der NanoDrop der Firma Thermo Scientific zu Einsatz.

2.7 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Für PCR- und viele Microarray-Anwendungen muss aus RNA eine cDNA hergestellt werden. Diese wird aus mRNA in Gegenwart von Desoxynukleotiden, dem entsprechenden Reaktionspuffer und durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) synthetisiert. Zusätzlich müssen Primer-Moleküle vorliegen, an denen das Enzym mit der Synthese beginnen kann. Als Matrize dient die zuvor isolierte totale RNA (in dieser ist zu einem Teil mRNA vorhanden).

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ (Invitrogen, Karlsruhe, D) wie folgt:

Je 1,2 µg Gesamt-RNA wurden mit 1,5 µl OligoDT, 1,5 µl dNTP und ad 19,5 µl H₂O auf Eis zusammen pipettiert. Zudem wurden – ebenfalls auf Eis – 6 µl 5X First-Strand Buffer, 1,5 µl 0,1 M DTT, 1,5 µl RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor sowie 1,5 µl SuperScript III Reverse Transcriptase vermischt. Die beiden Ansätze wurden zusammengefügt und dann für 5 min bei 65 °C, für 1 h bei 50 °C und schließlich zur Inaktivierung des Enzyms für 15 min bei 75 °C inkubiert.

Zur photometrischen Quantifizierung der cDNA-Menge wurde ebenfalls der NanoDrop der Firma Thermo Scientific benutzt.

2.8 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) dient der in vitro-Vervielfältigung klar definierter DNA-Sequenzen. Hierbei wird der Sequenzbereich durch kurze Oligonukleotide, den sogenannten Primern, abgegrenzt.

Für die PCR wurden 1-10 µl der DNA (abhängig von der Konzentration), 0,75 µl MgCl₂, 2,5 µl 10x-PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl), 0,5 µl dNTP (10 mM), jeweils 0,5 µl sense und antisense Primer (10 µM) sowie 0,2 µl Platinum Taq-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in ein PCR-Gefäß pipettiert. Die Mischung wurde auf ein Gesamtvolumen von 25 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Primer

Alle Primer wurden von Sigma-Aldrich Co. (Hamburg, Deutschland) erworben. Detaillierte Information zu den einzelnen Primern sind in Tabelle 3 aufgeführt.

PCR-Verlauf:

Die PCR-Zyklen wurden wie folgt in den PTC-200 Thermo Cycler (MJ Research, Waltham, USA) eingegeben:

- 1) 4 min Vorheizen auf 95 °C
- 2) 30 s bei 95 °C; Denaturierung
- 3) 30 s bei oben genannter Schmelztemperatur; Annealing

- 4) 30 s bei 72 °C; Extension
 5) Schritte 2 bis 4 zweiunddreißig Mal wiederholen
 6) 30 s bei 72 °C; endgültige Extension
 7) bis zum Abbruch bei 4 °C

Alle PCR-Produkte wurden anschließend mittel Agarose-Gel-Elektrophorese kontrolliert.

Tab. 3: Informationen über die verwendeten Primer. bp = Anzahl der Basenpaare, T_m = Schmelztemperatur (in C°). A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

Name	Sequenz	bp	T _m
AKAP2 F	5' – AGCTTGCAGCCTGACTTAGC – 3'	137	57
AKAP2 R	5' – TCGAGGACACTACTATCATCC – 3'		
AKAP11 F	5' – TGCTCATATACAGGATTTAGCTGC – 3'	160	63
AKAP11 R	5' – AGAAGGATGACTCTGATTTAGAGG – 3'		
DUSP6 F	5' – AAGGTGGCTTCAGTAAGTTCC – 3'	135	59
DUSP6 R	5' – AGGAAGAGTCAGAGCTGATCC – 3'		
MARCKS F	5' – TGCCCAGTTCTCCAAGACCG – 3'	168	66
MARCKS R	5' – ACGTGGCCATTCTCCTGCC – 3'		
PRKACA F	5' – ACATTCAGGTGACAGACTTCG – 3'	115	57
PRKACA R	5' – TTGTTGTAGCCTTTGCTCAGG – 3'		
PRKAR2B F	5' – TGCCTCAGTATGTGCAGAAGC – 3'	142	58
PRKAR2B R	5' – ATCCAGATTCTTAAACAGCAGG – 3'		
SMG1 F	5' – TGCACCATGGAGAGGAATTATTCC – 3'	114	65
SMG1 R	5' – TATGAGATGTGGGGAATCTTGAGC – 3'		

2.9 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mit 1-2- %igen Agarosegelen in einer horizontalen Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer als Laufmittel. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose unter Erhitzen in TAE-Puffer gelöst und mit 1- %iger Ethidiumbromid-

Lösung in einer Endkonzentration von 0,8 µg/ml versetzt. Die Auftrennung wurde für ca. 30 min bei einer konstanten Spannung von 120 V durchgeführt. Mit Hilfe des Geldokumentationssystems Gel Jet Imager (INTAS, Brüssel, Belgien) wurden die Gele fotografiert und schließlich ausgewertet.

2.10 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR (kurz qRT-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, zudem aber die Quantifizierung der eingesetzten cDNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden (daher der Name „Real Time“). Am Ende eines aus mehreren Zyklen bestehenden Laufes wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in dieser Phase herrschen optimale Reaktionsbedingungen, die eine korrekte Quantifizierung erlauben.

Eine Möglichkeit der Quantifizierung der PCR-Produkte ist die Nutzung von DNA-Farbstoffen wie z.B. SYBR Green I. Diese Fluoreszenzfarbstoffe lagern sich in die DNA ein (interkalieren) bzw. binden an die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der Target-DNA von Zyklus zu Zyklus korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz. Die Messungen finden jeweils am Ende der Elongation statt. Der sogenannte Ct-Wert (engl. *Cycle Threshold* für Schwellenwert-Zyklus) beschreibt dabei den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Die RTq-PCR wurde in 384-Well-Platten in 3-fach-Ansätzen durchgeführt. Es wurden 1 µl cDNA, 5 µl LightCycler SYBR Green I Master Mix (Roche), 0,5 µl forward und reverse Primer und 3 µl H₂O gemischt. Das Reaktionsvolumen betrug somit 10 µl. Im TaqMan von Applied Biosystems wurde folgendes Programm eingestellt:

- 1) 2 min vorheizen auf 50 °C
- 2) 10 min bei 95 °C; Denaturierung
- 3) 15 sec bei 95 °C; Annealing
- 4) 1 min bei 60 °C; Extension
- 5) Ablesen der Platte

6) Schritte ab 3 vierundvierzig Mal wiederholen

7) 7 min bei 72 °C; endgültige Extension

8) bis zum Abbruch bei 10 °C

Bei jedem Lauf wurde eine NTC (*no template control*, Kontrolle ohne DNA) mitgeführt. Als passive Referenz wurde der ROX-Farbstoff verwendet.

2.11 Proteinisolation

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in kaltem PBS gewaschen, in 100 µl RIPA-Puffer aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die dadurch gewonnenen Lysate wurden 20 min bei 4 °C und 13200 rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden direkt verwendet bzw. bei -20 °C gelagert.

2.12 Proteinbestimmung (nach Bradford)

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford bestimmt. Hierbei wird ausgenutzt, dass der Coomassie-Farbstoff Brilliant-Blau in saurer Lösung an Proteine bindet, was eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 495 nm auf 595 nm zur Folge hat. Durch Mitführen einer BSA-Eichreihe (0-10 µg/ml BSA) als interner Standard kann die Proteinkonzentration aus der Eichgeraden berechnet werden. 20 µl des Farbstoffes wurden mit 80 ml H₂O gemischt. Je 100 µl dieser Arbeitslösung wurde zu 1 µl einer 1:10 Verdünnung der zu messenden Proteine gegeben. Die Messung der Extinktion erfolgte in flachbödigen 96well-Mikrotiterplatten, die in einem EL 800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, Vt.) bei 595 nm ausgewertet wurden. Es wurden jeweils Doppelwerte gemessen und der Mittelwert für die Berechnung der Proteinkonzentration verwendet.

2.13 Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

SDS-PAGE:

Die am häufigsten verwendete Methode der Proteinelektrophorese ist die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS). Dabei werden denaturierte Proteinuntereinheiten im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Fertiggelsystem NuPAGE® Novex Bis-Tris Mini Gels der Firma Invitrogen verwendet. Zwischen 20 µg und maximal 60 µg der Proben wurden mit 1,6 µl Reducing Agent (10x, Invitrogen), 4 µl LDS Sample Buffer (4x, Invitrogen) und de-ionisiertem H₂O bei einem Endvolumen von 16 µl versetzt und nach 5 min bei 95 °C zur Denaturierten in die jeweiligen Gel-Taschen gegeben. Als Molekulargewichtsmarker diente PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas) mit der Größenordnung von 10-170 kDa. Die SDS-Gelelektrophorese fand in SDS Running Buffer unter einer konstanten Spannung von 200 V für 1 h statt.

Western Blot:

Der Western Blot gliedert sich in zwei Arbeitsschritte.

Im ersten Schritt werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden im elektrischen Feld in einem Nass Blot-Verfahren auf speziell darauf ausgerichtete Kunststoffmembranen transferiert (Transferschritt).

Dazu wurde das Blot-Modul mit Gel, Schaumstoff-Pads, Filterpapieren und der Nitrozellulose-Membran entsprechend der Herstellerangaben beladen und mit NuPAGE® Transfer Buffer (1:20) innen aufgefüllt. Außen wurde destilliertes H₂O beigefügt. Eventuelle Luftblasen wurden vorsichtig entfernt. Der Transfer erfolgte bei 30 V für 1-2 h und wurde abschließend mit Ponceau-S-Lösung angefärbt, um mittels der Intensität dieses an Protein bindenden roten Farbstoffs die lokale Effizienz des Elektrotransfers zu prüfen.

Im zweiten Schritt erfolgt dann die Bindung und Detektion von Antikörpern an die transferierten Proteine auf den Kunststoffmembranen.

Zur Durchführung des immunologischen Nachweises wurde die Membran zunächst 1-2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit 5 % Milchpulver/ TBS-T (0,2 % Tween)

versetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht, die der Sekundärantikörper (nach sechsmaligem Waschen für 5 min mit TBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur. Alle Antikörper wurden in 5 % BSA/ TBS-T verdünnt. Die verschiedenen Proteinbanden wurden nach einem erneuten Waschschrift über ein Chemilumineszenz-System (ECL®, Amersham, Pharmacia Biotech, Braunschweig, Deutschland) detektiert, die unterschiedlichen Proteinexpressionen mittels eines Bild-Analyse-Software-Programms (Kodak 1D, Scientific Imaging Systems, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) quantifiziert und entsprechend des mitgelaufenen β -Aktin-Levels normiert.

2.14 MTT-Test

Der MTT-Test ist eine Methode zur Bestimmung von Wachstum und Lebensfähigkeit von Zellen. Er misst die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen unabhängig davon, ob sie gerade DNA synthetisieren oder nicht. Das schwach gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazoliumbromid (MTT) dringt in die Zellen ein, sein Tetrazoliumring wird durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgebrochen und es entsteht das alkohollösliche, dunkelblaue Formazan. Die Menge des so gebildeten Formazan korreliert mit der Anzahl vitaler Zellen. Das Detergenz SDS lysiert die Zellen und setzt das Formazan frei. Die Intensität der Formazanlösung wird photometrisch bestimmt.

Versuchsaufbau (schematisch):

- Tag 1: siRNA-Transfektion (s.o.)
- Tag 2: Aussaat der gewünschten Zellzahl in je 5 Kavitäten einer 96-Well-Zellkulturplatte in 100 Medium mit 2 % bzw. 5 % FCS
- Tag 4: 10 μ l der MTT-Stammlösung 1 (Sigma, Steinheim), nach mindestens 4 h
100 μ l der MTT-Stammlösung 2
- Tag 5: photometrische Messung bei 560 nm

Zwischen den einzelnen Tagen wurden die Zellen in den Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und dampfgesättigter Atmosphäre gestellt.

2.15 Wundheilungsassay (scratch-assay)

Um die migratorischen Fähigkeiten von Zellen zu untersuchen, wurde ein sogenannter scratch-assay durchgeführt. Dazu wurden in jede Vertiefung einer TC-treated Culture-Insert 24-well-Platte (Ibidi, München, Deutschland) $5\text{-}10 \times 10^3$ siRNA-transfizierte Zellen ausgesät und für 24 h bis zur vollständigen Konfluenz bei $37\text{ }^\circ\text{C}/ 5\text{ }\%$ CO_2 im entsprechenden Wachstumsmedium (ohne Antibiotika-Zusatz) kultiviert. Mit Hilfe einer sterilen Pinzette konnten die Einsätze entfernt werden; die so entstandenen Lücken bildeten den Wundbereich. Die Einwanderung der Zellen in diesen zellfreien Bereich wurde regelmäßig mikroskopisch und durch Aufnahmen von Digitalbildern dokumentiert.

2.16 Boyden-Kammer Experiment/ Transwell-Migrations-Assay

Zur Testung der Invasivität wurde ein Boyden-Kammer-Modell (Costar, Cambridge, USA) verwendet. Die Kammer besteht im Wesentlichen aus 2 Kompartimenten, einem oberen und einem unteren, die durch eine Polycarbonat-Membran mit Poren voneinander getrennt sind. In das untere Kompartiment wird eine Lösung mit einer Stimulanz gefüllt, in das obere die zu testenden Zellen. Ist ein adäquater Anreiz gegeben, fangen die Zellen an, dem Konzentrationsgefälle entgegengesetzt durch den Filter zu wandern. Nach Fixierung und Färbung lassen sich die auf der Unterseite der Membran befindlichen Zellen zählen.

Jeweils 5×10^4 Zellen (siRNA-transfizierte und Kontroll-Zellen) wurden in $100\text{-}150\text{ }\mu\text{l}$ Wachstumsmedium mit $0,5\text{ }\%$ FCS (aber wieder ohne Zugabe von Antibiotika) in einem Transwellfilter (Corning, New York, USA, Porengröße $5\text{ }\mu\text{m}$) ausgesät und für maximal 24 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}/ 5\text{ }\%$ CO_2 in einer 12-Well-Platte mit je $500\text{ }\mu\text{l}$ Wachstumsmedium (mit $10\text{ }\%$ FCS) kultiviert. Nach der Entfernung des Mediums und der Säuberung der Membran mit einem Wattestäbchen wurden die Zellen mit $4\text{-}\%$ igem PFA bei 15 min Raumtemperatur fixiert, dann für 20 min mit Hämalaun gefärbt. Die Einsätze wurden anschließend mit Wasser gewaschen, wobei die anhaftenden Zellen blau gefärbt blieben. Zellen, die sich oben auf der Filtermembran befanden, wurden mittels Wattestäbchen entfernt. Durch die Poren migrierte Zellen wurden nach vorsichtiger Ablösung der Membran mikroskopisch erfasst und ausgezählt. Für jede Auswertung wurden vier zufällig ausgewählte

Gesichtsfelder näher betrachtet. Die Kontrollen wurden jeweils auf 100 % gesetzt und die gemessene Migration der weiteren Zellen darauf bezogen.

2.17 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS steht für Fluorescence Activated Cell Sorting) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Hierzu werden Zellen in Suspension in einem Flüssigkeitsstrahl einzeln an einem Laser vorbeigeführt. Das Licht, das die Zelle hierbei streut, wird über einen Photomultiplier detektiert. Dabei gilt das Vorwärtsstreulicht, der sogenannte Forward Scatter (FSC), als ein Maß für die Beugung des Lichtes im flachen Winkel und ist abhängig vom Zellvolumen, wohingegen das Seitwärtsstreulicht, der Sideward Scatter (SSC), ein Maß für die Brechung des Lichtes im rechten Winkel ist und Auskunft über Größe und Granularität der Zelle gibt. Grundlage für die quantitative Analyse ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird.

Pro Well einer 96-Well-Platte (round bottom) wurden 2×10^5 Zellen mit 100 μ l 4 % PFA für 10 min im Kühlschrank fixiert und anschließend für weitere 15 min bei 4 °C mit 100 μ l mit Saponin inkubiert. Die Primärantikörper wurden 1:50, die Sekundärantikörper 1:500 in 50 μ l FACS-Puffer (PBS plus 0,2 % BSA) verdünnt und jeweils für 30 min im Kühlschrank wirken gelassen. Die Zellen wurden zwischen den einzelnen Schritten ebenfalls mit FACS-Puffer gewaschen und letztendlich im Selbigen (200 μ l) resuspendiert. Für die Durchflusszytometrie wurde das Gerät FACS canto (FACS canto, BD Biosciences, Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes, NJ, USA) verwendet; zur Datenanalyse wurde das Programm FACS DiVa (FACS DiVa Software, BD Biosciences, Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes, NJ, USA) benutzt. Dabei wurden zunächst über die Parameter FSC und SSC mindestens 5.000 Signale aufgenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Metaanalyse von Expressionsarray-Daten

Wie in der Einleitung beschreiben, wird das Keratinzytoskelett durch Kinasen und Phosphatasen reguliert. Die Hypothese ist, dass eine differentielle Expression von Kinasen und Phosphatasen verantwortlich für die Kondensation des Keratinzytoskeletts in SCLC ist (Beer, Kardia et al., 2002; Kaderali, Zander et al., 2006; Zander, Yunes et al., 2006). Um möglicherweise signifikant differentiell exprimierte Gene regulierender Kinasen und Phosphatasen zu identifizieren, wurden in Kooperation mit der AG Zander des Max-Planck-Institutes in Köln Affimetrix cDNA Array-Daten von 53 NSCLC und 51 SCLC Zelllinien reanalysiert (Abb. 6). Unter einer großen Auswahl möglicher Kandidaten wurden diejenigen erwählt, deren biologischer Eindruck für die Fragestellung am relevantesten schien. Ein Überblick gibt Tabelle 4.

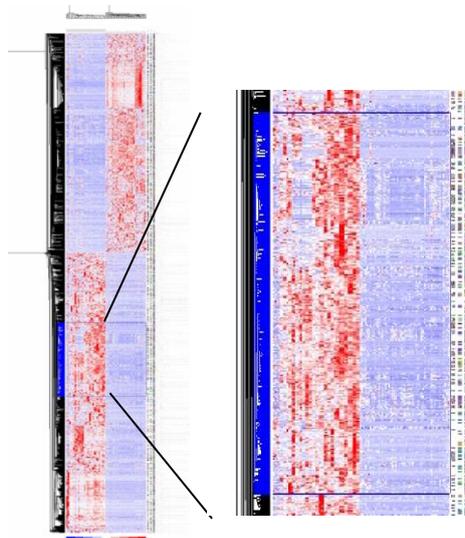


Abb. 6: hierarchische Clusteranalyse von NSCL und SCLC Zelllinien

Die hierarchische Clusteranalyse der 53 NSCLC und 51 SCLC Zelllinien zeigt eine teils signifikante differentielle Expressierung an Genen mit Beteiligung in der Kinase-Aktivität-Regulation. Die Daten der NSCLC Proben wurden von Affymetrix-U133A Arrays (Beer, Kardia et al., 2002; Kaderali, Zander et al., 2006), die der SCLC Proben von der GEO database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) generiert.

Tab. 4: Übersicht der gewählten Kinasen und Phosphatasen bzw. ihrer Signal-regulatoren mitsamt kurzer Funktionsbeschreibung

Gen	Name	Funktion
AKAP2	A kinase (PRKA) anchor protein 2	Regulierung des Zytoskeletts und von Membranstrukturen anderer Organellen (z.B. des Golgi-Apparates) (Welch, Jones et al.)
AKAP11	A kinase (PRKA) anchor protein 11	
PKACα	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha	
PKAC2β	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta	
DUSP6 = MKP3	dual specificity phosphatase 6 bzw. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 3	Zellproliferation und – differenzierung, s. ERK pathway (Chan, Liu et al., 2008)
FHL2	four and a half LIM domains 2	Organisation des Zytoskeletts Organentwicklung Onkogenese (Konig, Diehl et al.)
LyGDI	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	Zellpolarität, -motilität, Tumorprogression (Dransart, Morin et al., 2005)
MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	Zellproliferation, Zellmigration (Kalwa and Michel)
MARK1	microtubule affinity-regulating kinase 1	Determination der Zellpolarität Kontrolle des Zell-Zyklus intrazelluläre Signaltransduktion Transport Zytoskelett (Matenia and Mandelkow, 2009)
SMG1	suppressor with morphogenetic effect on genitalia family member (PI-3-kinase-related kinase SMG1)	Zellproliferation, Angiogenese, Zellmigration (Chen, Yang et al., 2009)

3.2 Generation von Tissue-Microarrays

Um zu zeigen, dass die oben genannten Gene auch in Primärtumoren (und nicht nur in Zelllinien) differentiell zwischen NSCLC und SCLC exprimiert werden, wurden Tissue-Microarrays von pulmonalen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen sowie von kleinzelligen Lungenkarzinomen aus dem Archiv des Institutes für Pathologie der Universität Bonn erstellt. Da SCLC wie oben beschrieben primär chemotherapeutisch angegangen und normalerweise nicht chirurgisch reseziert werden, war das vorhandene Material zumeist auf kleinen Biopsien beschränkt. Wir konnten jedoch 41 Proben mit ausreichendem Gewebe für eine TMA identifizieren. Die wichtigsten klinischen und pathologischen Daten des Tumorkollektivs sind in der Tabelle 5 zusammengefasst. Das Kollektiv beinhaltete 50 Plattenepithelkarzinome, 50 Adenokarzinome und 41 kleinzellige Bronchialkarzinome von 49 Frauen und 92 Männern im Alter zwischen 37 und 84 Jahren. Insgesamt 49 Patienten befanden sich im Tumorstadium I, 26 im Tumorstadium II, 24 im Tumorstadium III und sechs im Tumorstadium IV nach UICC. Bei 36 war ein vollständiges Staging nicht dokumentiert.

Tab. 5: Grundeigenschaften des Patientenkollektivs. *Limited Disease (St. IA-IIIa) vs. Extended Disease (St. IIIB, IV). m = männlich, w = weiblich, unbek. = unbekannt

		Adenokarzinom	Plattenepithelkarzinom	SCLC*
Geschlecht	m	25 (50%)	39 (78%)	28 (68%)
	w	25 (50%)	11 (22%)	13 (32%)
durchschnittliches Alter [a] z.Z. der Operation		64,8	66,8	62,7
Tumorstadium nach UICC	I A/B	8/10 (18)	7/13 (20)	7/4 (11)
	II A/B	4/9 (13)	2/7 (9)	2/2 (4)
	III A/B	4/1 (5)	6/4 (10)	6/3 (9)
	IV	2	1	3
	unbek.	12	10	14

3.3 Etablierung von Färbeprotokollen

Da vor allem SCLC nur selten operiert werden und somit nur wenig Kryo-Gewebe zur Verfügung stand, musste auf Paraffin-Material zurückgegriffen werden. Paraffin kreuzvernetzt jedoch Moleküle, so dass sich die Anwendung von Antikörpern schwierig gestalten kann (van der Loos, A focus on fixation, 2007). Für jeden der gegen die Kandidatengene gerichteten Antikörper wurde daher verschiedene Methoden der Antigen-Demaskierung (Citrat-Puffer, Protease, EDTA) ausgetestet sowie die geeignete Konzentration austitriert. Die letztendlich verwendeten Konzentrationen und Demaskierungs-Methoden werden in Tabelle 6 veranschaulicht. Für die drei Antikörper gegen FHL 2, LyGDI und MARK1 konnten keine geeigneten Einstellungen gefunden werden.

Tab. 6: Übersicht der immunhistochemisch verwendeten Antikörper. ÜN = über Nacht, MW = Mikrowelle, DK = Dampfkocher

Antikörper	Quelle	Verdünnung	Vorbehandlung
AKAP2	Kaninchen, polyklonal	1:100 ÜN	MW
AKAP11	Kaninchen, polyklonal	1:100	MW
PKACα	Maus, monoklonal	1:200	DK
PKAC2β	Kaninchen, polyklonal	1:500 ÜN	MW
DUSP6	Ziege, polyklonal	1:75	DK
MARCKS	Ziege, polyklonal	1:100	MW
SMG1	Kaninchen, polyklonal	1:400	MW
FHL2	Kaninchen, polyklonal	/	/
LyGDI	Maus, monoklonal	/	/
MARK1	Kaninchen, polyklonal	/	/

3.4 Immunhistochemische Validierung der Kandidatengene auf den Tissue-Microarrays

Die Tissue-Microarrays wurden mit den erfolgreichen Antikörpern gemäß den Etablierungsprotokollen gefärbt. Alle Schnitte wurden auf ihre Farbintensität, Menge und Spezifität beurteilt und in das folgende 4-stufiges Punkteschema aufgeteilt.

Punkteschema für die immunhistochemischen Färbungen:

- keine oder unspezifische Hintergrundfärbung; 0
- schwache diskontinuierliche Färbung; +1
- moderate, aber eindeutige Färbung; +2
- starke vollständige Färbung; +3

Zur Auswertung wurde der Fisher's Exact Test angewendet, der im Gegensatz zum klassischen t-Test nicht von einer Normalverteilung, sondern einer zufälligen Werteverteilung in einer Matrix ausgeht. Zur Signifikanz-Erhöhung wurde der Test als two-tailed ausgelegt. Die Gültigkeit der Nullhypothesen wurde auf ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ getestet.

Im Folgenden sollen die einzelnen Antikörper einzeln vorgestellt werden.

3.4.1 AKAP2, AKAP11, PKAC α , PKA2 β

Der cAMP Signalweg ist einer der am besten beschriebenen. Der second messenger cAMP vermittelt seine Effekte mittels Aktivierung der sogenannten cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). Dieses Holoenzym ist ein Tetramer bestehend aus einem regulatorischen Untereinheiten-Dimer (R) am N-Terminus und zwei katalytischen Untereinheiten (C).

Auf hormonelle Stimuli hin werden wichtige zelluläre Prozesse wie Gentranskription, Zellwachstum, Zellteilung und Aktinzytoskelett-Rearrangement durch PKA-katalysierte Phosphorylierung moduliert. Die intrazelluläre Organisation der PKA wird durch die Assoziation mit sogenannten Ankerproteinen, genauer den A-kinase-anchoring proteins (AKAPs), kontrolliert. Ein jedes enthält dabei ein einzigartiges Zielmotiv, welches an die

regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A bindet und den PKA-AKAP-Komplex zu definierten subzellulären Kompartimenten dirigiert, diesen somit bei der Transduktion von Signalen auf das Zytoskelett eine wichtige Rolle spielen lässt. Dabei greifen AKAPs über multivalente Bindungen auf verschiedene Enzyme, darunter auch unterschiedliche Kinasen und Phosphatasen, zurück. Unter den über 50 AKAPs findet sich unter anderem auch der NPF (nucleation promoting factor) WAVE, ein Mitglied der bereits in der Einleitung beschriebenen Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein-Familie mit einer bedeutsamen Rolle für eine rasche Aktin-Polymerisation.

Zusammenfassend übt der PKA-AKAP-Komplex auf die Organisation des Zytoskeletts in Hinblick auf Zellform, -bewegung und -teilung einen positiven Effekt aus. (Day, Gaietta et al. ; Diviani and Scott, 2001)

3.4.1.1.1 AKAP2

Tab. 7: Verteilung des Antikörpers AKAP2 nach oben genanntem Punkteschema

AKAP2	Adeno-CA	SCLC
0	2	10
1	10	14
2	16	11
3	15	4

Tab. 8: Fisher Exact Probability Test: 2x4 inkl. Chi-Square-Test für AKAP2

	C1	C2	C3	C4	Totals	Auswertung AKAP2
R1	2	10	16	15	43	<i>one-tail: 0.0038967966546053587</i> <i>two-tail: 0.0038967966546053587</i> <i>Chi-square = 13.65, P= 0.003422</i>
R2	10	14	11	4	39	
Totals	12	24	27	19	82	

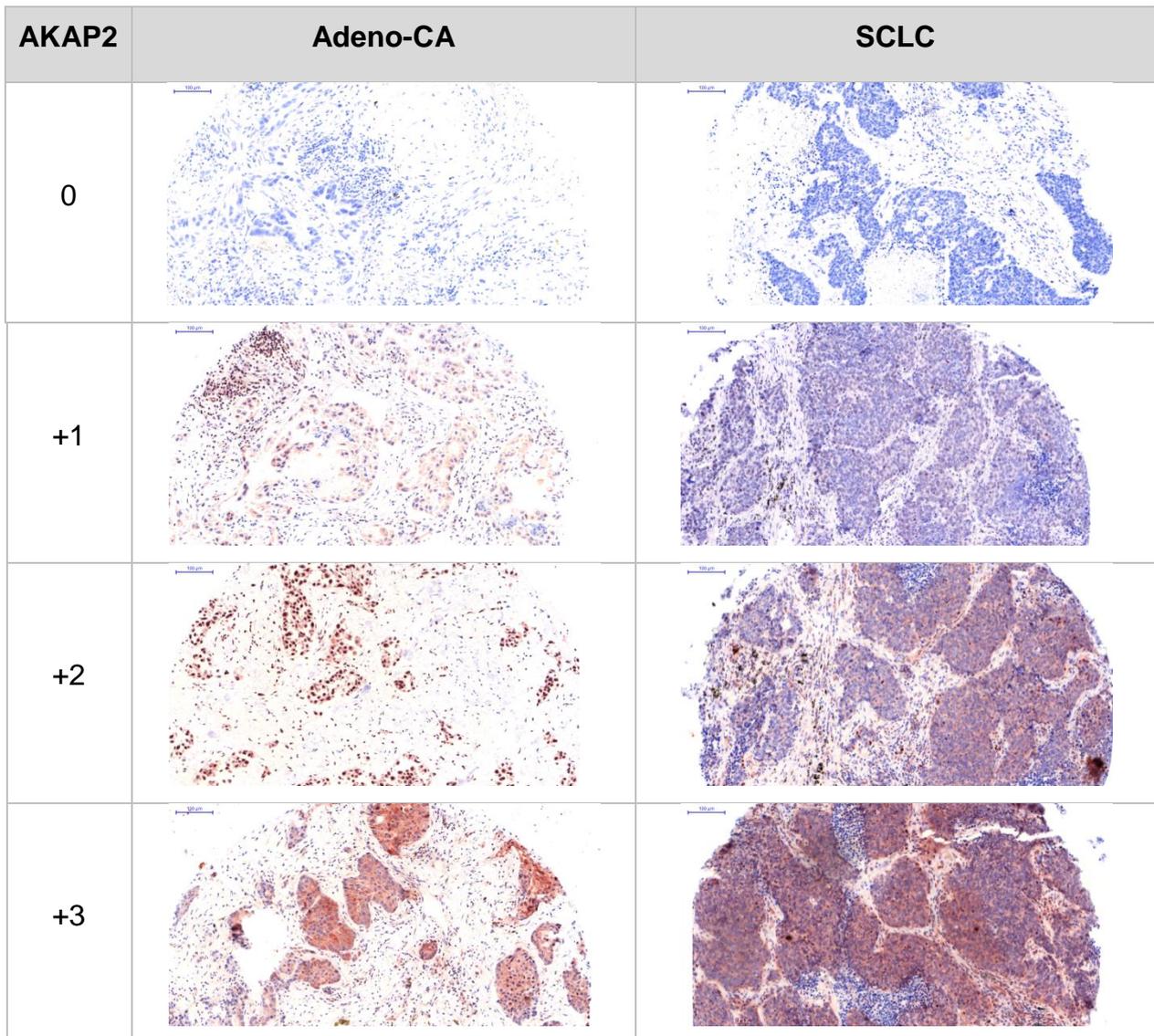


Abb. 7: Repräsentative Färbungen mit einem AKAP2-Antikörper auf TMA

3.4.1.1.2 Auswertung AKAP2

Die Adenokarzinome ließen sich überwiegend stark (31 Proben mit Stufe 2-3 nach dem Punkteschema, 12 Proben mit Stufe 0-1), die SCLC hingegen eher schwach (15 Proben mit Stufe 2-3, 24 Proben mit Stufe 0-1) mit dem AKAP2-Antikörper anfärben (Abb. 7, Tab. 7). Immunhistochemisch besteht nach Berechnung mit dem Fisher's Exact Test eine signifikante Überexpression des Gens in den Adenokarzinomen ($p < 0,05$) (Tab. 8). Dieses Ergebnis lässt sich mit der oben beschriebenen Funktion des Gens als Mit-Organisator des Zytoskeletts gut vereinbaren.

3.4.1.2.1 AKAP11

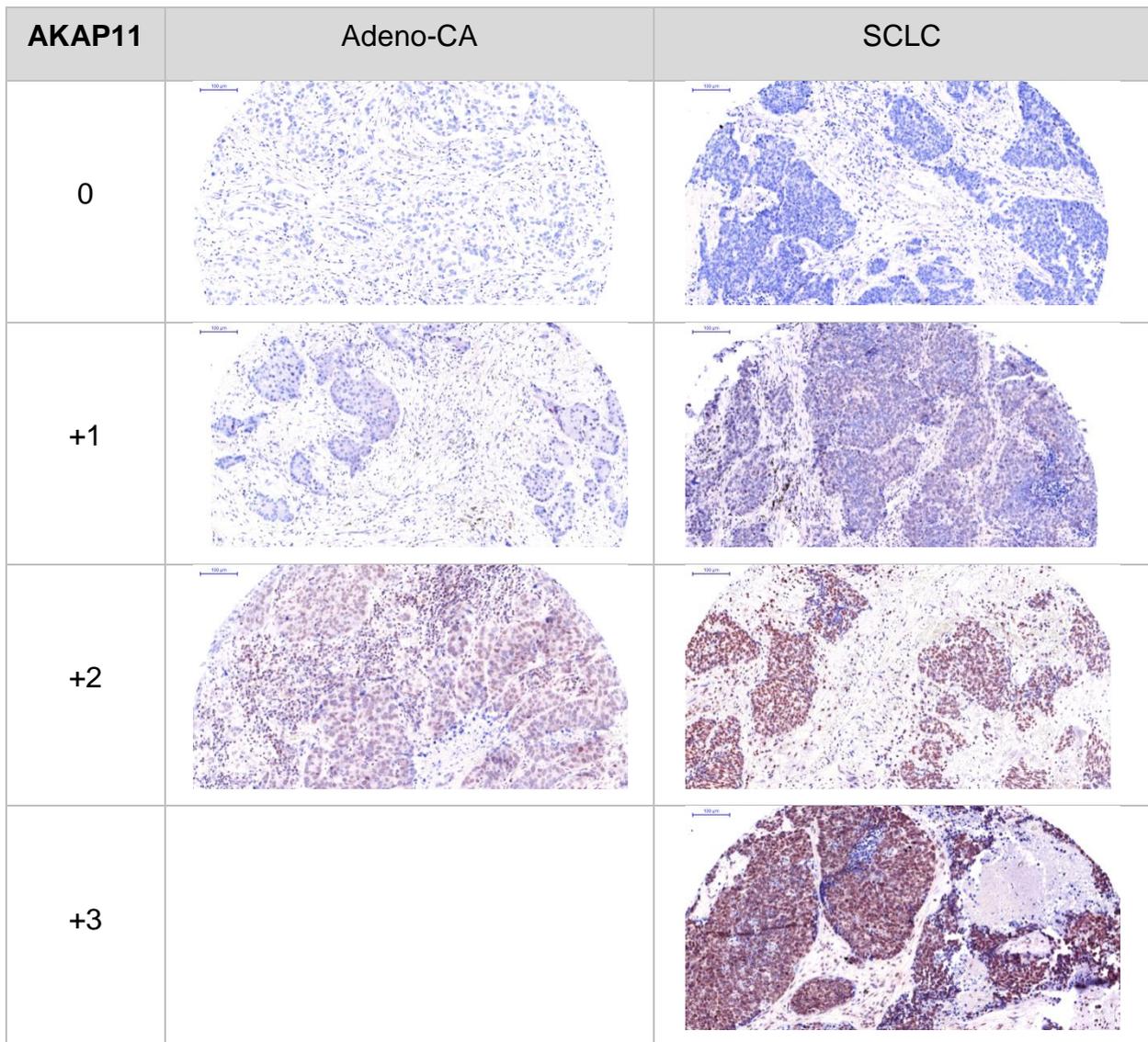


Abb. 8: Repräsentative Färbungen mit einem AKAP11-Antikörper auf TMA

Tab. 9: Verteilung des Antikörpers AKAP11 nach oben genanntem Punkteschema

AKAP11	Adeno-CA	SCLC
0	13	7
1	18	13
2	5	9
3	1	7

Tab. 10: Fisher Exact Probability Test: 2x4 inkl. Chi-Square-Test für AKAP11

	C1	C2	C3	C4	Totals	Auswertung AKAP11
R1	13	18	5	1	37	<i>one-tail: 0.040287820627419486</i> <i>two-tail: 0.03999451422865609</i>
R2	7	13	9	7	36	
Totals	20	31	14	8	73	

3.4.1.2.2 Auswertung AKAP11

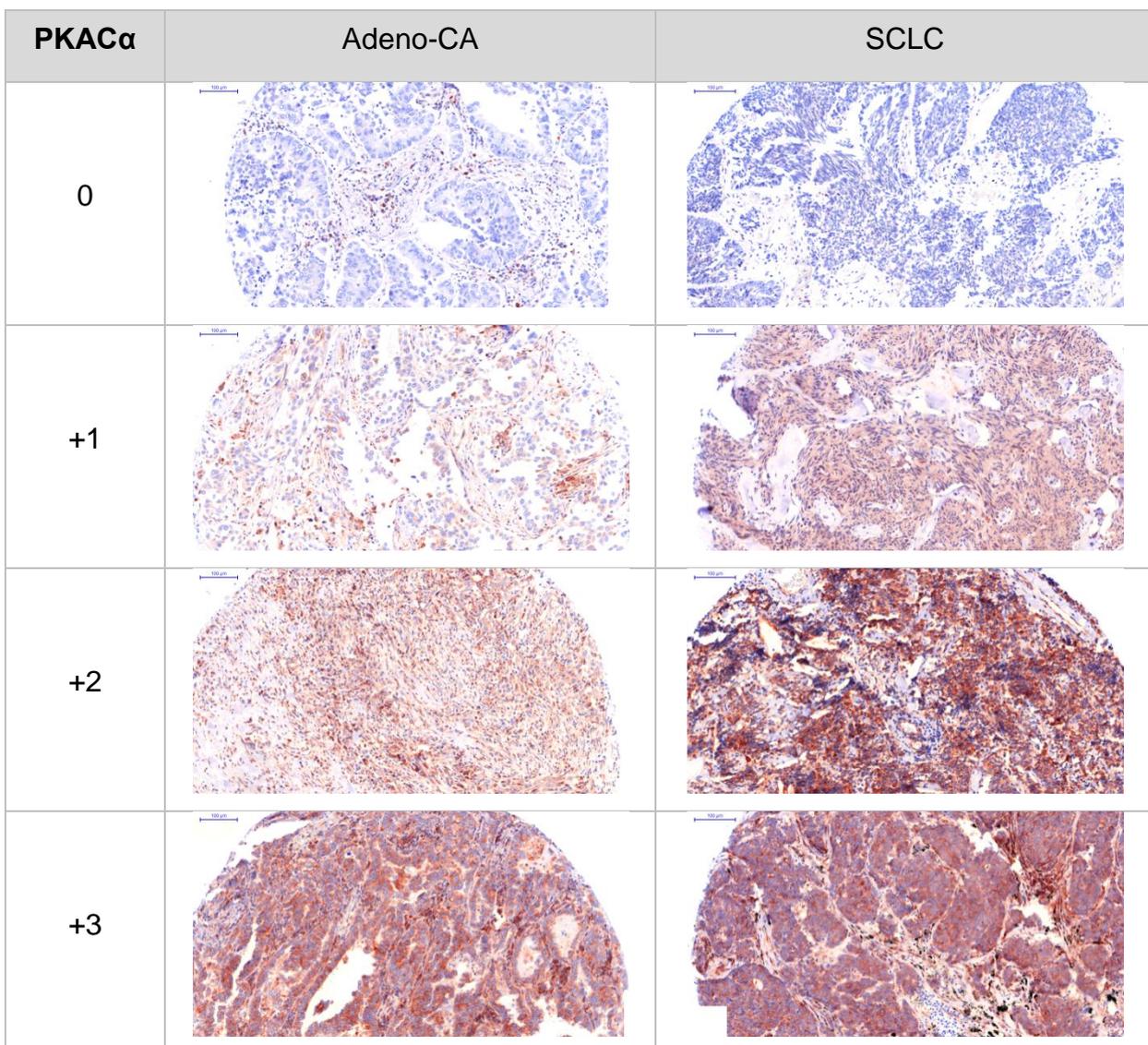
Während sich nur 6 Proben der Adenokarzinome positiv (Stufe 2-3 nach Punkteschema) färben ließen, waren es bei den SCLC immerhin 16 Proben (Abb. 8, Tab. 9). Im Fisher's Exact Test zeigte sich hier eine signifikante Überexpression ($p < 0,05$) in den kleinzelligen Lungenkarzinomen (Tab. 10). In Hinblick auf die bereits erwähnte Funktion des PKA-AKAP-Komplexes ergibt sich hier ein unerwartetes Resultat.

3.4.1.3.1 PKAC α **Tab. 11:** Verteilung des Antikörpers PKAC α nach oben genanntem Punkteschema

PKACα	Adeno-CA	SCLC
0	9	2
1	14	7
2	12	10
3	8	17

Tab. 12: Fisher Exact Probability Test: 2x4 inkl. Chi-Square-Test für PKAC α

	C1	C2	C3	C4	Totals	Auswertung PKAC α
R1	9	14	12	8	43	<i>one-tail: 0.021770389984592305</i> <i>two-tail: 0.021658023955710762</i> <i>Chi-square = 9.67, P= 0.02159</i>
R2	2	7	10	17	36	
Totals	11	21	22	25	79	

**Abb. 9:** Repräsentative Färbungen mit einem PKAC α -Antikörper auf TMA

3.4.1.3.2 Auswertung PKAC α

Im Vergleich wiesen die SCLC ein Verhältnis von negativ zu positiv gefärbten Proben von 9 zu 27 auf, die Adenokarzinome ein Verhältnis von 23 zu 20 (Abb. 9, Tab. 11). Dies entspricht einer signifikanten Überexpression des Gens PKAC α in den kleinzelligen Lungenkarzinomen ($p < 0,05$ im Fisher's Exact Test) (Tab. 12). Analog zum AKAP11 kann von einem unerwarteten Ergebnis ausgegangen werden.

3.4.1.4.1 PKA2 β

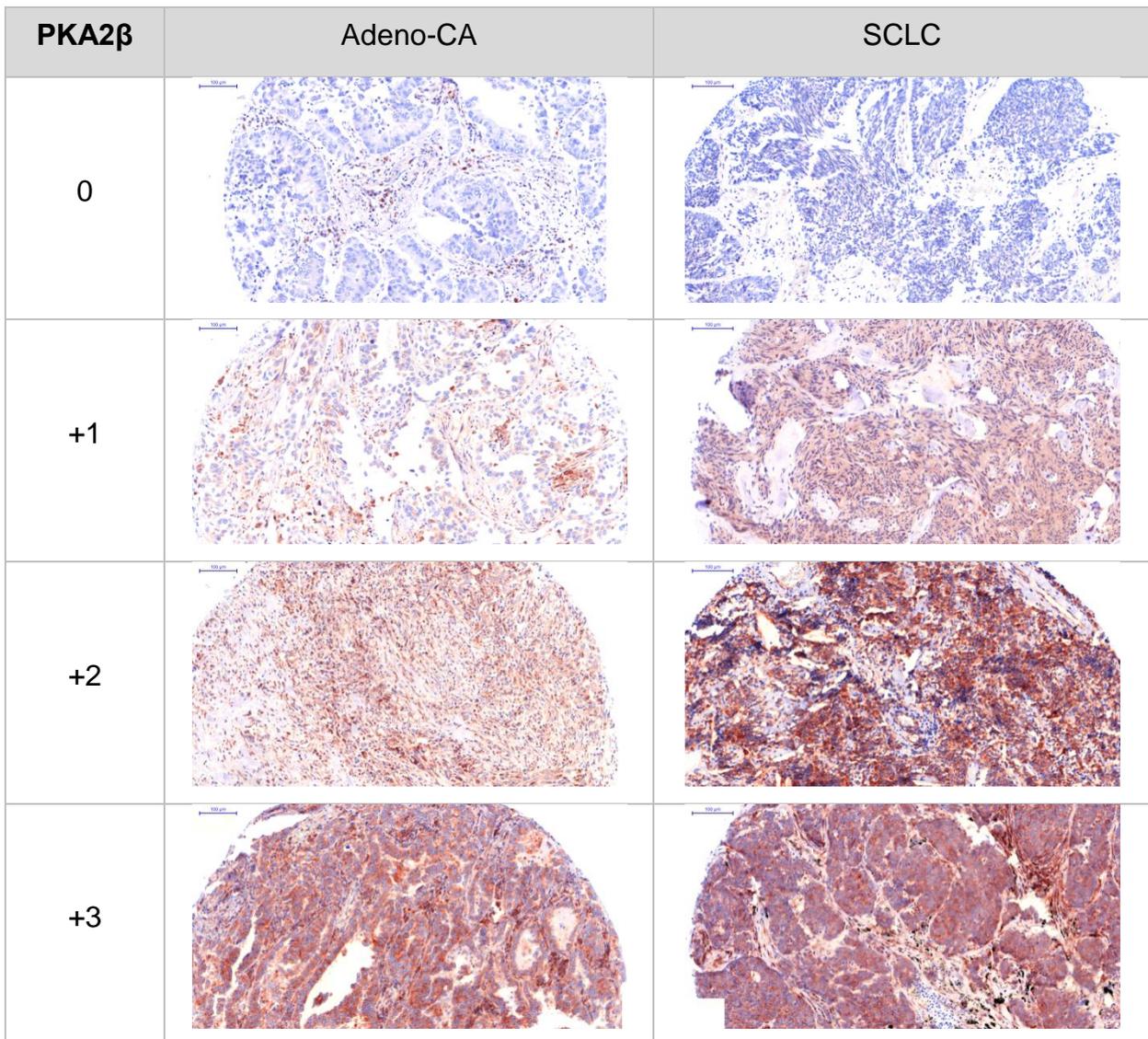


Abb. 10: Repräsentative Färbungen mit einem PKA2 β -Antikörper auf TMA

Tab. 13: Verteilung des Antikörpers PKA2 β nach oben genanntem Punkteschema

PKA2 β	Adeno-CA	SCLC
0	6	2
1	14	10
2	10	13
3	10	13

Tab. 14: Fisher Exact Probability Test: 2x4 für PKA2 β

	C1	C2	C3	C4	Totals	Auswertung PKA2 β
R1	6	14	10	10	40	<i>one-tail: 0.3450072456176924</i> <i>two-tail: 0.34500724561769236</i>
R2	2	10	13	13	38	
Totals	8	24	23	23	78	

3.4.1.4.2 Auswertung PKA2 β

20 der Adenokarzinome sowie 12 der SCLC ließen sich mit dem PKA2 β -Antikörper nur schwach anfärben. Demgegenüber wiesen 20 Adenokarzinome und 26 SCLC eine stärkere Färbung auf (Abb. 10, Tab. 13). Im Fishers'Exact Test zeigte sich somit eine signifikante Überexpression in den kleinzelligen Proben (Tab. 14). In Anbetracht des oben beschriebenen positiven Effekts auf das Zytoskelett erneut ein Resultat, von dem wir nicht ausgegangen waren.

3.4.2 DUSP6

Die Dual-specificity phosphatase (DUSP) Familie umfasst wichtige negative feedback-Regulatoren des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs, darunter insbesondere DUSP6, welche physiologisch eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase als Antwort auf Wachstumsfaktoren spielt und dabei unter anderem

Threonin- und Tyrosin-Reste von ERK1/2, einem Mitglied der mitogen-activated protein (MAP) kinase Superfamilie, dephosphoryliert. Daher rührt auch der Name Mitogen-activated protein kinase Phosphatase 3 (MKP3).

Durch eine Störung dieses noch nicht vollends verstandenen Feedback-Mechanismus kann in betroffenen Zellen eine neoplastische, wenn nicht gar maligne Transformation stattfinden. So ist es bislang für einen Großteil der NSCLC, darunter wiederum besonders in denjenigen mit EGFR- und/oder K-RAS-Mutationen, beschrieben worden. Dabei findet sich mit steigendem Tumor-Grading ein zunehmender Verlust an DUSP6. Dieses Phänomen ist für SCLC nicht bekannt. (Wong, Chen et al. ; Zhang, Kobayashi et al. ; Okudela, Yazawa et al., 2009)

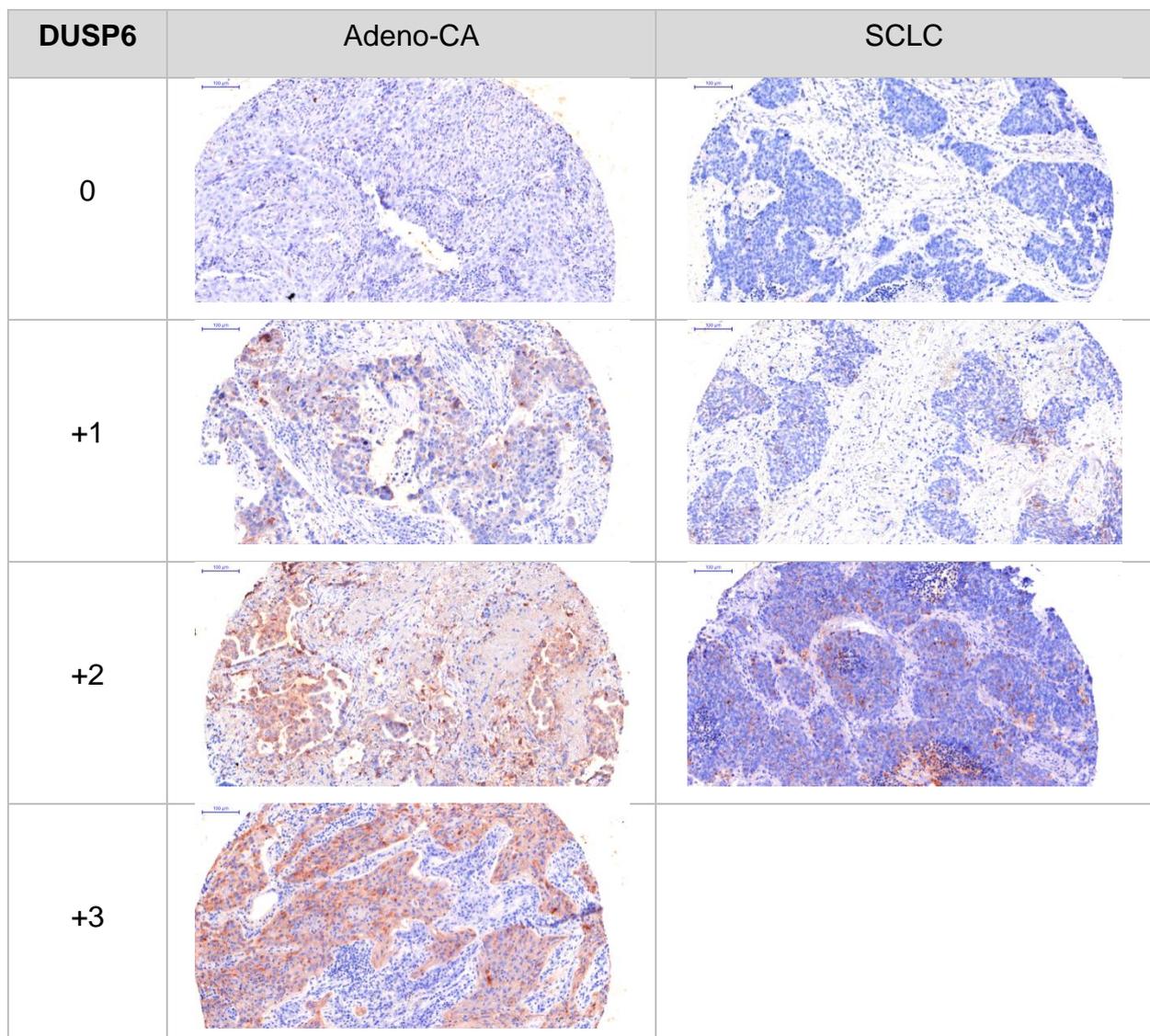


Abb. 11: Repräsentative Färbungen mit einem DUSP6-Antikörper auf TMA

Tab. 15: Verteilung des Antikörpers DUSP6 nach oben genanntem Punkteschema

DUSP6	Adeno-CA	SCLC
0	1	16
1	15	12
2	11	8
3	12	0

Tab. 16: Fisher Exact Probability Test: 2x4 inkl. Chi-Square-Test für DUSP6

	C1	C2	C3	C4	Totals	Auswertung DUSP6
R1	1	15	11	12	39	<i>one-tail: 0.000001249665110853497</i> <i>two-tail: 0.0000012360019237872502</i> <i>Chi-square = 25.96, P= 0.00001</i>
R2	16	12	8	0	36	
Totals	17	27	19	12	75	

3.4.2.1 Auswertung DUSP6

Im Vergleich wiesen die SCLC ein Verhältnis von negativ zu positiv gefärbten Proben von 28 zu 8 auf, die Adenokarzinome ein Verhältnis von 16 zu 23 (Abb. 11, Tab. 15). Wie in Tabelle 16 ersichtlich, wird DUSP6 nach dem Fisher's Exact Test in Adenokarzinomen signifikant höher exprimiert. In NSCLC konnte eine Beteiligung des Gens an der malignen Entartung gezeigt werden (Wong, Chen et al. ; Zhang, Kobayashi et al. ; Okudela, Yazawa et al., 2009). Man kann demnach von einem erwarteten Ergebnis sprechen.

3.4.3 MARCKS

Das MARCKS-Protein (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) bindet reversibel an ein breites Spektrum von wichtigen strukturellen und regulatorischen Molekülen wie Calmodulin (CaM) oder das Signal-Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂). Es ist an der Plasmamembran lokalisiert – möglich macht dies die Kombination

aus der Myristoylierung am N-Terminus und einer sogenannten Effektor-Domäne – und stellt ein Aktinfilament-vernetzendes Protein dar.

Die Phosphorylierung von MARCKS durch die Proteinkinase C (PKC) (z.B. im Rahmen einer VEGF-Stimulation der Zelle) als auch die Bindung an Calcium-Calmodulin verhindern die Assoziation mit Aktin und der Plasmamembran; es kommt zu einer intrazellulären Translokation von MARCKS sowie einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. Es konnte gezeigt werden, dass sich in aktiv proliferierenden Zellreihen niedrige Level an MARCKS finden, sich dies jedoch bei einem Stopp der Zellteilungen schlagartig ändert.

Das Protein scheint somit eine bedeutende Rolle unter anderem in der Kontrolle von Zell-Adhäsion und –motilität zu spielen und die Funktion eines Tumorsuppressors einzunehmen. (Kalwa and Michel ; Lin, Fang et al. ; Zhao, Neltner et al., 2000; Finlayson and Freeman, 2009)

Tab. 17: Verteilung des Antikörpers nach oben genanntem Punkteschema

MARCKS	Adeno-CA	SCLC
0	2	7
1	10	10
2	14	13
3	14	5

Tab. 18: Fisher Exact Probability Test: 2x4 inkl. Chi-Square-Test für MARCKS

	C1	C2	C3	C4	Totals	Auswertung MARCKS
R1	2	10	14	14	40	<i>one-tail: 0.08457347292701092</i> <i>two-tail: 0.08457347292701091</i>
R2	7	10	13	5	35	
Totals	9	20	27	19	75	

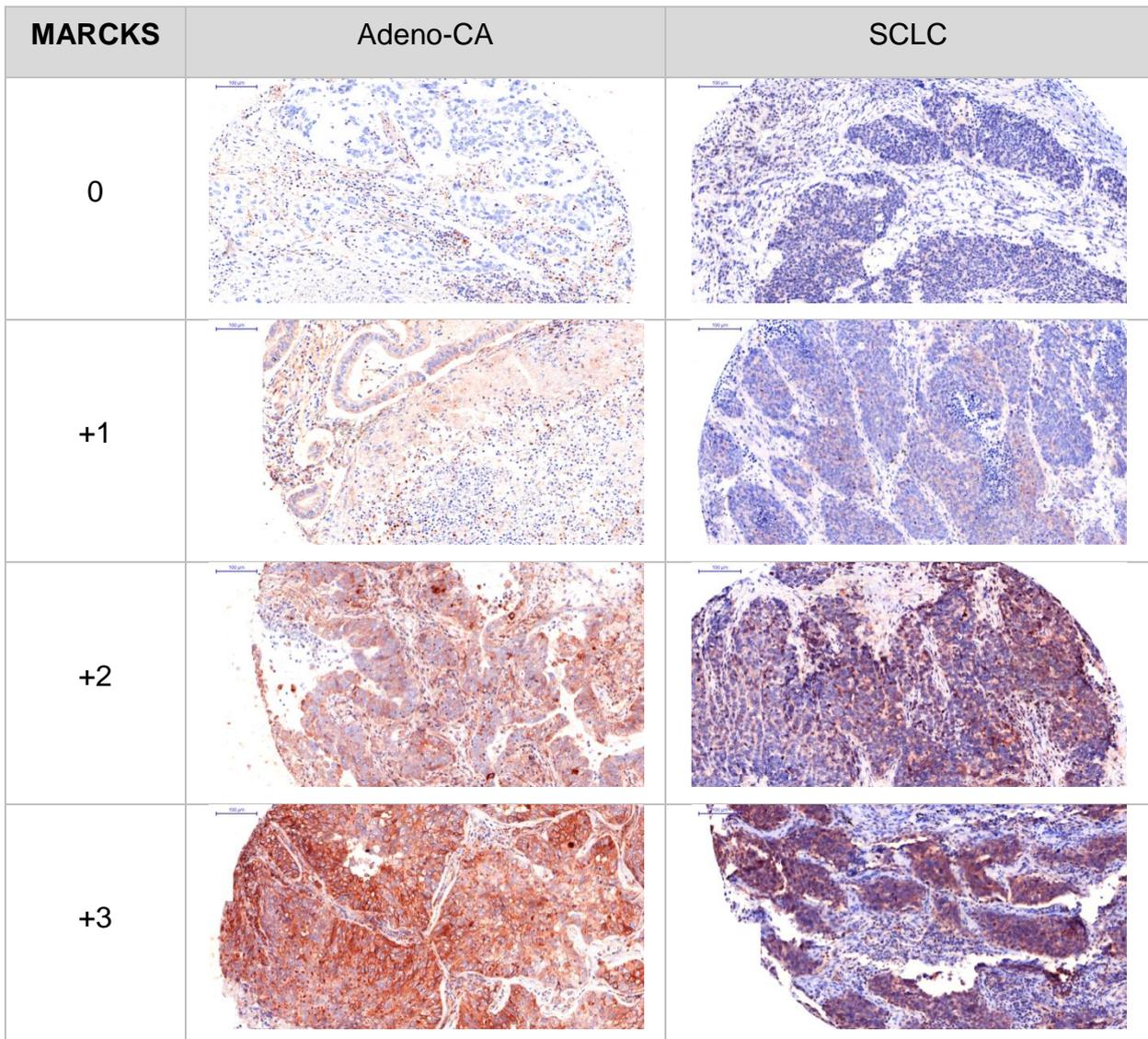


Abb. 12: Repräsentative Färbungen mit einem MARCKS-Antikörper auf TMA

3.4.3.1 Auswertung MARCKS

Bei den NSCLC ließen sich 28 Proben stark (Stufe 2-3 nach Punkteschema) und nur 12 Proben schwach (Stufe 0-1 nach Punkteschema) mit dem MARCKS-Antikörper anfärben. Im Vergleich dazu waren es bei den SCLC 18 bzw. 17 Proben. (Abb. 12, Tab. 17) Immunhistochemisch zeigte sich also eine signifikante Überexpression des Gens in den nichtkleinzelligen Karzinomen ($p < 0,05$ nach dem Fisher's Exact Test) (Tab.18). Dies untermauert die oben geäußerte Beschreibung des Proteins.

3.4.4 SMG1

SMG-1 als Mitglied der Phosphoinositide 3-kinase-related kinase (PIKK)₃-Familie spielt eine zentrale Rolle in Zellwachstum und der Reaktion auf zellulären Stress. Durch Mitbeteiligung an einem Überwachungs-Komplex triggert SMG-1 so zum Beispiel den NMD (nonsense-mediated mRNA decay). Darunter versteht man einen mRNA-Überwachungs-Mechanismus, der die schnelle Degradation von mRNA-Transkripten mit sogenannten unreifen Terminations-Kodons (PTC) in ihren Sequenzen vermittelt und somit die Zelle vor potentieller Toxizität in Form einer Akkumulation solcher „beschädigter“ Sequenzen bewahrt. NMD stellt darüber hinaus jedoch auch eine wichtige Komponente zur Formung des Transkriptoms während des normalen Zellwachstums und der Zelldifferenzierung dar. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass SMG-1-depletierte Zellen einen erhöhten Level an spontaner DNA-Schädigung und eine gesteigerte Sensitivität gegenüber genotoxischem Stress aufweisen. Beides kann eine maligne Transformation zur Folge haben. (Oliveira, Romanow et al., 2008; Yamashita, Izumi et al., 2009)

Tab. 19: Verteilung des Antikörpers SMG1 nach oben genanntem Punkteschema

SMG1	Adeno-CA	SCLC
0	2	6
1	10	13
2	16	10
3	16	6

Tab. 20: Fisher Exact Probability Test: 2x4 inkl. Chi-Square-Test für SMG1

	C1	C2	C3	C4	Totals	Auswertung MARCKS
R1	2	10	16	16	44	<i>one-tail: 0.06519779330963138</i> <i>two-tail: 0.06519779330963138</i>
R2	6	13	10	6	35	
Totals	8	23	26	22	79	

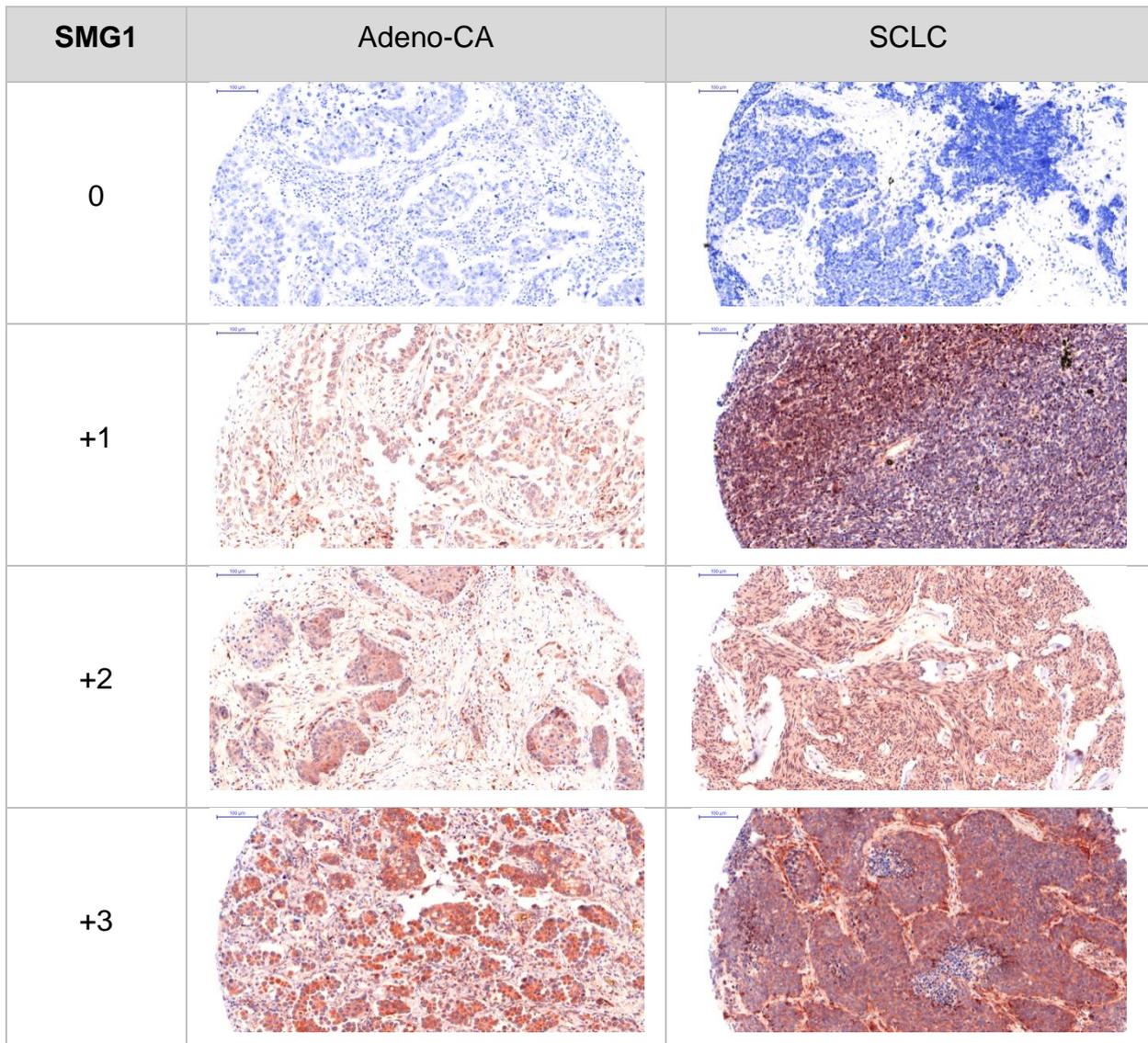


Abb. 13: Repräsentative Färbungen mit einem SMG1-Antikörper auf TMA

3.4.4.1 Auswertung SMG1

Hier konnte immunhistochemisch eine signifikante Überexpression des Gens SMG-1 in NSCLC nachgewiesen werden, wie in Tabelle 20 aufgeführt. Das Verhältnis von negativ zu positiv gefärbten Proben war bei den nichtkleinzelligen Lungentumoren 12 zu 32, bei den kleinzelligen hingegen 19 zu 16 (Abb. 13, Tab 19). In Anbetracht der Funktion von SMG-1 kann man also von einem passenden Ergebnis ausgehen.

3.4.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für einen Teil der in der Metaanalyse identifizierten Kinasen und Phosphatasen immunhistochemische Färbungen etabliert werden konnten, die im Fall von AKAP 2, DUSP6 und SMG1 die erwartete Expression in NSCLC bzw. im Fall von MARCKS in SCLC zeigen.

3.5 Validierung der Target-Gene durch RT-PCR

Zur Validierung der bislang erhobenen Befunde wurden mit verschiedenen humanen Lungenkarzinom-Zellreihen RT-PCRs durchgeführt. Folgend sind beispielsweise Figuren zu DUSP6, PKA2 β und SMG1 aufgeführt. So zeigt sich in den Abb. 14 und 15 eine absolute Mehrheit der relativen Expression zu 28S von DUSP6 in NSCLC, während die Abb. 16 und 17 bzw. Abb. 18 und 19 verdeutlichen, dass PKA2 β bzw. SMG1 in Relation zu 28S häufiger in SCLC als in NSCLC exprimiert werden.

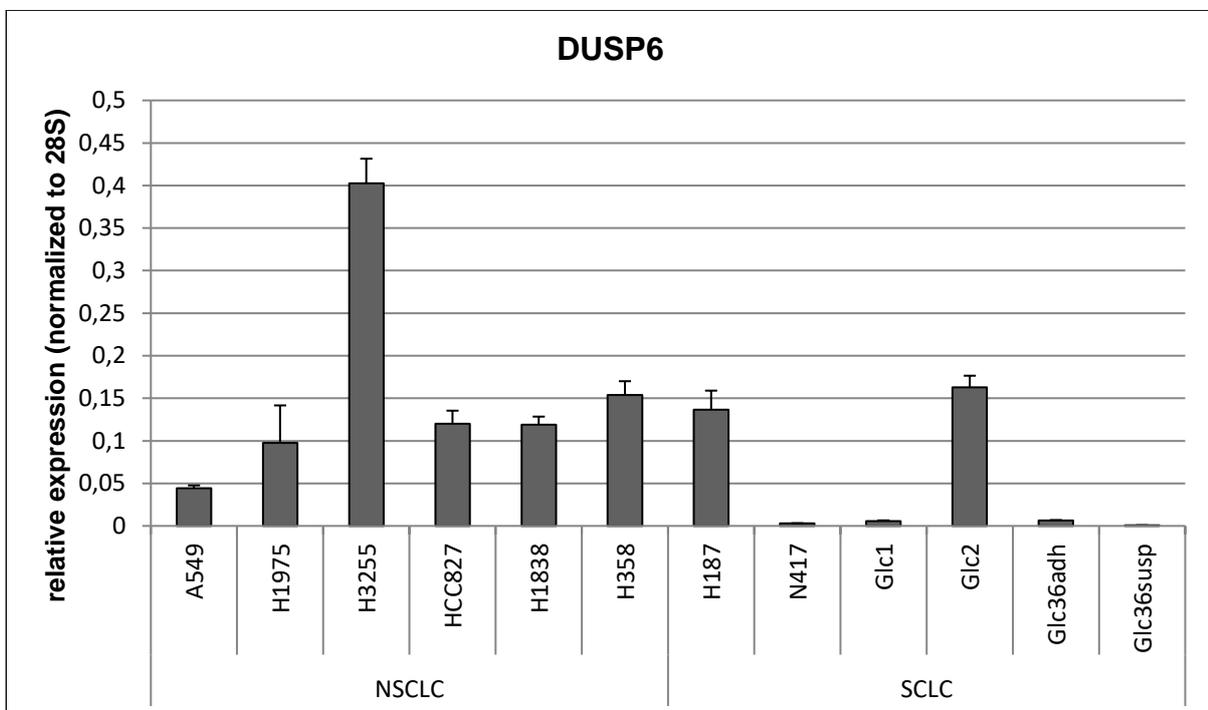


Abb. 14: RT-PCR humaner Lungenkarzinom-Zellreihen, einzeln aufgeführt, mit DUSP6 in Relation zu 28S.

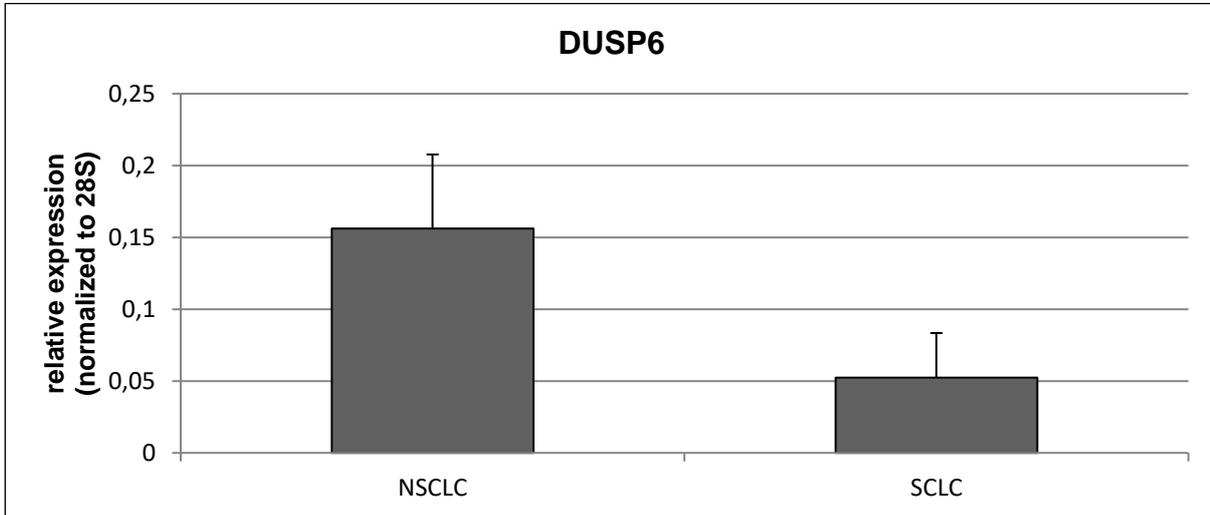


Abb. 15: RT-PCR humaner Lungenkarzinom-Zellreihen, zusammengefasst als NSCLC bzw. SCLC, mit DUSP6 in Relation zu 28S.

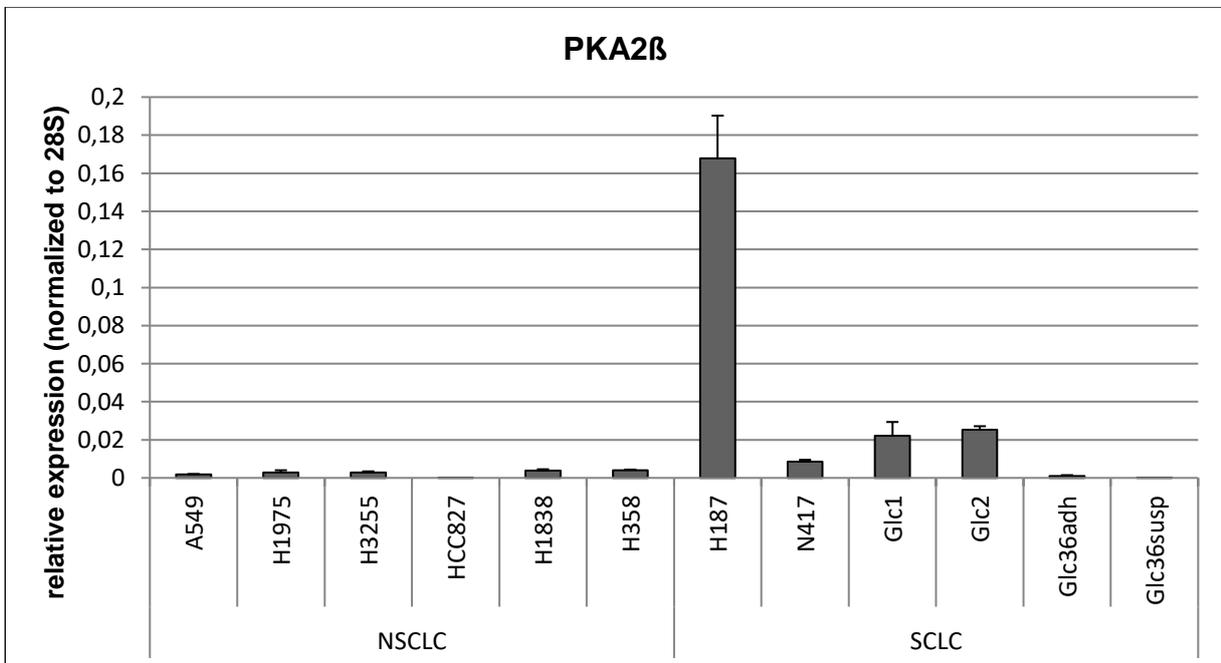


Abb. 16: RT-PCR humaner Lungenkarzinom-Zellreihen, einzeln aufgeführt, mit PKA2β in Relation zu 28S.

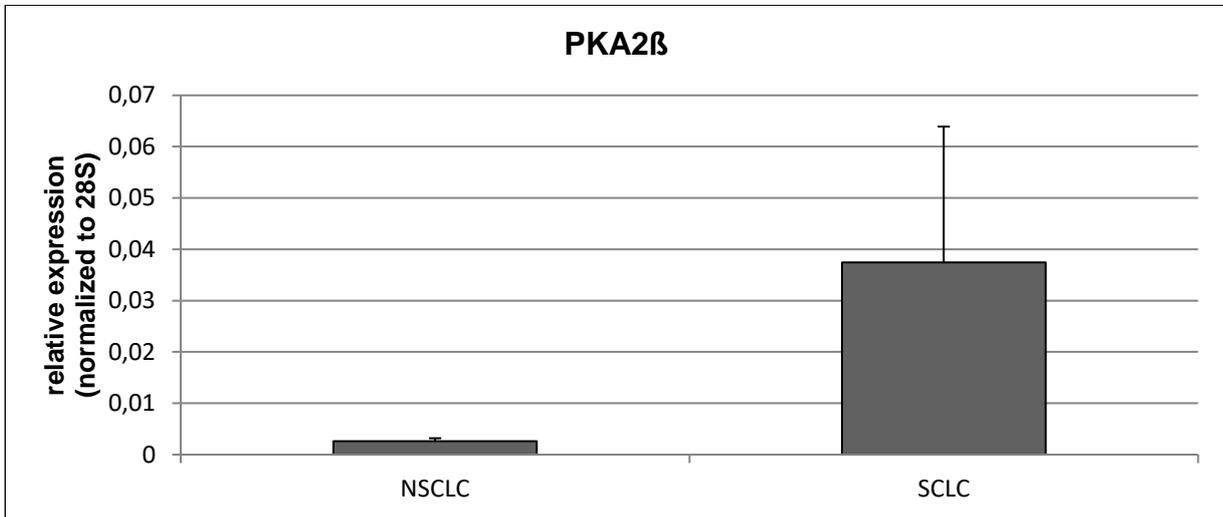


Abb. 17: RT-PCR humaner Lungenkarzinom-Zellreihen, zusammengefasst als NSCLC und SCLC, mit PKA2 β in Relation zu 28S.

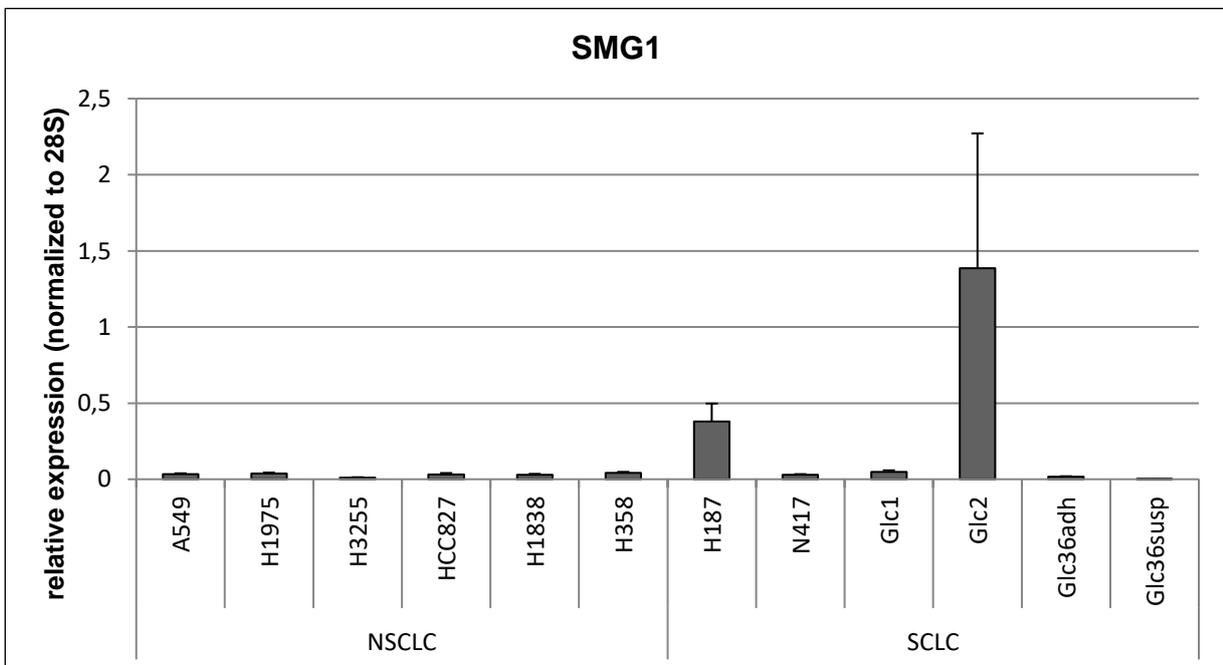


Abb. 18: RT-PCR humaner Lungenkarzinom-Zellreihen, einzeln aufgeführt, mit SMG1 in Relation zu 28S.

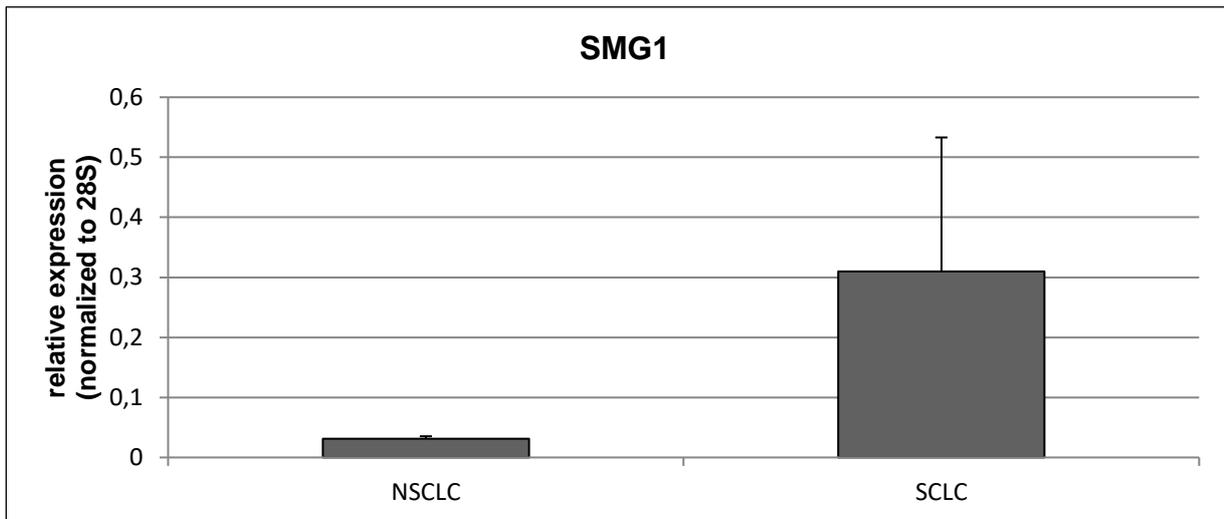


Abb. 19: RT-PCR humaner Lungenkarzinom-Zellreihen, zusammengefasst als NSCLC und SCLC, mit SMG1 in Relation zu 28S.

Weitgehend stimmten die hiermit erworbenen Ergebnisse mit denen der immunhistochemischen Färbungen überein. Lediglich bei dem Target-Gen SMG1 fand sich eine Abweichung. In der RT-PCR zeigt sich hier eine Überexpression des Gens in SCLC.

3.6 Etablierung von Zelltransfektionen mit siRNA

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Kinasen AKAP2, AKAP11, PKAC α , PKA2 β , MARCKS und SMG1 sowie die Phosphatase DUSP6 differentiell in SCLC und NSCLC exprimiert werden, stellte sich die Frage, ob diese auch funktionell für die zytoskelettalen Unterschiede in SCLC und NSCLC verantwortlich sind.

Die Hypothese ist, dass ein knockdown von in NSCLC überexprimierten Genen zu einem Zusammenbruch des Zytoskeletts und somit zu einem kleinzelligen Phänotyp, ein knockdown von in SCLC überexprimierten Genen zu einer Re-Organisation des Zytoskeletts mit Ausbildung eines großzelligen Phänotypen führt.

Daher war das experimentelle Ziel zu testen, ob 1. ein knockdown mit siRNA möglich ist und ob 2. dieser wirklich eine Veränderung des Zytoskeletts sowie von Zelleigenschaften wie das Migrationsverhalten zur Folge hat (s. 3.7).

Verschiedene humane Lungenzelllinien wurden hierzu mit den ausgewählten Genen entsprechender siRNA transfiziert. Dabei wurde unterschiedliche siRNA-Konzentrationen (5, 25, 100 nM) sowie Inkubationszeiten (24, 48 und 72 h) getestet. Zur Kontrolle erfolgten RTq-PCR-Messungen. Im Folgenden werden hiervon Beispiele präsentiert (Abb. 20-22).

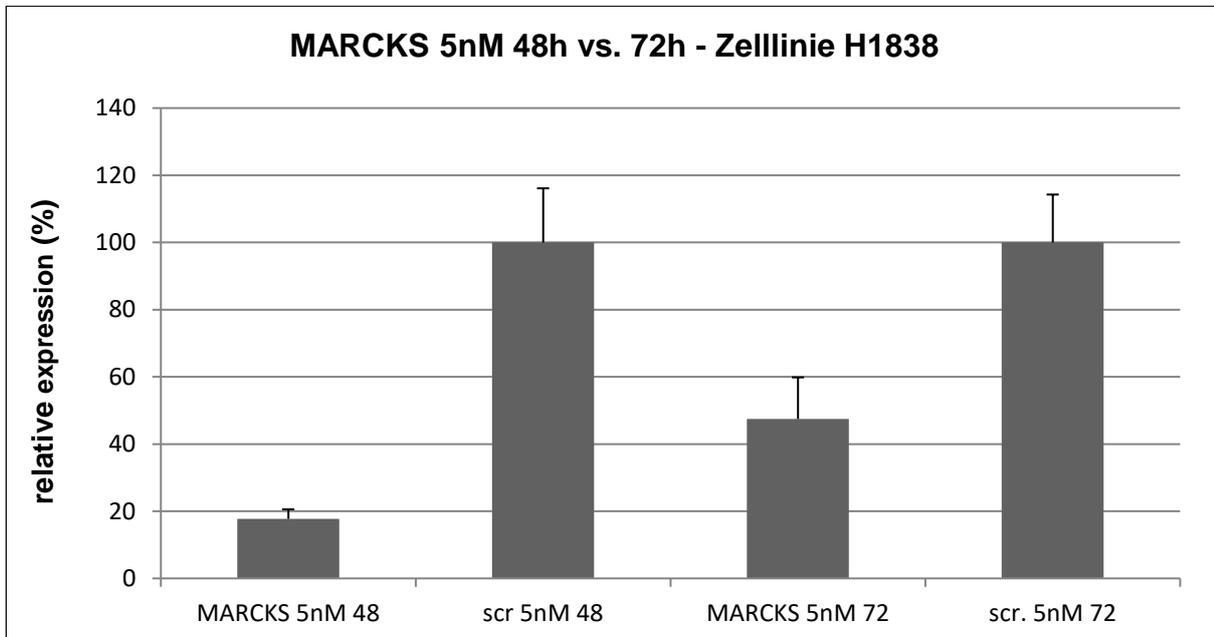


Abb. 20: RTq-PCR nach siRNA-Transfektion von H1838-Zellen mit MARCKS. Gezeigt wird die relative Expression zu mit scrambled-siRNA transfizierten Zellen.

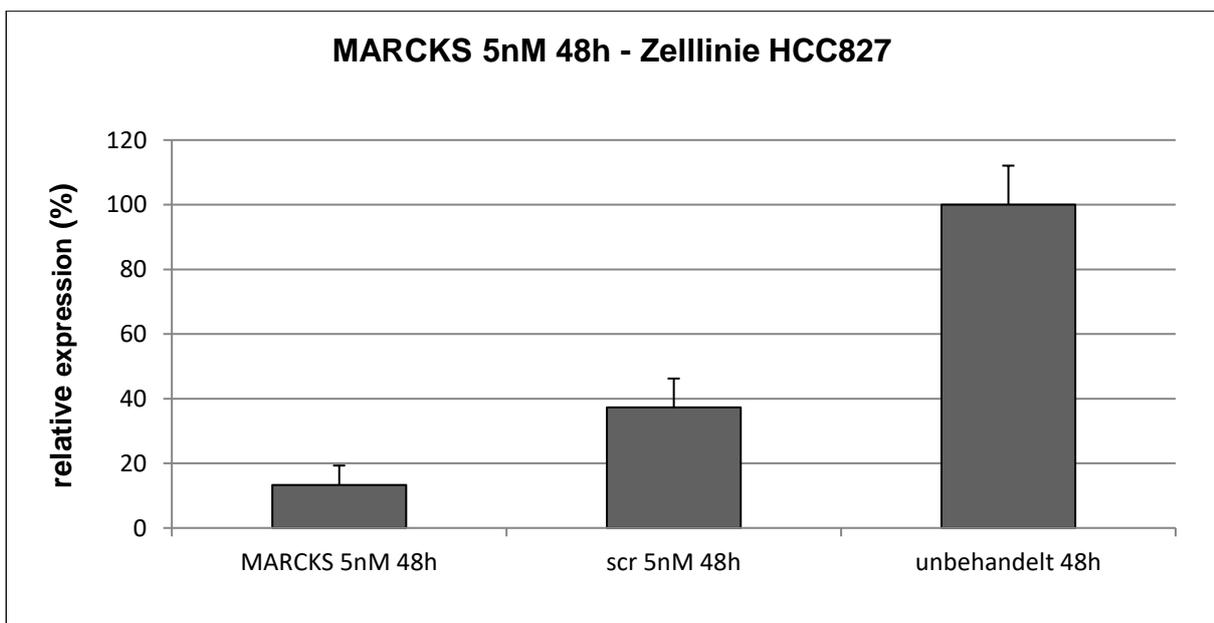


Abb. 21: RTq-PCR nach siRNA-Transfektion von HCC827-Zellen mit MARCKS. Gezeigt wird die relative Expression zu mit scrambled-siRNA transfizierten Zellen.

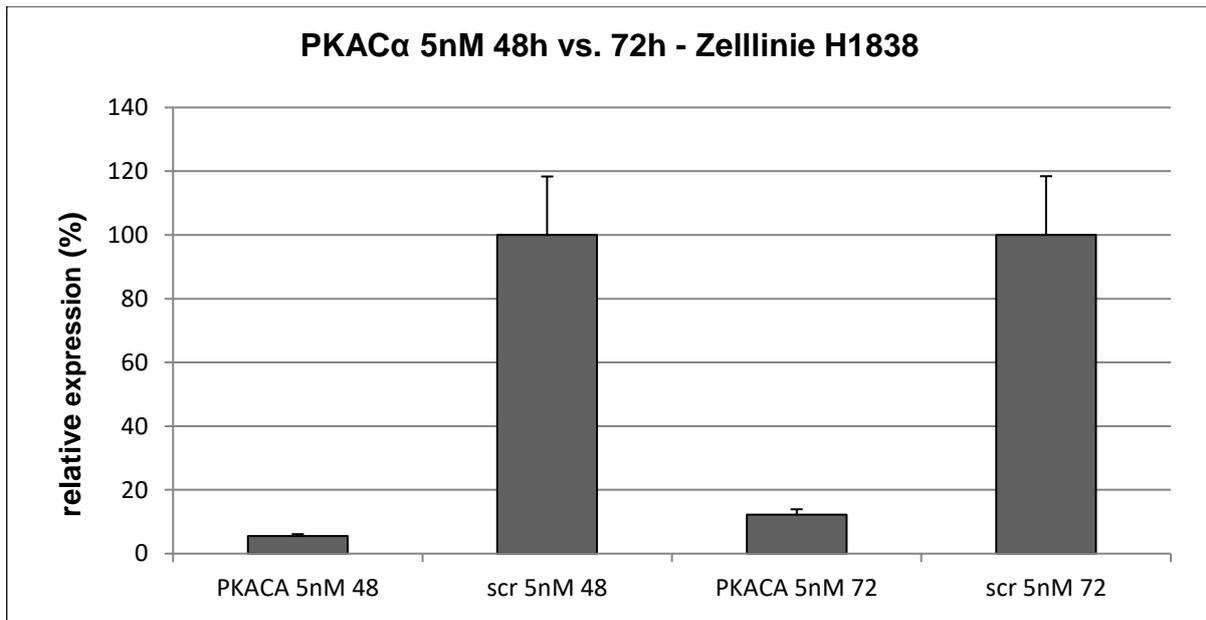


Abb. 22: RTq-PCR nach siRNA-Transfektion von H1838-Zellen mit PKAC α . Gezeigt wird die relative Expression zu mit scrambled-siRNA transfizierten Zellen.

Es ließ sich nachweisen, dass sich ein Knockdown o.g. Gene in unterschiedlichen Zellreihen durch eine siRNA-Transfektion umsetzen ließ. Für MARCKS und PKAC α ergaben eine siRNA-Konzentration von 5 nm und eine Inkubationszeit von 48 Stunden die deutlichsten Ergebnisse.

3.7 Funktionelle Testung der transfizierten Zellen

In einem zweiten Schritt sollten die transfizierten Zellen im Rahmen verschiedener Versuche bezüglich ihres Wachstums- und Invasionsverhaltens untersucht werden. Es wurden MTT-Tests, Scratch-Assays sowie Boyden-Kammer-Experimente vollzogen.

Es sei hier erwähnt, dass eine ausgiebigere Testung mit Variation oben beschriebener Versuchsbedingungen (s. Material und Methoden) aus zeitlichen Gründen nicht möglich war.

In den folgenden Abbildungen (Abb. 23-26) werden hier beispielsweise Ergebnisse von MTT-Tests und Boyden-Kammer-Experimenten aufgeführt.

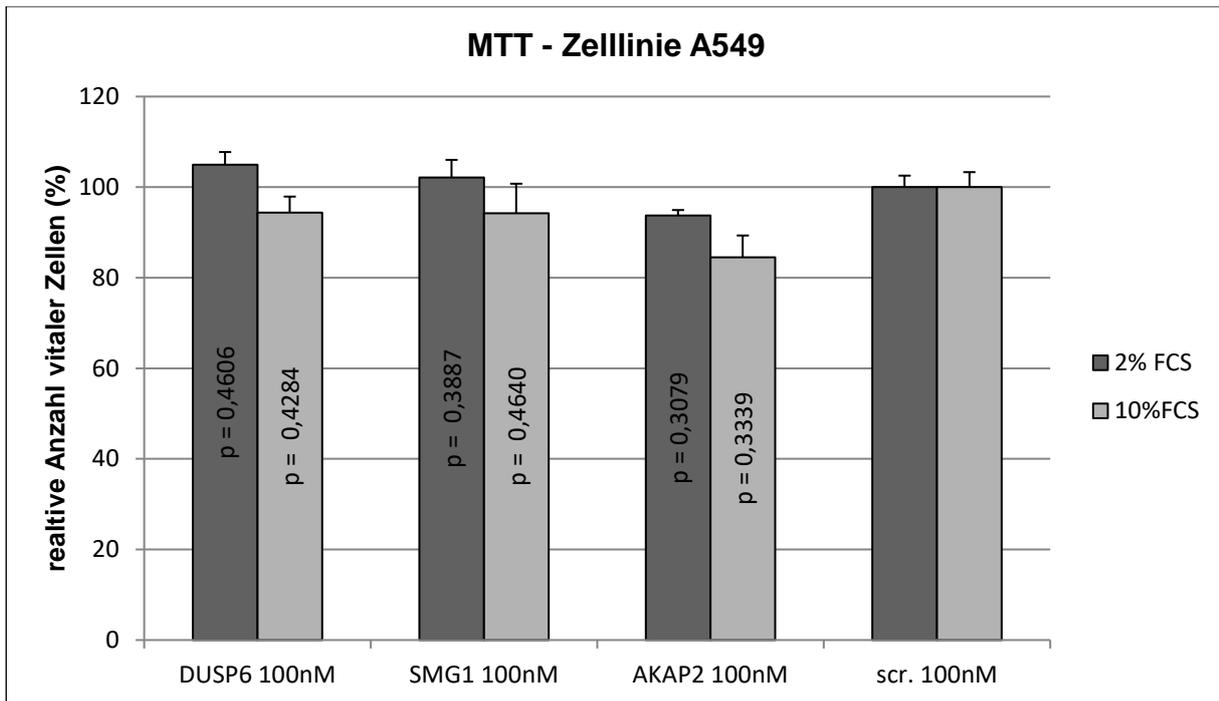


Abb. 23: MTT siRNA-transferierter A549-Zellen im Vgl. zur Referenzprobe scr. (=100%). Die optische Dichte (OD) lag zwischen 550 und 690 nm. Die einzelnen p-Werte in Bezug zur Referenzreihe sind in den entsprechenden Säulen vermerkt.

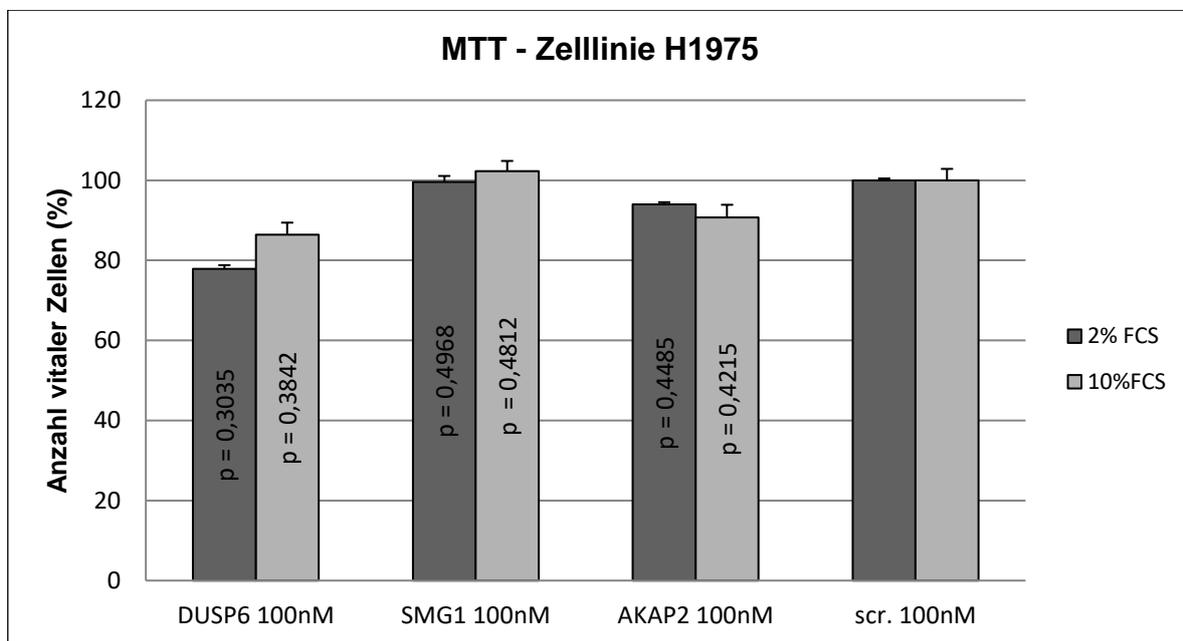


Abb. 24: MTT siRNA-transferierter H1975-Zellen im Vgl. zur Referenzprobe scr. (=100%). Die optische Dichte (OD) lag zwischen 550 und 690 nm. Die einzelnen p-Werte in Bezug zur Referenzreihe sind in den entsprechenden Säulen vermerkt.

In den MTT-Tests konnte kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) bzgl. der relativen Anzahl vitaler Zellen zwischen den siRNA-transfizierten humanen Lungenzellen und den Referenzzellen (scr.) festgestellt werden.

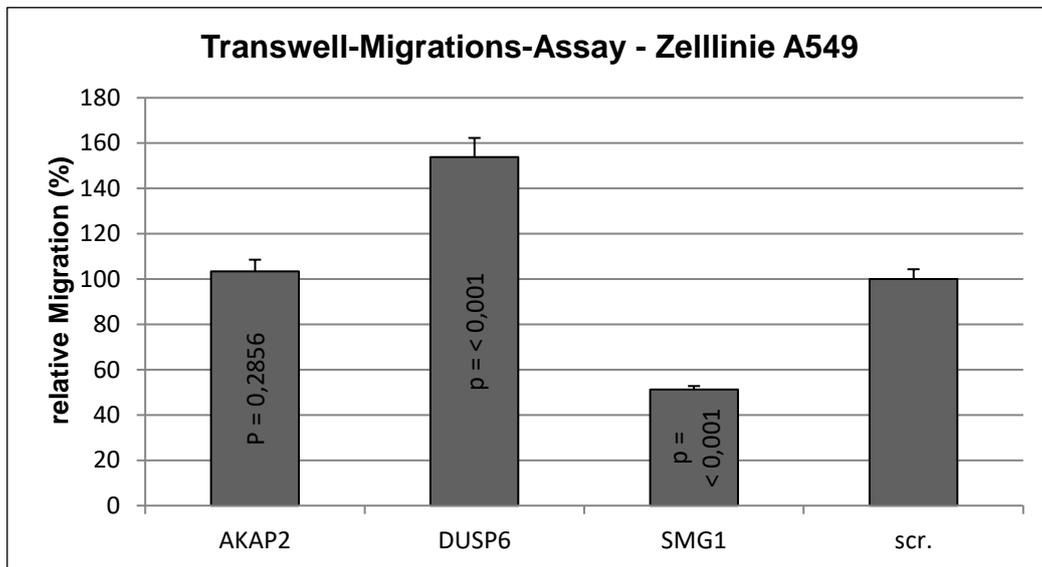


Abb. 25: Transwell-Migrations-Assay via Boyden-Kammer siRNA-transfizierter A549-Zellen im Vgl. zur Referenzprobe scr. (=100%)

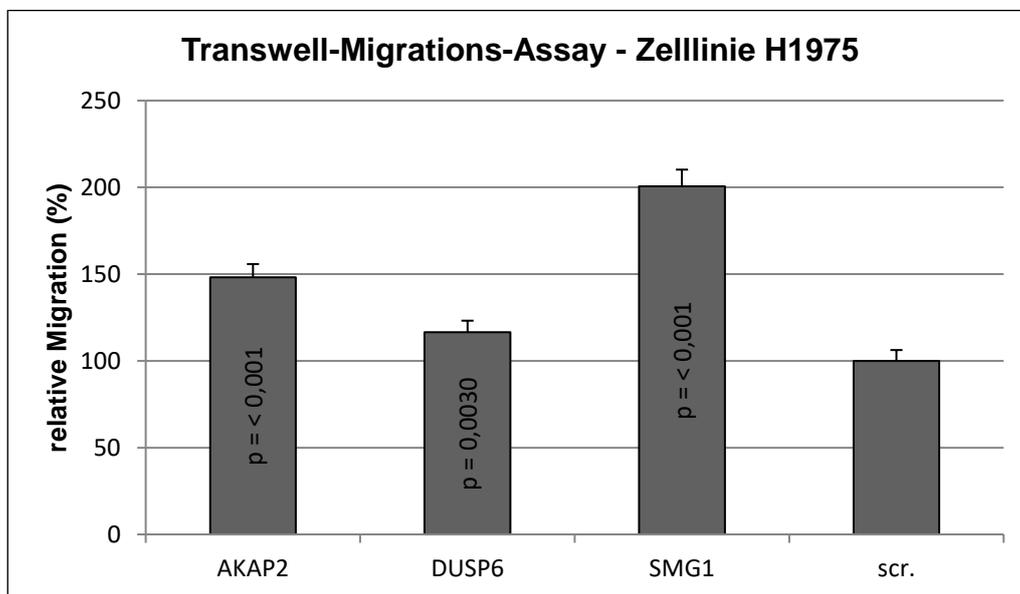


Abb. 26: Transwell-Migrations-Assay via Boyden-Kammer siRNA-transfizierter H1975-Zellen im Vgl. zur Referenzprobe scr. (=100%)

Es zeigte sich hierbei ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied im Migrationsverhalten DUSP6- und SMG1-siRNA-transfizierter A549- und H1975-Zellen im Vergleich zu den Referenzzellen (scr.), zudem von AKAP2-siRNA-transfizierten Zellen in H1975-Zellen. Bezüglich der SMG1-Zellen ließen sich zwar eine vermehrte relative Migration in H1975-Zellen, allerdings eine verminderte relative Migration in A549-Zellen nachweisen.

Die Hypothese war, dass ein knockdown in NSCLC überexprimierter Gene zu einem Zusammenbruch des Zytoskeletts und somit zu einem kleinzelligen Phänotyp mit gesteigertem, ein knockdown in SCLC überexprimierter Gene analog hierzu zu einem vermindertem Migrationsverhalten führt. In den durchgeführten MTT-Tests und Scratch-Assays ließ sich die Annahme nicht bestätigen. Anders verhielt es sich in den Transwell-Migrations-Assays, in welchen sich ein signifikanter Unterschied im Migrationsverhalten siRNA-transfizierter Zelle zu den Referenzzellen zum Teil jedoch widersprüchlichen Verhaltens (s. SMG1) nachweisen ließ.

3.8 Validierung phosphospezifischer Bindungen durch FACS

Mithilfe von RT-PCR sollten die phosphospezifischen Bindungen K8S23, K8S73, K8S431, K18S33 und K18S in Relation zu K8/18 gesamt bei humanen Zellreihen von SCLC und NSCLC (Adenokarzinome) dargestellt werden. Die kleinzelligen Lungenkarzinome wurden analog zu ihrem Wachstumsverhalten in adhärenente Zellen, semiadhärenente Zellen und Zellen in Suspension unterteilt. Es zeigt sich, dass sich die adhärenente SCLC-Zellen bezüglich ihrer phosphospezifischen Bindungen kaum von den NSCLC unterscheiden. Bei in Suspension befindlichen SCLC wiederum zeigt sich eine deutliche Unterexpression der phosphospezifischen Bindungen (Abb. 27-28).

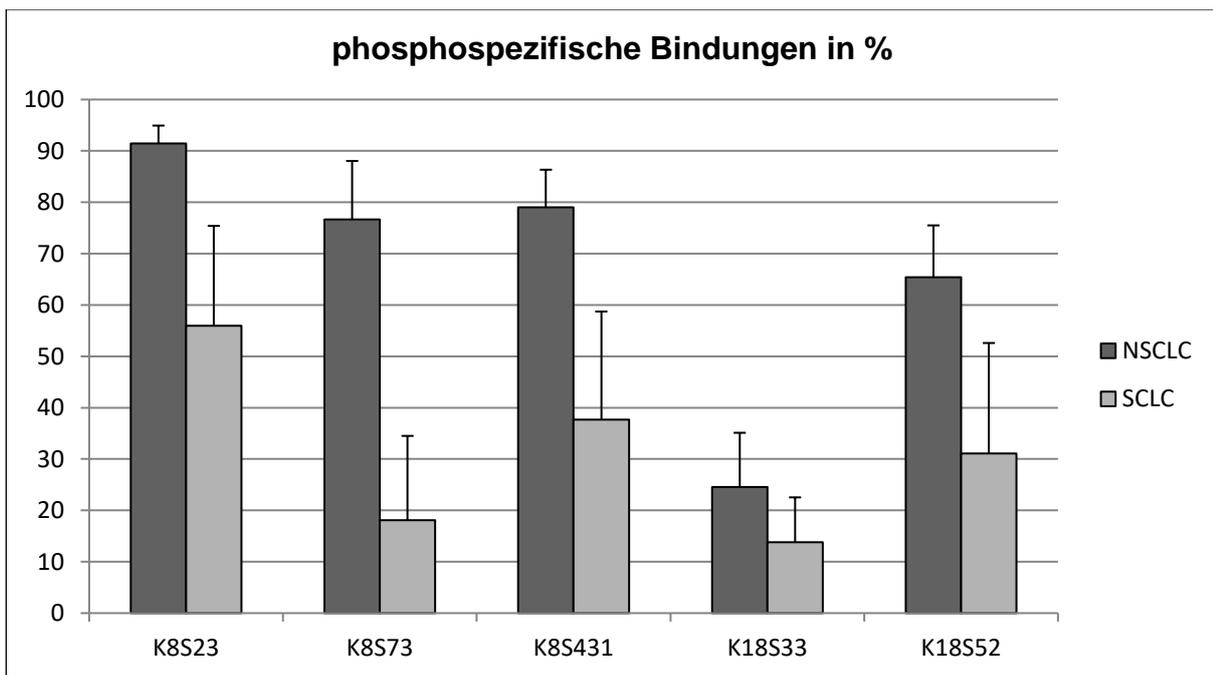


Abb. 27: Phosphospezifische Bindungen bei SCLC und NSCLC in Relation zu Keratinen 8 und 18

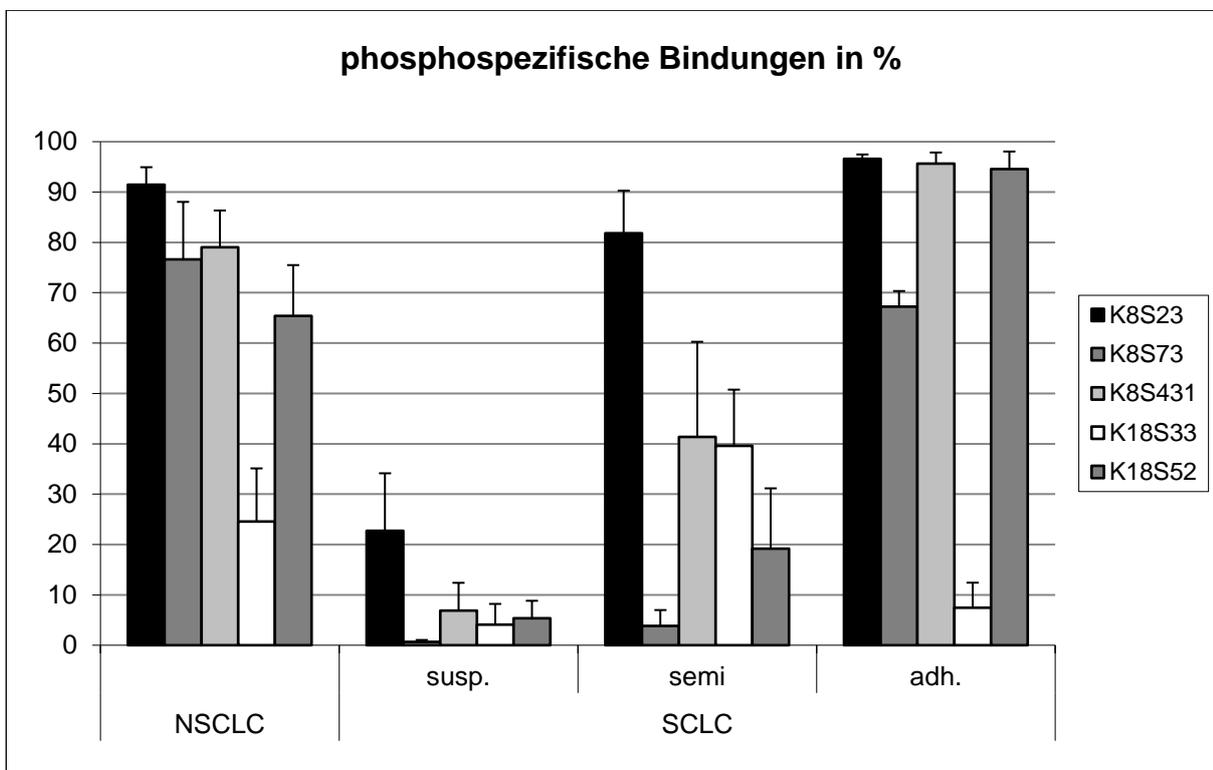


Abb. 28: Phosphospezifische Bindungen bei SCLC - unterteilt in adhären wachsende, semiadhären wachsende und in Suspension wachsende Zellreihen - und NSCLC, in Relation zu den Keratinen 8 und 18

3.9 Western Blot

Im Anschluss wurde versucht, Western Blots zu etablieren, um in einem weiteren Schritt einen ggf. erfolgreichen Knockdown nachweisen zu können. Allerdings gestaltete sich dieses Unterfangen zeitbedingt frustan, wie in Abbildung 29 exemplarisch dargestellt.

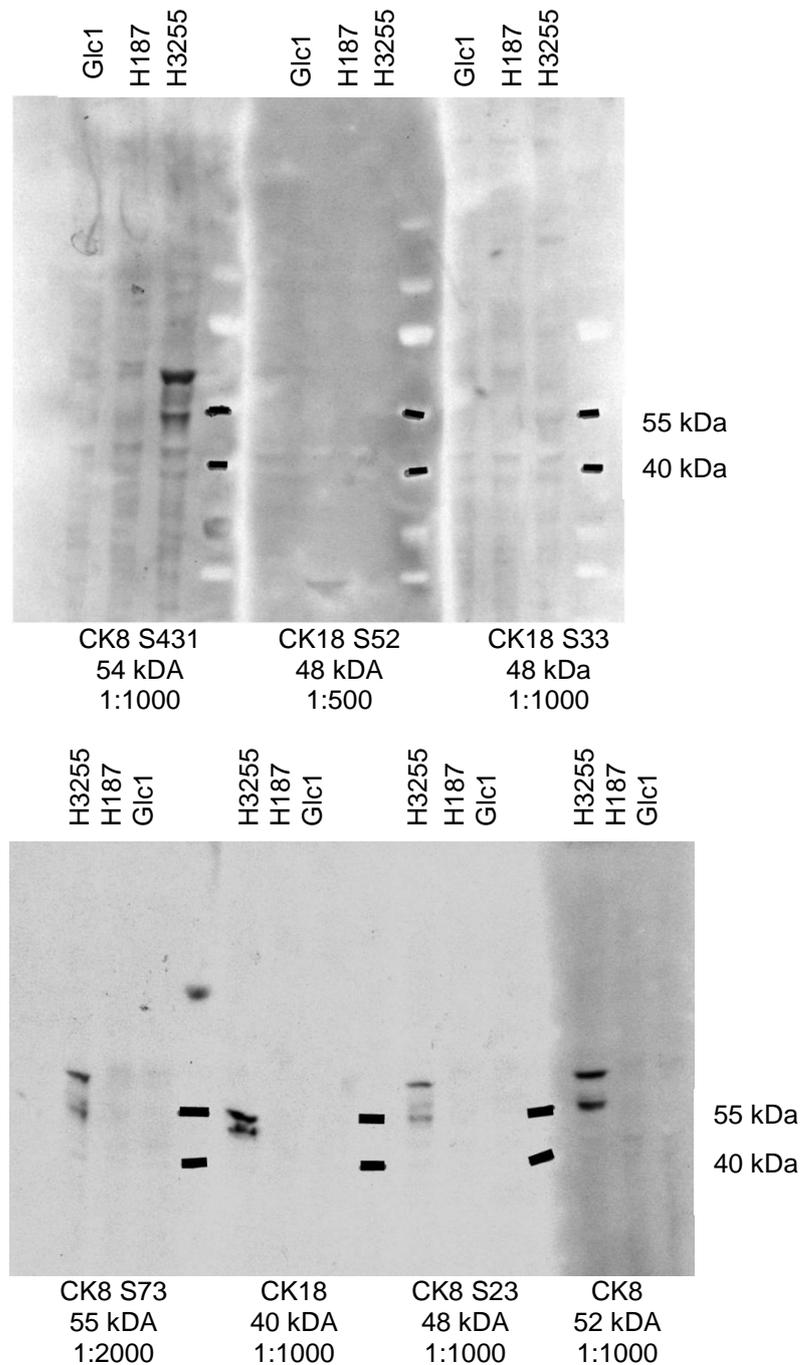


Abb. 29: Exemplarisches Beispiel eines Western Blots phosphospezifischer Bindungen in den 3 Zellreihen H3255 (NSCLC), H187 (SCLC), GLC1 (SCLC)

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte einem möglichen funktionellem Zytoskelett-Verlust, insbesondere des Keratins und vor allem in Folge einer Hyperphosphorylierung, als Ursache eines kleinzelligen Phänotyps mit aggressiverer Tumor-Biologie in Lungenkarzinomen nachgegangen werden. Grundlage der Hypothese war unter anderem ein in Immun- und Fluoreszenzfärbungen nachgewiesenes, kondensiertes, perinukleäres Keratingerüst in SCLC.

Im Vorfeld wurden cDNA Array-Daten multipler Lungenkarzinom-Zelllinien reanalysiert, hierbei signifikant differentiell exprimierte Kinasen und Phosphatasen mit möglicher Zytoskelett-Regulierung identifiziert.

Nach entsprechender Etablierung der Färbeprotokolle konnten unterstützende immunhistochemische Färbungen von TMA eine signifikante differentielle Expression der jeweiligen Gene in SCLC- und NSCLC-Primärtumoren bestätigen. Allerdings fielen einige der Ergebnisse entgegen der Erwartungen aus, wobei eine genauere Funktion der Gene nicht vollends geklärt ist.

Ob eine Überexpression oder ein Knockdown der jeweiligen Target-Gene einen funktionellen, dann auch nachweisbaren Einfluss ausübt, gilt es zu testen.

So könnte ein geglückter Knockdown funktionell in einer Größenänderung einzelner Zellen mittels FACS nachgewiesen werden.

Eine Alternative bietet die sogenannte CRISPR/Cas-Technologie (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated proteins*), welche ermöglicht, Genom an spezifischer Stelle zu entfernen oder auszuschalten (Garneau, Dupuis et al. ; Jinek, Chylinski et al. ; Jansen, Embden et al., 2002). Das CRISPR/Cas-System selbst hat seinen Ursprung in 1987 erstmalig detektierten, repetitiven Blöcken nahezu identischer DNA-Sequenzen im Genom des Bakteriums *Escheria coli* (Ishino, Shinagawa et al., 1987). Im Laufe der Zeit wurde erkannt, dass diese speziellen DNA-Sequenzen in zahlreichen Bakterien und Archaeen vorkommen (Mojica, Diez-Villasenor et al., 2000) und als Immunsystem zur Abwehr von Viren (Bakteriophagen) dienen

(Bolotin, Quinquis et al., 2005; Mojica, Diez-Villasenor et al., 2005; Barrangou, Fremaux et al., 2007). In weiteren Nachforschungen konnte gezeigt werden, dass zu dem CRISPR gehörende CasProteine „Genschere“ darstellen, welche bestimmte RNA-Sequenzen als zielführende Moleküle binden können. Die gebundene Leit-RNA bestimmt letztlich, welche komplementäre DNA von der Genschere angesteuert und punktgenau geschnitten wird, somit ein Genom Editing ermöglicht (Fineran and Charpentier).

In Experimenten mit Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass eine Hyperphosphorylierung scheinbar zu einem Zusammenfall des Keratin-Zytoskeletts führt (Strnad, Windoffer et al., 2003), es zu einer kurzfristigen Bildung granulärer Keratin-Aggregate ähnlich denen in SCLC kommt (Strnad, Windoffer et al., 2002).

In unseren Untersuchungen mittels RT-PCR sowie FACS-Messungen von in Kultur genommenen humanen Lungenkarzinom-Zelllinien konnte ein signifikanter Unterschied phosphospezifischer Bindungen nur zwischen NSCLC und in Suspension befindlichen SCLC, nicht jedoch zwischen NSCLC und adhärennten SCLC nachgewiesen werden. Zellkulturartefakte müssen hier somit berücksichtigt werden.

Gegen Ende der Doktorarbeit haben wir versucht, Western Blots zu etablieren, um zu schauen, ob ein Knockdown der phosphospezifischen Bindungen funktioniert hat. Dies gestaltete sich im gegebenen zeitlichen Rahmen frustant.

Spricht man von phänotypischen Änderungen maligne entarteter Zellen stößt man zwangsläufig auf die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), einem erstmals 1982 von Greenburg und Hay (Greenburg and Hay, 1982) beschriebenen Prozess, der während der Embryogenese nahezu aller mehrzelliger Organismen eine bedeutende Rolle spielt, wie unter anderem an der Gastrulation, der Neurulation oder der Etablierung von Ekto-, Meso- und Endoderm zu sehen ist (Thiery, 2002). Aber auch mit der Progression und Metastasierung von Karzinomen, mit Wundheilungsstörungen und mit fibrosierenden Erkrankungen wird die EMT in Verbindung gebracht (Thiery, 2002; Huber, Kraut et al., 2005). Während der EMT kommt es zu einer Umgestaltung bzw. einem Abbau von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten sowie zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. Die entstehenden Zellen besitzen keine Basallamina mehr, bilden untereinander lediglich

fokale Kontakte aus und weisen statt einer apikal-basalen eine sogenannte front-end back-end Polarität auf (Hay, 1995; Kalluri and Neilson, 2003). Sie zeigen in Kultur eine spindelförmige, Fibroblasten-ähnliche Morphologie, exprimieren mesenchymale Proteine und erwerben die Fähigkeit zur Beweglichkeit (Thiery and Sleeman, 2006).

Es wurden verschiedene, zum Teil gewebsspezifische, eine EMT auslösende Faktoren beschrieben. Eine allgemeine Voraussetzung scheint häufig eine Auflösung der Basalmembran durch Metalloproteinasen oder andere Matrix-degradierende Enzyme zu sein (Zeisberg, Bonner et al., 2001). Man konnte zeigen, dass die lokale Expression von Transforming growth factor beta (TGF- β), Epidermal growth factor (EGF), Insulin-like growth factor II (IGF II) oder Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) eine EMT über die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren und eine anschließende Aktivierung spezifischer Kinasen, darunter Tyrosin-Kinasen, initiieren oder unterstützen kann (Fan, Ng et al., 1999). Zu den weiterführenden Signalwegen gehören GTPasen der Ras-Superfamilie, Rho, Rac oder c-Src. (Savagner, 2001). Der TGF- β Effekt wird zum Beispiel typischerweise über eine Smad-abhängige Regulation der Transkription, alternativ unter anderem über den p38-MAP-Kinase- oder den RhoA-Signalweg vermittelt (Derynck and Zhang, 2003). Die EMT geht zudem mit der Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren einher, zu denen unter anderem die Zinkfinger-Proteine der Snail-Superfamilie (Snail, Slug und Scratch) zählen. In zahlreichen Studien konnte belegt werden, dass EMT-Signalwege während der Progression unterschiedlicher Tumorarten aktiviert sind. Ein invasives oder metastatisches Wachstum ist oft mit Genexpressionsmustern und Eigenschaften, welche für den mesenchymalen Phänotyp charakteristisch sind, vergesellschaftet. So findet sich eine vermehrte Expression von Vimentin, FSP-1, SNAI1 und SNAI2 oder nukleäres β -Catenin, während E-Cadherin oder die Cytokeratine 8, 9 und 18 nur noch reduziert oder gar nicht mehr exprimiert werden. (Bersx, Raspe et al., 2007) Da der Vorgang der EMT ein kontinuierlicher ist, entstehen „metastabile“ Zwischenstadien mit epithelialen und mesenchymalen Merkmalen (Lee, Dedhar et al., 2006).

In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein Verlust des Keratin-Zytosklettes nicht ausreicht, um eine EMT zu induzieren, sondern vielmehr als Folgezustand zu werten ist (Konig, Meder et al.). Eine Inaktivierung aller vier Allele von RB1 und TP53 wurde als Grundlage für kleinzellige Karzinome, darunter SCLC, nachgewiesen (Meuwissen, Linn

et al., 2003). Darauf aufbauend postulierten Meder et al. einen alternativen Weg zu einem sekundärem, aus einem NSCLC sich ableitenden SCLC über die zentrale Achse NOTCH-ASCL1-RB-p53 (neurogenic locus notch homolog - achates-scute homolog 1 - retinoblastoma protein - tumor protein 53). So scheint ein geändertes NOTCH-Signal aufgrund von Rezeptor-Mutationen des ASCL1 zu einer Überexpression dieses Transkriptionsfaktors zu führen. Dies wiederum führt zu einer Inaktivierung der RB-p53-Achse, führt zu einer neuroendokrinen Differenzierung und über die CDK5 (cyclin-dependant kinase 5) zu einer erhöhten Proliferation und Migration in Lungenkarzinomzellen. (Meder, König et al.)

5. Zusammenfassung

Das Lungenkarzinom stellt die häufigste tumorbedingte Todesursache in westlichen Industrienationen dar. Anhand der Histologie und damit verbunden des biologischen Verhaltens, der Prognose und der Therapiemöglichkeiten werden kleinzellige (small cell lung cancer, SCLC) und nicht-kleinzellige (non-small cell lung cancer, NSCLC) Lungentumoren unterschieden. Während NSCLC große, zusammenhängende Primärtumoren mit einem intakten Keratin- und Aktin-Zytoskelett bilden, tendieren SCLC bei kollabiertem, perinukleär kondensiertem Keratin- und Aktin-Zytoskelett zu einem eher diffusen Wachstum mit früherer Metastasierung.

In vorliegender Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob ein funktioneller Verlust des Zytoskelettes, insbesondere des Keratins und vor allem in Folge einer Hyperphosphorylierung, zu einem kleinzelligen Phänotyp mit aggressiverer Tumor-Biologie in Lungenkarzinomen führt.

Im Vorfeld wurden cDNA Array-Daten von 53 NSCLC und 51 SCLC Zelllinien analysiert und hierbei signifikant differentiell exprimierte Kinasen und Phosphatasen mit möglicher Zytoskelett-Regulierung identifiziert.

Nach entsprechender Etablierung von Färbeprotokollen konnten unterstützende immunhistochemische Färbungen von Tissue-Microarrays (TMA) eine signifikante differentielle Expression der jeweiligen Gene in SCLC- und NSCLC-Primärtumoren bestätigen.

Ob eine Überexpression oder ein Knockdown der jeweiligen Target-Gene allerdings einen funktionellen, dann auch nachweisbaren Einfluss ausübt, gilt es zu testen. Erste Versuche mit siRNA-transfizierten Zellen in MTT-Tests, Scratch-Assays sowie Boyden-Kammer-Experimenten waren nicht wegweisend.

Ein signifikanter Unterschied der Phosphorylierung konnte zwischen NSCLC und in Suspension befindlichen SCLC Zellen in Kultur nachgewiesen werden.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Panzytokeratin Immun- bzw. Fluoreszenz-Färbung eines nicht-kleinzelligen und eines kleinzelligen Lungentumors im Vergleich.....	9
Abb. 2: Die einzelnen Komponenten des Zytoskeletts in einer Übersicht.	20
Abb. 3: Modell einer SCLC-Induktion aus verschiedenen Vorläuferzellen.	22
Abb. 4: TMA-Produktion	25
Abb. 5: Bewertungsschema der Färbeintensität.....	28
Abb. 6: hierarchische Clusteranalyse von NSCL und SCLC Zelllinien	38
Abb. 7: Repräsentative Färbungen mit einem AKAP2-Antikörper auf TMA.....	44
Abb. 8: Repräsentative Färbungen mit einem AKAP11-Antikörper auf TMA.....	45
Abb. 9: Repräsentative Färbungen mit einem PKAC α -Antikörper auf TMA	47
Abb. 10: Repräsentative Färbungen mit einem PKA2 β -Antikörper auf TMA	48
Abb. 11: Repräsentative Färbungen mit einem DUSP6-Antikörper auf TMA	50
Abb. 12: Repräsentative Färbungen mit einem MARCKS-Antikörper auf TMA.....	53
Abb. 13: Repräsentative Färbungen mit einem SMG1-Antikörper auf TMA	55
Abb. 14: RT-PCR humaner Lungenkarzinom-Zellreihen, einzeln aufgeführt, mit DUSP6 in Relation zu 28S.	56
Abb. 15: RT-PCR humaner Lungenkarzinom-Zellreihen, zusammengefasst als NSCLC und SCLC, mit DUSP6 in Relation zu 28S.	57
Abb. 16: RT-PCR humaner Lungenkarzinom-Zellreihen, einzeln aufgeführt, mit PKA2 β in Relation zu 28S.....	57
Abb. 17: RT-PCR humaner Lungenkarzinom-Zellreihen, zusammengefasst als NSCLC und SCLC, mit PKA2 β in Relation zu 28S.	58
Abb. 18: RT-PCR humaner Lungenkarzinom-Zellreihen, einzeln aufgeführt, mit SMG1 in Relation zu 28S.....	58
Abb. 19: RT-PCR humaner Lungenkarzinom-Zellreihen, zusammengefasst als NSCLC und SCLC, mit SMG1 in Relation zu 28S.....	59
Abb. 20: RTq-PCR nach siRNA-Transfektion von H1838-Zellen mit MARCKS. Gezeigt wird die relative Expression zu mit scrambled-siRNA transfizierten Zellen.	60
Abb. 21: RTq-PCR nach siRNA-Transfektion von HCC827-Zellen mit MARCKS. Gezeigt wird die relative Expression zu mit scrambled-siRNA transfizierten Zellen.	60

Abb. 22: RTq-PCR nach siRNA-Transfektion von H1838-Zellen mit PKAC α . Gezeigt wird die relative Expression zu mit scrambled-siRNA transfizierten Zellen.....	61
Abb. 23: MTT siRNA-transferierter A549-Zellen im Vgl. zur Referenzprobe scr. (=100%). Die optische Dichte (OD) lag zwischen 550 und 690 nm	62
Abb. 24: MTT siRNA-transferierter H1975-Zellen im Vgl. zur Referenzprobe scr. (=100%). Die optische Dichte (OD) lag zwischen 550 und 690 nm	62
Abb. 25: Transwell-Migrations-Assay via Boyden-Kammer siRNA-transfizierter A549-Zellen im Vgl. zur Referenzprobe scr. (=100%).	63
Abb. 26: Transwell-Migrations-Assay via Boyden-Kammer siRNA-transfizierter H1975-Zellen im Vgl. zur Referenzprobe scr. (=100%)	63
Abb. 27: Phosphospezifische Bindungen bei SCLC und NSCLC in Relation zu Keratinen 8 und 18.	65
Abb. 28: Phosphospezifische Bindungen bei SCLC - unterteilt in adhären wachsende, semiadhären wachsende und in Suspension wachsende Zellreihen - und NSCLC, in Relation zu den Keratinen 8 und 18.	65
Abb. 29: Exemplarisches Beispiel eines Western Blots phosphospezifischer Bindungen in den 3 Zellreihen H3255 (NSCLC), H187 (SCLC), GLC1 (SCLC).	66

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten humanen Lungenkarzinom-Zellreihen.....	23
Tab. 2: Übersicht der immunhistochemisch verwendeten Antikörper	26
Tab. 3: Informationen über die verwendeten Primer.....	31
Tab. 4: Übersicht der gewählten Kinasen und Phosphatasen bzw. ihrer Signal-regulatoren mitsamt kurzer Funktionsbeschreibung.....	39
Tab. 5: Grundeigenschaften des Patientenkollektivs	40
Tab. 6: Übersicht der immunhistochemisch verwendeten Antikörper.	41
Tab. 7: Verteilung des Antikörpers AKAP2 nach oben genanntem Punkteschema	43
Tab. 8: Fisher Exact Probability Test: 2x4 inkl. Chi-Square-Test für AKAP2	43
Tab. 9: Verteilung des Antikörpers AKAP11 nach oben genanntem Punkteschema	45
Tab. 10: Fisher Exact Probability Test: 2x4 inkl. Chi-Square-Test für AKAP11	46
Tab. 11: Verteilung des Antikörpers PKAC α nach oben genanntem Punkteschema.....	46
Tab. 12: Fisher Exact Probability Test: 2x4 inkl. Chi-Square-Test für PKAC α	47
Tab. 13: Verteilung des Antikörpers PKA2 β nach oben genanntem Punkteschema	49
Tab. 14: Fisher Exact Probability Test: 2x4 für PKA2 β	49
Tab. 15: Verteilung des Antikörpers DUSP6 nach oben genanntem Punkteschema ...	51
Tab. 16: Fisher Exact Probability Test: 2x4 inkl. Chi-Square-Test für DUSP6.....	51
Tab. 17: Verteilung des Antikörpers nach oben genanntem Punkteschema	52
Tab. 18: Fisher Exact Probability Test: 2x4 inkl. Chi-Square-Test für MARCKS	52
Tab. 19: Verteilung des Antikörpers SMG1 nach oben genanntem Punkteschema	54
Tab. 20: Fisher Exact Probability Test: 2x4 inkl. Chi-Square-Test für SMG1	54

8. Literaturverzeichnis

Abercrombie M, Heaysman JE, Pegrum SM. The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp Cell Res* 1970; 59: 393-398

Abercrombie M, Heaysman JE, Pegrum SM. The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp Cell Res* 1971; 67: 359-367

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: Garland Science, 2002.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 5th edition. New York: Garland Science, 2008.

Aspenstrom P, Fransson A, Saras J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* 2004; 377: 327-337

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007; 315: 1709-1712

Bartles JR. Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 72-78

Beer DG, Kardia SL, Huang CC, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE, Lin L, Chen G, Gharib TG, Thomas DG, Lizyness ML, Kuick R, Hayasaka S, Taylor JM, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash S. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002; 8: 816-824

Berx G, Raspe E, Christofori G, Thiery JP, Sleeman JP. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin Exp Metastasis* 2007; 24: 587-597

Betz RC, Planko L, Eigelshoven S, Hanneken S, Pasternack SM, Bussow H, Van Den Bogaert K, Wenzel J, Braun-Falco M, Rutten A, Rogers MA, Ruzicka T, Nöthen MM, Magin TM, Kruse R. Loss-of-function mutations in the keratin 5 gene lead to Dowling-Degos disease. *Am J Hum Genet* 2006; 78: 510-519

Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000; 348: 241-255

Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 2005; 151: 2551-2561

Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 2001; 18: 1059-1068

Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, Hong Y, Chua NH, Pantaloni D. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol* 1997;136: 1307-1322

Chan DW, Liu VW, Tsao GS, Yao KM, Furukawa T, Chan KK, Ngan HY. Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1742-1750

Chen RQ, Yang QK, Chen YL, Oliveira VA, Dalton WS, Fearn C, Lee JD. Kinome siRNA screen identifies SMG-1 as a negative regulator of hypoxia-inducible factor-1 α in hypoxia. *J Biol Chem* 2009; 284: 16752-16758

Chou CF, Omary MB. Mitotic arrest-associated enhancement of O-linked glycosylation and phosphorylation of human keratins 8 and 18. *J Biol Chem* 1993; 268: 4465-4472

Cooper JA, Buhle EL Jr, Walker SB, Tsong TY, Pollard TD. Kinetic evidence for a monomer activation step in actin polymerization. *Biochemistry* 1983; 22: 2193-2202

Coulombe PA, Omary MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 110-122

Da Costa SR, Sou E, Xie J, Yarber FA, Okamoto CT, Pidgeon M, Kessels MM, Mircheff AK, Schechter JE, Qualmann B, Hamm-Alvarez SF. Impairing actin filament or syndapin functions promotes accumulation of clathrin-coated vesicles at the apical plasma membrane of acinar epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 4397-4413

Day ME, Gaietta GM, Sastri M, Koller A, Mackey MR, Scott JD, Perkins GA, Ellisman MH, Taylor SS. Isoform-specific targeting of PKA to multivesicular bodies. *J Cell Biol*; 193: 347-363

Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003; 425: 577-584

Disanza A, Steffen A, Hertzog M, Frittoli E, Rottner K, Scita G. Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 955-970

Diviani D, Scott JD. AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *J Cell Sci* 2001; 114: 1431-1437

Dransart E, Morin A, Cherfils J, Olofsson B. RhoGDI-3, a promising system to investigate the regulatory function of rhoGDIs: uncoupling of inhibitory and shuttling functions of rhoGDIs. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 623-626

Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; 420: 629-635

Fan JM, Ng YY, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int* 1999; 56: 1455-1467

Fineran PC, Charpentier E. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: acquisition of new information. *Virology*; 434: 202-209

Finlayson AE, Freeman KW. A cell motility screen reveals role for MARCKS-related protein in adherens junction formation and tumorigenesis. *PLoS One* 2009; 4: e7833

Frixione E. Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: a 300-year epic. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000; 46: 73-94

Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 1998; 279: 514-519

Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 2010; 468: 67-71

Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 1982; 95: 333-339

Hatzfeld M, Franke WW. Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides. *J Cell Biol* 1985; 101: 1826-1841

Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 1985; 154: 8-20

Herrmann H, Aebi U. Structure, assembly, and dynamics of intermediate filaments. *Subcell Biochem* 1998; 31: 319-362

Herrmann H, Häner M, Brettel M, Müller SA, Goldie KN, Fedtke B, Lustig A, Franke WW, Aebi U. Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. *J Mol Biol* 1996; 264: 933-953

Herrmann H, Hesse M, Reichenzeller M, Aebi U, Magin TM. Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. *Int Rev Cytol* 2003; 223: 83-175

Hesse M, Zimek A, Weber K, Magin TM. Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *Eur J Cell Biol* 2004; 83: 19-26

Holy TE, Leibler S. Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 5682-5685

Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 548-558

Ishikawa H, Bischoff R, Holtzer H. Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J Cell Biol* 1968; 38: 538-555

Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 1987; 169: 5429-5433

Izzard CS, Lochner LR. Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J Cell Sci* 1976; 21: 129-159

Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 247-269

Jansen R, Embden JD, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 2002; 43: 1565-1575

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2001; 61: 69-90

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*; 337: 816-821

Kaderali L, Zander T, Faigle U, Wolf J, Schultze JL, Schrader R. CASPAR: a hierarchical bayesian approach to predict survival times in cancer from gene expression data. *Bioinformatics* 2006; 22: 1495-1502

Kaibuchi K. Regulation of cytoskeleton and cell adhesion by Rho targets. *Prog Mol Subcell Biol* 1999; 22: 23-38

Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1776-1784

Kalwa H, Michel T. The MARCKS protein plays a critical role in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism and directed cell movement in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*; 286: 2320-2330

Kelleher JF, Atkinson SJ, Pollard TD. Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol* 1995; 131: 385-397

Kim S, Coulombe PA. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev* 2007; 21: 1581-1597

Kim S, Wong P, Coulombe PA. A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature* 2006; 441: 362-365

König K, Diehl L, Rommerscheidt-Fuss U, Golletz C, Quast T, Kahl P, Kolanus W, Knolle P, Buettner R, Heukamp LC. Four-and-a-half LIM domain protein 2 is a novel regulator of sphingosine 1-phosphate receptor 1 in CCL19-induced dendritic cell migration. *J Immunol* 2010; 185: 1466-1475

König K, Meder L, Kröger C, Diehl L, Florin A, Rommerscheidt-Fuss U, Kahl P, Wardelmann E, Magin TM, Buettner R, Heukamp LC. Loss of the keratin cytoskeleton is not sufficient to induce epithelial mesenchymal transition in a novel KRAS driven sporadic lung cancer mouse model. *PLoS One* 2013; 8: e57996

Korn ED, Carlier MF, Pantaloni D. Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* 1987; 238: 638-644

Kreishman-Deitrick M, Egile C, Hoyt DW, Ford JJ, Li R, Rosen MK. NMR analysis of methyl groups at 100-500 kDa: model systems and Arp2/3 complex. *Biochemistry* 2003; 42: 8579-8586

Ku NO, Omary MB. Phosphorylation of human keratin 8 in vivo at conserved head domain serine 23 and at epidermal growth factor-stimulated tail domain serine 431. *J Biol Chem* 1997; 272: 7556-7564

K Ku NO, Omary MB. A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. *J Cell Biol* 2006; 174: 115-125

Ku NO, Zhou X, Toivola DM, Omary MB. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *Am J Physiol* 1999; 277: G1108-1137

Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006; 172: 973-981

- Liao J, Ku NO, Omary MB. Stress, apoptosis, and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at Ser-73 in tissues and cultured cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 17565-17573
- Liao J, Omary MB. 14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor. *J Cell Biol* 1996; 133: 345-357
- Lin KW, Fang S, Park J, Crews AL, Adler KB. MARCKS and related chaperones bind to unconventional myosin V isoforms in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; 43: 131-136
- Liu H, Maurice DH. Phosphorylation-mediated activation and translocation of the cyclic AMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by cyclic AMP-dependent protein kinase and mitogen-activated protein kinases. A potential mechanism allowing for the coordinated regulation of PDE4D activity and targeting. *J Biol Chem* 1999; 274: 10557-10565
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129-2139
- MacFarlane M, Merrison W, Dinsdale D, Cohen GM. Active caspases and cleaved cytokeratins are sequestered into cytoplasmic inclusions in TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Biol* 2000; 148: 1239-1254
- Machesky LM, Atkinson SJ, Ampe C, Vandekerckhove J, Pollard TD. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol* 1994; 127: 107-115
- Magin TM, Vijayaraj P, Leube RE. Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res* 2007; 313: 2021-2032
- Mallavarapu A, Mitchison T. Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J Cell Biol* 1999; 146: 1097-1106

Margolis SS, Perry JA, Forester CM, Nutt LK, Guo Y, Jardim MJ, Thomenius MJ, Freel CD, Darbandi R, Ahn JH, Arroyo JD, Wang XF, Shenolikar S, Nairn AC, Dunphy WG, Hahn WC, Virshup DM, Kornbluth S. Role for the PP2A/B56delta phosphatase in regulating 14-3-3 release from Cdc25 to control mitosis. *Cell* 2006; 127: 759-773

Matenia D, Mandelkow EM. The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* 2009; 34: 332-342

Meder L, König K, Ozretić L, Schultheis AM, Ueckerth F, Ade CP, Albus K, Boehm D, Rommerscheidt-Fuss U, Florin A, Buhl T, Hartmann W, Wolf J, Merkelbach-Bruse S, Eilers M, Perner S, Heukamp LC, Buettner R. NOTCH, ASCL1, p53 and RB alterations define an alternative pathway driving neuroendocrine and small cell lung carcinomas. *Int J Cancer* 2016; 138: 927-938

Meuwissen R, Linn SC, Linnoila RI, Zevenhoven J, Mooi WJ, Berns A. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer Cell* 2003; 4: 181-189

Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 1984; 312: 237-242

Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 2005; 60: 174-182

Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 2000; 36: 244-246

Moon SY, Zheng Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 13-22

Nobes CD, Hall A. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* 1995; 23: 456-459

Nobes CD, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* 1999; 144: 1235-1244

Okudela K, Yazawa T, Woo T, Sakaeda M, Ishii J, Mitsui H, Shimoyamada H, Sato H, Tajiri M, Ogawa N, Masuda M, Takahashi T, Sugimura H, Kitamura H. Down-regulation of DUSP6 expression in lung cancer: its mechanism and potential role in carcinogenesis. *Am J Pathol* 2009; 175: 867-881

Oliveira V, Romanow WJ, Geisen C, Otterness DM, Mercurio F, Wang HG, Dalton WS, Abraham RT. A protective role for the human SMG-1 kinase against tumor necrosis factor- α -induced apoptosis. *J Biol Chem* 2008; 283: 13174-13184

Olofsson B. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* 1999; 11: 545-554

Omary MB, Ku NO, Liao J, Price D. Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell Biochem* 1998; 31: 105-140

Omary MB, Ku NO, Tao GZ, Toivola DM, Liao J. "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem Sci* 2006; 31: 383-394

Oshima RG. Developmental expression of murine extra-embryonic endodermal cytoskeletal proteins. *J Biol Chem* 1982; 257: 3414-3421

Oshima RG, Baribault H, Caulín C. Oncogenic regulation and function of keratins 8 and 18. *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15: 445-471

Owens DW, Lane EB. The quest for the function of simple epithelial keratins. *Bioessays* 2003; 25: 748-758

Pallari HM, Eriksson JE. Intermediate filaments as signaling platforms. *Sci STKE* 2006; 2006: pe53

Pantaloni D, Le Clainche C, Carlier MF. Mechanism of actin-based motility. *Science* 2001; 292: 1502-1506

Parry DA. Hard alpha-keratin IF: a structural model lacking a head-to-tail molecular overlap but having hybrid features characteristic of both epidermal keratin and vimentin IF. *Proteins* 1995; 22: 267-272

Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 2000; 19: 5606-5613

Poepel A, Jarius S, Heukamp LC, Urbach H, Elger CE, Bien CG, Voltz R. Neurological course of long-term surviving patients with SCLC and anti-Hu syndrome. *J Neurol Sci* 2007; 263: 145-148

Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003; 112: 453-465

Prasad K, Zimmermann B, Prabhu G, Pai M. Data mining approach for automation of diagnosis of breast cancer in immunohistochemically stained tissue microarray images. *Open Med Inform J* 2010; 4: 86-93

Ridley AJ, Hall A. Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1992; 57: 661-671

Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992; 70: 401-410

Robbe K, Otto-Bruc A, Chardin P, Antonny B. Dissociation of GDP dissociation inhibitor and membrane translocation are required for efficient activation of Rac by the Dbl homology-pleckstrin homology region of Tiam. *J Biol Chem* 2003; 278: 4756-4762

Roberts PJ, Mitin N, Keller PJ, Chenette EJ, Madigan JP, Currin RO, Cox AD, Wilson O, Kirschmeier P, Der CJ. Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *J Biol Chem* 2008; 283: 25150-25163

Sander EE, Collard JG. Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1302-1308

Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 2001; 23: 912-923

Schafer DA, Cooper JA. Control of actin assembly at filament ends. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 497-518

Schuler H. ATPase activity and conformational changes in the regulation of actin. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1549: 137-147

Semenova EA, Nagel R, Berns A. Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. *Genes Dev* 2015; 29: 1447-1462

Small J, Rottner K, Hahne P, Anderson KI. Visualising the actin cytoskeleton. *Microsc Res Tech* 1999; 47: 3-17

Small JV, Kaverina I, Krylyshkina O, Rottner K. Cytoskeleton cross-talk during cell motility. *FEBS Lett* 1999; 452: 96-99

Small JV, Stradal T, Vignat E, Rottner K. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 2001; 12: 112-120

Strnad P, Windoffer R, Leube RE. Induction of rapid and reversible cyokeratin filament network remodeling by inhibition of tyrosine phosphatases. *J Cell Sci* 2002; 115: 4133-4148

Strnad P, Windoffer R, Leube RE. Light-induced resistance of the keratin network to the filament-disrupting tyrosine phosphatase inhibitor orthovanadate. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 198-203

Stumptner C, Omary MB, Fickert P, Denk H, Zatloukal K. Hepatocyte cyokeratins are hyperphosphorylated at multiple sites in human alcoholic hepatitis and in a mallory body mouse model. *Am J Pathol* 2000; 156: 77-90

Sutherland KD, Berns A. Cell of origin of lung cancer. *Mol Oncol*; 4: 397-403

Sutherland KD, Proost N, Brouns I, Adriaensen D, Song JY, Berns A. Cell of origin of small cell lung cancer: inactivation of Trp53 and Rb1 in distinct cell types of adult mouse lung. *Cancer Cell* 2011; 19: 754-764

Takenawa T, Miki H. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* 2001; 114: 1801-1809

Tao GZ, Toivola DM, Zhou Q, Strnad P, Xu B, Michie SA, Omary MB. Protein phosphatase-2A associates with and dephosphorylates keratin 8 after hyposmotic stress in a site- and cell-specific manner. *J Cell Sci* 2006; 119: 1425-1432

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 442-454

Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 131-142

Tilney LG, Bonder EM, DeRosier DJ. Actin filaments elongate from their membrane-associated ends. *J Cell Biol* 1981; 90: 485-494

Toivola DM, Nieminen MI, Hesse M, He T, Baribault H, Magin TM, Omary MB, Eriksson JE. Disturbances in hepatic cell-cycle regulation in mice with assembly-deficient keratins 8/18. *Hepatology* 2001; 34: 1174-1183

Tolias KF, Hartwig JH, Ishihara H, Shibasaki Y, Cantley LC, Carpenter CL. Type Ialpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Curr Biol* 2000; 10: 153-156

Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 2002; 23: 65-81

Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 2001; 294: 1299-1304

Vijayaraj P, Söhl G, Magin TM. Keratin transgenic and knockout mice: functional analysis and validation of disease-causing mutations. *Methods Mol Biol* 2007; 360: 203-251

Walczak CE. Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 52-56

Webster DR, Wehland J, Weber K, Borisy GG. Detyrosination of alpha tubulin does not stabilize microtubules in vivo. *J Cell Biol* 1990; 111: 113-122

Wegner A. Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol* 1976; 108: 139-150

Welch EJ, Jones BW, Scott JD. Networking with AKAPs: context-dependent regulation of anchored enzymes." *Mol Interv* 2010; 10: 86-97

Welch MD, Mullins RD. Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 18: 247-288

Windoffer R, Wöll S, Strnad P, Leube RE. Identification of novel principles of keratin filament network turnover in living cells. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 2436-2448

Wong VC, Chen H, Ko JM, Chan KW, Chan YP, Law S, Chua D, Kwong DL, Lung HL, Srivastava G, Tang JC, Tsao SW, Zabarovsky ER, Stanbridge EJ, Lung ML. Tumor suppressor dual-specificity phosphatase 6 (DUSP6) impairs cell invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-associated phenotype. *Int J Cancer* 2012; 130: 83-95

Wood W, Martin P. Structures in focus--filopodia. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 726-730

Yamashita A, Izumi N, Kashima I, Ohnishi T, Saari B, Katsuhata Y, Muramatsu R, Morita T, Iwamatsu A, Hachiya T, Kurata R, Hirano H, Anderson P, Ohno S. SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 2009; 23: 1091-1105

Yesner R. Heterogeneity of so-called neuroendocrine lung tumors. *Exp Mol Pathol* 2001; 70: 179-182

Zeisberg M, Bonner G, Maeshima Y, Colorado P, Müller GA, Strutz F, Kalluri R. Renal fibrosis: collagen composition and assembly regulates epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Am J Pathol* 2001; 159: 1313-1321

Zhang Z, Kobayashi S, Borczuk AC, Leidner RS, Laframboise T, Levine AD, Halmos B. Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) is an ETS-regulated negative feedback mediator of oncogenic ERK signaling in lung cancer cells. *Carcinogenesis* 2010; 31: 577-586

Zhao Y, Neltner BS, Davis HW. Role of MARCKS in regulating endothelial cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 279: C1611-1620

Zimmer S, Kahl P, Buhl TM, Steiner S, Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Buettner R, Heukamp LC. Epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer influence downstream Akt, MAPK and Stat3 signaling. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 723-730