

Einfluss von S100P auf die Initiation und Progression des bronchialen Adenokarzinoms

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von Diplom Biologin Grit Rehbein
geboren am 10.03.1980 in Zeitz

Gutachter: 1. Prof. Dr. Karin Breunig
 2. Prof. Dr. Andreas Simm
 3. Prof. Dr. Klaudia Giehl

Halle (Saale), 29.04.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	IV
1. Einleitung	1
1.1. Tumorbiologie.....	1
1.1.1. Intrazelluläre Veränderungen bei der Tumorentwicklung	2
1.1.2. Extrazelluläre Veränderungen bei der Tumorentwicklung	3
1.1.3. Die Behandlung von Tumorerkrankungen.....	5
1.2. Das Bronchialkarzinom.....	8
1.2.1. Ursachen und Subtypen des Bronchialkarzinoms	8
1.2.2. Die veränderte Genexpression im NSCLC - der RAGE-Rezeptor	10
1.3. Die S100-Proteine	11
1.3.1. Allgemeiner Aufbau und Funktion der S100-Proteine	11
1.3.3. S100P und seine Rolle in verschiedenen Tumorerkrankungen.....	14
1.4. Zielsetzung	17
2. Material und Methoden	18
2.1. Material	18
2.1.1. Chemikalien	18
2.1.2. Enzyme.....	20
2.1.3. Antikörper	21
2.1.4. Kits	22
2.1.5. Lösungen und Medien für die Zellkultur	22
2.1.6. Zelllinien	22
2.1.7. Plasmide, Bakterienstämme und genetisch veränderte humane Zelllinien	23
2.1.8. Oligonukleotide.....	25
2.2. Methoden.....	27
2.2.1. Patientengewebe.....	27
2.2.2. Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	27
2.2.3. Molekulargenetische Arbeiten mit RNA.....	35
2.2.4. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA	36

2.2.5. Kultivierungsbedingungen für Bakterienkulturen.....	41
2.2.6. Proteinbiochemische Methoden	43
2.2.7. Statistik.....	49
3. Ergebnisse	50
3.1. Expressionsanalyse von S100P	50
3.1.1. Die basale Expression verschiedener tumorrelevanter S100-Proteine.....	50
3.1.2. Die Expression von S100P unter dem Einfluss verschiedener zytotoxischer Agenzien.....	51
3.1.3. Einfluss von Proteinkinasen auf die mRNA-Expression von S100P.....	54
3.2. Einfluss von S100P auf die Resistenz und Phagozytose von Bronchialkarzinom- Zellen.....	57
3.2.1. Nachweis der stabilen Überexpression von S100P in H358-Zellen	57
3.2.2. Einfluss von S100P auf den durch zytotoxische Agenzien induzierten Zelltod von H358-Zellen.....	58
3.2.3. Einfluss von S100P auf die Phagozytose apoptotisch sterbender H358- Zellen.....	60
3.3. Einfluss von S100P auf die Malignität von Karzinomzellen <i>in vitro</i>	63
3.3.1. Einfluss von S100P auf die Proliferation der H358-Zellen.....	63
3.3.2. Einfluss von S100P auf die Bildung von Tumorzellkolonien <i>in vitro</i>	65
3.3.3. Einfluss von S100P auf die Migration von H358-Zellen <i>in vitro</i>	65
3.3.4. Einfluss von S100P auf die Proliferation, Tumorzellkolonie-Bildung und Migration von Panc-1-Zellen <i>in vitro</i>	67
3.4. Expression, Lokalisierung und intrazelluläre Funktion von S100P in H358-Zellen ...	70
3.4.1. Einfluss der DNA-Methylierung auf die mRNA-Expression von S100P.....	70
3.4.2. Intrazelluläre Lokalisierung von S100P	71
3.4.3. Einfluss des intrazellulären Ca ²⁺ -Gehalts auf die Polymerisierung von GFP-S100P.....	73
3.4.4. Ezrin als intrazellulärer Interaktionspartner von S100P	74
3.4.5. Einfluss der erhöhten Expression von S100P auf die Expression anderer Gene in Geweben und Zellen.....	75
3.4.6. Korrelation der mRNA-Expression von NET-7, Porcupine und SMURF2 mit der mRNA-Expression von S100P in humanen Bronchialkarzinom- Geweben.....	77
3.4.7. Regulation der mRNA-Expression von S100P und Porcupine.....	78

3.4.8. Einfluss der Expression von Porcupine und S100P auf die Expression von β -Catenin	80
4. Diskussion	82
4.1. Die Expression der S100-Proteine im Bronchialkarzinom	82
4.1.1. Die mRNA-Expression von S100P und potentieller Interaktionspartner in Geweben und Zellen des bronchialen Adenokarzinoms	82
4.1.2. Die Regulierung der mRNA-Expression von S100P	86
4.1.3. Die veränderte Expression von S100P und weiterer S100-Proteine unter dem Einfluss der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien.....	87
4.1.4. Der Einfluss von MAP Kinasen auf die mRNA-Expression von S100P	89
4.1.5. S100P beeinflusst die Sensitivität von H358-Zellen gegenüber zytotoxischer Agenzien	91
4.1.6. Die Phagozytose apoptotischer Zellen wird durch S100P kaum beeinflusst..	92
4.2. Einfluss der S100P-Überexpression auf die Malignität der humanen Bronchialkarzinom-Zelllinie H358	93
4.2.1. Der Einfluss von S100P auf die Migration von Zellen ist abhängig vom Zelltyp	94
4.2.2. Die Aktivität von MMPs korreliert mit der Tumorzell-Migration.....	96
4.2.3. S100P fördert die Tumorbildung, aber inhibiert das weitere Tumorstadium.....	97
4.3. Identifizierung putativer intrazellulärer Wechselwirkungen von S100P	99
5. Zusammenfassung und Ausblick	104
6. Literaturverzeichnis	106

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding-cassette</i> (Bestandteil von Efflux-Pumpen)
AdKa	Adenokarzinom
AGE	<i>Advanced Glycation Endproduct</i> (Glykierungsendprodukte)
Anti	Antikörper
APC	Allophycocyanin (Fluoreszenz-Farbstoff)
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest	bidestilliertes Wasser
AT I	Alveolarepithelzellen Typ I
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AzDe	5-Aza-2'-deoxy-Cytidin
Bax	Bcl-2 assoziiertes Protein X (proapoptotisches Protein)
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure zur Proteinbestimmung)
Bcl	<i>B cell lymphoma</i> (antiapoptotisches Protein)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CacyBP/SIP	Calcyclin-bindendes Protein/Siah-1-interagierendes Protein
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propan-sulfonsäure
CDH1	Synonym für E-Cadherin
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFSE	5(6)-Carboxy-fluorescein-diacetat-succinimidylester
CREB	<i>cAMP response element (CRE)-Binding Protein</i> (Transkriptionsfaktor)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Δ cyto	zytoplasmatisch deletiert
DFMO	DL- α -Difluor-methylornithin
DLC-1	<i>deleted in liver cancer-1</i> (Tumorsuppressorgen)
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DOC	Natriumdesoxycholat
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	DL-Dithiothreitol
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Hand	Helix-Turn-Helix-Motiv in Proteinen
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (Wachstumsfaktor)

EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> (Grün-fluoreszierendes Protein)
EGFR	EGF-Rezeptor
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-Aminoethyl)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
ERK	<i>Extracellular Signal Regulated Kinase</i>
<i>et al.</i>	und andere
evtl.	eventuell
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	Fetales Kälberserum
G418	Geneticin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
GM-CSF	Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMGB	<i>High Mobility Group Box</i>
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
ICAM-1	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule-1</i>
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LB	Luria Broth
Mac-1	Makrophagen-Antigen-1 (β 2-Integrin)
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MDR	<i>Multi Drug Resistance</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
Mio	Million
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
MYC	abgeleitet vom viralen Myelocytomatose-Onkogen (Transkriptionsfaktor)
n	Anzahl der Versuche
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor</i> κ B (Transkriptionsfaktor)
NP	Nukleus Puffer
NSCLC	<i>Non-Small-Cell-Lung Carcinoma</i> (Nicht-Kleinzelliges Bronchialkarzinom)
OD	Optische Dichte
P-	Phospho-
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PD	Populationsverdopplung
PEK α	Plattenepithelkarzinom
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PI	Propidiumiodid

PS	Penicillin-Streptomycin
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation End-products</i> (Zelloberflächenrezeptor)
Ras	<i>Rat sarcoma</i> (kleine GTPase)
RB	Retinoblastom
rel.	relativ
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RPMI	Zellkulturmedium am <i>Roswell Park Memorial Institute</i> entwickelt
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
S100PBPR	S100P-Bindeprotein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
siRNA	<i>small interfering</i> Ribonukleinsäure
<i>SNP</i>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAM	Tumor-Assoziierte-Makrophagen
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Temp.	Temperatur
TGF	<i>transforming growth factor</i> (Wachstumsfaktor)
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> (Zytokin)
TNM	<i>Tumor Nodus Metastasis</i> (Stadieneinteilung maligner Tumore)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSG	Tumorsuppressorgen
ÜE	Überexpression
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Wachstumsfaktor)
vs.	<i>versus</i> (im Vergleich zu)
w/v	Masse pro Volumen
WHO	<i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)
Wnt	zusammengesetzt aus <i>Wingless</i> und <i>Int-1</i> (Signalprotein)
X-Gal	5-Chloro-4-bromo-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
z. B.	zum Beispiel
ZMG	Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung

1. Einleitung

1.1. Tumorbiologie

In gesundem Gewebe wird die Zellvermehrung (Proliferation), die Differenzierung sowie das Absterben der Zellen (Apoptose) durch verschiedene molekulare Mechanismen streng reguliert. Die Zellen stehen durch die Freisetzung von Signalmolekülen und deren Erkennung durch entsprechende Rezeptoren unter einer gegenseitigen Kontrolle. Aufgrund von vielfältigen Veränderungen auf chromosomaler und/oder genetischer Ebene werden diese Regulationsmechanismen während der Tumorentstehung (Tumorigenese) umgangen.

In dem älteren Dreistufenmodell der Tumorigenese wird vornehmlich deren chronologische Abfolge beschrieben. Diese besteht aus der Tumorinitiation, die die initiale Mutation der DNA beschreibt (Transformation der Zelle), der Tumorpromotion, bei der die Proliferation der veränderten Zellen begünstigt wird, und der Tumorprogression, welche die Umwandlung von gutartigen (benignen) Tumoren zu bösartigen (malignen) Tumoren darstellt. Durch dieses Modell werden die komplexen Ursachen der Tumorigenese jedoch nicht ausreichend wiedergegeben. Man geht heute von einem Mehrstufenmodell der Tumorentstehung aus, wobei mehrere, voneinander unabhängige Mutationen im Genom zu dem malignen Phänotyp der Zellen führen. Zur Malignität der Tumore tragen nach Hanahan und Weinberg in ihrer Gesamtheit sechs essentielle Veränderungen in der Biologie der Zellen bei [Hanahan & Weinberg, 2000]. Diese sind:

1. die Unabhängigkeit von Wachstumssignalen
2. die Unempfindlichkeit gegenüber Wachstum-Inhibitor-Signalen
3. die Umgehung des programmierten Zelltodes (Apoptose)
4. eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit
5. eine fortwährende Gefäßbildung (Angiogenese)
6. die Invasion in umliegendes Gewebe sowie die Metastasierung in entfernte Organe

Die Klassifizierung der Tumore erfolgt abhängig vom Typ des entarteten Gewebes. Die Mehrheit aller bösartigen Tumore geht aus dem Epithel hervor und wird als Karzinom bezeichnet. Die Karzinome können nochmals in Plattenepithelkarzinome (von Schleimhautzellen abstammend) und in Adenokarzinome (von Drüsenepithelzellen abstammend) unterteilt werden. Eine weitere Gruppe bilden die hämatologischen Tumore, die sich in Leukämien (aus Blutstammzellen hervorgehend) und Lymphome (aus differenzierten Blutzellen hervorgehend) unterteilen. Zu den selteneren Tumorerkrankungen gehören die Sarkome, die sich durch die Entartung von Stütz- und Bindegewebszellen entwickeln, und die neurogenen Tumore, die von Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems abstammen [Rosai & Ackerman, 1979].

1.1.1. Intrazelluläre Veränderungen bei der Tumorentwicklung

Die Entstehung einer Tumorerkrankung hat sowohl genetische als auch epigenetische Ursachen, die zur Aktivierung so genannter Proto-Onkogene und zum Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (TSGs) führen und somit zur Transformation von Zellen beitragen. Proto-Onkogene regulieren in normalen Zellen das Zellwachstum, die Zellteilung und die Differenzierung von Zellen. Sie kodieren unter anderem Proteine aus der Familie der Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (z. B. EGF-Rezeptor), G-Proteine (z. B. Ras) und Transkriptionsfaktoren (z. B. STAT, MYC). Durch Mutation oder eine deregulierte Expression entstehen daraus Onkogene, die das ungebremste Tumorwachstum fördern. Tumorsuppressorgene kodieren Proteine, die unter anderem den Zellzyklus regulieren (z. B. Retinoblastom, p16) und die Apoptose induzieren (z. B. p53). Im Gegensatz zu den Onkogenen werden sie während der Tumorigenese inaktiviert, was ebenfalls in einem unkontrollierten Tumorwachstum resultiert. Die veränderte Expression dieser Proteine kann zum einen auf Mutationen, chromosomaler Instabilität, Chromosomenbrüchen und Chromosomenumlagerungen (genetische Ursachen), als auch auf veränderter DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung (epigenetische Ursachen) beruhen [Bertram, 2000; Liu, 2008].

Zu den Onkogenen gehört der in Bronchialkarzinomen häufig mutierte oder überexprimierte EGF-Rezeptor (EGFR) [Sato *et al.*, 2007]. Der EGF-Rezeptor ist ein Transmembranrezeptor, welcher extrazelluläre Signale durch eine intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Aktivität weiterleitet. Zu den Liganden des EGF-Rezeptors gehören der *epidermal growth factor* (EGF) und der *transforming growth factor alpha* (TGF α). In normalen Geweben sind die Zellen von den Signalen dieser externen Wachstumsfaktoren abhängig, um zu proliferieren. In Tumorzellen hingegen resultiert die veränderte Expression des EGF-Rezeptors in einer Hypersensitivität gegenüber den Wachstumsfaktoren oder, bei einer strukturell veränderten zytoplasmatischen Domäne, in einer konstitutiven Signalübermittlung, unabhängig von extrazellulären Liganden [Hanahan & Weinberg, 2000].

Zu den Onkogenen, die auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren in die Signalübertragung eingreifen, gehören die Gene der STAT- und der MYC-Familie [Sato *et al.*, 2007]. Nach der Aktivierung durch Tyrosin-Phosphorylierung gelangen die STATs in den Zellkern und regulieren die Expression von Zielgenen (z. B. Cyclin D1, Bcl-xL) [Song *et al.*, 2003], deren Expression zur Aktivierung des Zellzyklus führt oder den Prozess des programmierten Zelltodes verhindert [Darnell, 1997; Song *et al.*, 2003]. Zur *myc*-Genfamilie gehören *c-myc*, *n-myc* und *l-myc*, welche in verschiedenen Tumorerkrankungen erhöht exprimiert werden. Sie tragen durch die Transkription spezifischer Zielgene zur Zellproliferation, zum Zellwachstum, zur Vaskularisierung, zur Metastasierung und zur Inhibierung der Differenzierung bei [Adhikary & Eilers, 2005].

Im Gegensatz zu den Onkogenen werden Tumorsuppressorgene (TSGs) im Laufe der Tumorentwicklung durch Deletion oder Mutation inaktiviert. In mehr als 50% aller

Tumorerkrankungen wurden Mutationen in *p53* gefunden [Hanahan & Weinberg, 2000; Vousden, 2002; Vousden & Lane, 2007]. Dieses Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, dessen Induktion zum Zellzyklus-Arrest, zur DNA-Reparatur, zur Differenzierung der Zelle oder zur Induktion der Apoptose führt [Vousden & Lu, 2002]. Durch Mutationen von *p53*, welche meist in der DNA-Binde-Domäne des Proteins auftreten, kann die Tumorzelle dem programmierten Zelltod entkommen [Hanahan & Weinberg, 2000; Vousden & Lane, 2007].

Ein weiterer Tumorsuppressor ist p16/INK4a, welcher in normalen Zellen die Zellzyklus-Progression inhibiert. In vielen Tumorerkrankungen, wie z. B. dem Bronchialkarzinom, dem Brustkarzinom oder dem Oralkarzinom, ist *p16/INK4a* jedoch inaktiviert [Brenner *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2007]. Die Inaktivierung von *p16/INK4a* in der Tumorigenese erfolgt durch die Methylierung von Promotor-CpG-Inseln [Risch & Plass, 2008]. Genomische Bereiche mit einem erhöhten Gehalt an CpG-Dinukleotiden kommen in der Mehrheit humaner Promotorregionen vor und nehmen eine wichtige Rolle in der epigenetischen Genregulation ein.

Humane Tumorzellen sind im Allgemeinen durch eine Veränderung im Methylierungsstatus der DNA gekennzeichnet. Zum einen betrifft dies die Hypomethylierung der Gesamt-DNA, woraus eine chromosomale Instabilität resultiert [Kanai, 2008]. Zum Anderen kommt es zur punktuellen Hypermethylierung bestimmter DNA-Abschnitte, welche zur Inaktivierung der betroffenen Gene führt [Kanai, 2008]. Von der Hypermethylierung sind oftmals CpG-Inseln in den Promotorbereichen der Gene betroffen. Dies fördert eine hochkondensierte Heterochromatinstruktur und führt zu einer direkten Inhibierung der Transkription. Die Methylierung der Promotorregionen begünstigt dabei die Deacetylierung der Histone durch die Histon-Deacetylase (HDAC), wodurch die DNA in Nukleosomen verpackt wird und transkriptionell inaktiv ist [Jones & Baylin, 2002; Liu, 2008]. Sowohl die Methylierung als auch die Histon-Deacetylierung sind epigenetische Veränderungen, die schon früh in der Tumorentwicklung auftreten [Jones & Baylin, 2002; Mahlknecht & Hoelzer, 2000]. Durch die Methylierung der DNA können zusätzlich, durch die Deaminierung des gebildeten 5-Methylcytosin zu Thymin, Punktmutationen in den betroffenen Genen auftreten, welche ebenfalls zur Tumorigenese beitragen [Jones & Baylin, 2002; Kanai, 2008].

1.1.2. Extrazelluläre Veränderungen bei der Tumorentwicklung

Neben den intrazellulären Faktoren spielt auch das umgebende Tumormilieu eine entscheidende Rolle bei der Tumorentwicklung. Dieses setzt sich aus strukturellen (extrazelluläre Matrix), löslichen (Zytokine, Proteasen, Hormone u. a.) sowie aus zellulären Komponenten (Endothelzellen, Fibroblasten und Zellen des Immunsystems u. a.) zusammen [Zhong *et al.*, 2008] (Abb. 1). Basierend auf Zell-Zell-Kontakten werden von den unterschiedlichen Zellen Wachstumssignale freigesetzt, die die Tumorphiliferation fördern [Hanahan & Weinberg, 2000]. In diesem heterogenen Komplex an Zellen stellen die Makrophagen die am häufigsten auftretende Immunzell-Population dar. Die Monozyten

werden von Chemokinen und Wachstumsfaktoren angelockt, die durch Tumorzellen freigesetzt werden, und differenzieren in der Tumorumgebung zu so genannten Tumor-Assoziierten-Makrophagen (TAM). Diese wiederum tragen durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren (EGF), Zytokinen (IL-6, TNF- α) und Chemokinen (IL-8) zur Tumorprogression bei [Allavena *et al.*, 2008; Pollard, 2004]. Des Weiteren verhindern sie durch die Produktion und Freisetzung immunsuppressiver Zytokine (IL-10) die Erkennung und Beseitigung von Tumorzellen durch andere Immunzellen (z. B. tumorspezifische T-Zellen) [Sica & Bronte, 2007]. Darüber hinaus unterstützen sie die Bildung von Blutgefäßen (Angiogenese) durch die zusätzliche Produktion von pro-angiogenetischen Faktoren (z. B. VEGF) [Allavena *et al.*, 2008].

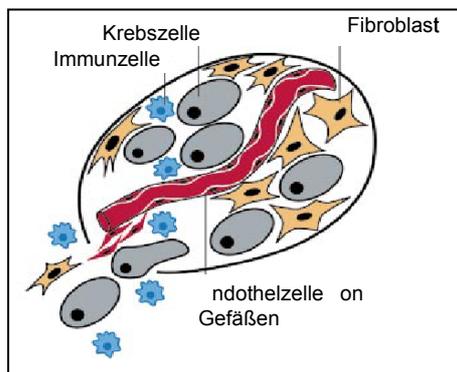


Abb. 1: Tumore als komplexer Zellverband (modifiziert nach Hanhan *et al.*, 2000)

Zu dem Tumorverband gehören neben den genetisch veränderten Tumorzellen auch Endothelzellen, Fibroblasten und Immunzellen. Diese tragen in ihrer Gesamtheit zum Wachstum und zur Metastasierung des Tumors bei.

Die Angiogenese ist ein wichtiger Prozess in der Tumorentwicklung, um die Versorgung größerer Zellverbände mit Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten. Da in gesundem Gewebe die Neubildung von Blutgefäßen streng reguliert ist, müssen Tumore die Fähigkeit zur Initiierung der Angiogenese besitzen [Hanahan & Weinberg, 2000]. Einer der wichtigsten pro-angiogenetischen Faktoren ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [Yano *et al.*, 2006]. Dieser wird sowohl von den Tumorzellen selbst, als auch von den TAMs freigesetzt [Allavena *et al.*, 2008; Hanahan & Weinberg, 2000] und löst in Endothelzellen nach der Bindung an VEGF-Rezeptoren eine Signalkaskade aus, die zur Bildung von neuem Endothel führen [Yano *et al.*, 2006].

VEGF trägt des Weiteren zur Metastasierung von Tumorzellen bei [Yano *et al.*, 2006]. Im Maustier-Modell konnte gezeigt werden, dass die Expression von VEGF mit der Bildung von Hirn-Metastasen korrelierte [Yano *et al.*, 2000]. Die Metastasierung gehört zum Krankheitsbild maligner Tumore und ist zu 90 % Grund für das Sterben von Tumorpatienten [Nguyen & Massague, 2007]. Die Metastasierung von Tumorzellen setzt die Invasion in benachbartes Gewebe und die anschließende Migration in das lymphatische System und die Blutgefäße sowie die darauf folgende Ansiedlung der Tumorzellen in den Lymphknoten oder anderen Organen voraus [Simon *et al.*, 2001]. Primäre Tumore sind heterogen und nur eine geringe Zahl von Tumorzellen besitzt die Fähigkeit zur Invasion [Wang *et al.*, 2005b]. Während der Invasion verlieren die Karzinomzellen ihre epithelialen Eigenschaften. Dieser Vorgang wird als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet. Die EMT wird

unter anderem durch extrazelluläre Signalmoleküle (z. B. TNF α und TGF β) stimuliert und ist vor allem durch den Verlust von E-Cadherin gekennzeichnet [De Wever *et al.*, 2008; Schmalhofer *et al.*, 2009]. E-Cadherin ist in der Plasmamembran lokalisiert und vermittelt die Zell-Zell-Interaktion von Epithelzellen. Es wird durch das *cdh1*-Gen kodiert, welches in invasiven und migrierenden Zellen mutiert oder durch die Hypermethylierung des Promoters bzw. durch transkriptionelle Reprimierung inaktiv ist [Schmalhofer *et al.*, 2009]. Der Verlust von E-Cadherin führt zum Verlust der epithelialen Differenzierung und zu einem mesenchymalen Phänotyp der Zellen. Es ist somit eine wichtige Voraussetzung für das invasive Wachstum und die Migration von Karzinomzellen. Darüber hinaus verbinden in normalen Epithelzellen α - und β -Catenine E-Cadherin mit dem Aktin-Zytoskelett. Durch den Verlust von E-Cadherin lokalisiert β -Catenin in den Zellkern und aktiviert als Transkriptionsfaktor unter anderem Gene, die zur Proliferation beitragen (z. B. *cyclin D1*, *c-myc*) [Schmalhofer *et al.*, 2009]. Des Weiteren werden während der EMT verstärkt Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) exprimiert [De Wever *et al.*, 2008]. Die MMPs, welche auch von den Stroma- und Immunzellen freigesetzt werden, gehören zu den Enzymen, die die extrazelluläre Matrix degradieren und damit zur Invasion der Tumorzellen beitragen [Hanahan & Weinberg, 2000]. Die MMPs werden nach ihrer Substratabhängigkeit (z. B. Collagenasen, Gelatinasen, Stromelysine) unterschieden und fördern sowohl die Angiogenese als auch die Einwanderung von Tumorzellen in die Blutgefäße [Yano *et al.*, 2003].

1.1.3. Die Behandlung von Tumorerkrankungen

Abhängig vom Tumortyp und dem Stadium zum Zeitpunkt der Diagnose werden Tumorerkrankungen durch einen chirurgischen Eingriff und/oder mit Hilfe von Strahlentherapie (physikalisch) und Chemotherapie (chemisch) behandelt. Durch die physikalischen und chemischen Reize wird der Zelltod vor allem in sich schnell teilenden Zellen induziert. Auf diese Form der Therapie sollten im Besonderen Tumorzellen ansprechen, da diese Zellen durch eine erhöhte Zellteilungsrate gekennzeichnet sind.

Die Chemotherapie und die Bestrahlung wirken sowohl über die Induzierung des Apoptose-Signalweges in den Zellen als auch über die Nekrose von Zellen und Geweben. Der unterschiedliche Verlauf von Nekrose und Apoptose ist in Abb. 2 dargestellt. Bei der Nekrose kommt es durch den Verlust der Membran-Integrität und des osmotischen Gleichgewichts zu einem passiven Einstrom von Wasser und extrazellulären Ionen, wodurch intrazelluläre Organellen (v. a. Mitochondrien) und die gesamte Zelle anschwellen. Infolge dessen wird die Zellmembran permeabel, der zytoplasmatische Zellinhalt wird freigesetzt und eine Entzündungsreaktion wird ausgelöst [Van Cruchten & Van Den Broeck, 2002].

Die Apoptose ist ein physiologischer Prozess, der in gesunden Geweben zur Zell-Homöostase beiträgt. Durch extra- oder intrazelluläre Stresssignale kommt es zur Aktivierung von Caspasen. Die Caspasen sind proteolytische Enzyme, die durch verschiedene Zellstress-auslösende Stimuli (z. B. Strahlung oder Chemotherapie) enzymatisch aktiviert werden und

zur Induktion des apoptotischen Zelltodes führen [Cryns & Yuan, 1998]. Bei der Apoptose wird ein Prozess eingeleitet, der durch die Verdichtung des Chromatins, die Kondensation und die Fragmentierung von Zytoplasma und Zellkern in membranumschlossene Vesikel gekennzeichnet ist. Diese DNA-haltigen Apoptotischen Körperchen werden *in vivo* von Makrophagen und umgebenden Epithelzellen phagozytiert. Die Erkennung durch die Makrophagen erfolgt über Phosphatidylserine (PS), die sich zu Beginn der Apoptose durch Veränderungen in der Zellmembran von der Innenseite der Zellmembran an die Zelloberfläche umlagern [Fadok *et al.*, 2001]. Durch die intakte Plasmamembran sowie das schnelle Erkennen und Entfernen von apoptotisch sterbenden Zellen wird keine Entzündungsreaktion ausgelöst [Van Cruchten & Van Den Broeck, 2002]. Findet keine Phagozytose der Apoptotischen Körperchen statt, kommt es auch hier letztendlich zur Permeabilisierung der Zellmembran (d. h. zur Spät-Apoptose/Nekrose).

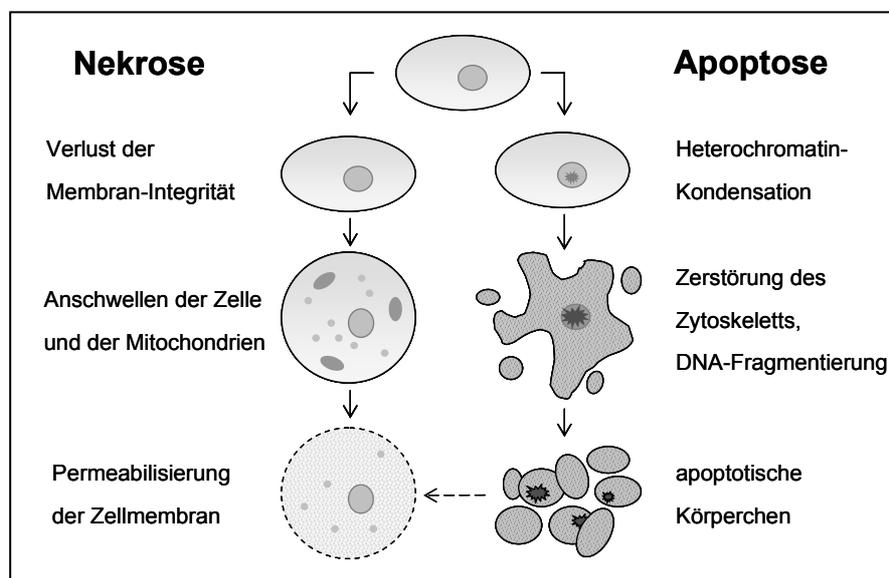


Abb. 2: Verlauf der Nekrose und Apoptose von Zellen

Im Folgenden wird im Besonderen auf die Behandlung von Tumorerkrankungen mit Chemotherapeutika eingegangen. Unter dem Begriff der Chemotherapie ist eine medikamentöse Behandlung von Tumoren auf der Basis von Zytostatika zu verstehen. Es gibt verschiedene Arten von Chemotherapeutika, die an verschiedenen Punkten in die Proliferation der Zellen eingreifen. Zu den in der Klinik verwendeten Chemotherapeutika gehören unter anderem die Taxane (z. B. Paclitaxel), Platin-Verbindungen (z. B. Cisplatin) und Topoisomerase-Hemmer (z. B. Etoposid). Taxane verhindern die Zellreplikation, indem sie den Zusammenbau der Mikrotubuli fördern, diese stabilisieren und vor der Degradation schützen. Damit wird die Mitose blockiert und die Apoptose induziert [Jordan & Wilson, 2004]. Platin-Verbindungen hingegen greifen primär auf DNA-Ebene in den Zellzyklus ein. Sie binden an die DNA und formen Komplexe, die in Folge die DNA-Synthese stören und die Transkription unterdrücken. Aufgrund dessen wird der Zellzyklus inhibiert und die Apoptose

eingeleitet [Siddik, 2003]. Chemotherapeutika, wie z. B. Etoposid, inhibieren die Topoisomerase II und verhindern damit die Reparatur von Einzelstrangbrüchen auf DNA-Ebene. Die Behandlung mit diesem Chemotherapeutikum führt ebenfalls zur Induktion der Apoptose [Brantley-Finley *et al.*, 2003].

Weitere zytostatische Agenzien, die momentan nur auf experimenteller Ebene eingesetzt werden, agieren auf Proteinebene und bieten neue Ansatzpunkte in der Weiterentwicklung der Krebstherapie. Ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase 1 (CDK1), CGP 74514A, greift in den Ablauf des Zellzyklus ein. CGP 74514A verhindert durch die Inhibierung der CDK1 den Übergang der Zelle in die Mitose-Phase und trägt zusätzlich zur Zerstörung der Mitochondrien, der Aktivierung von Caspasen und letztendlich zur Induktion der Apoptose in Leukämiezellen bei [Dai *et al.*, 2002]. Auch der Proteasom-Inhibitor MG-132 induziert den apoptotischen Zelltod. Durch MG-132 wird die Degradation intrazellulärer Proteine inhibiert, die unter anderem in der Regulation der Apoptose eine wichtige Rolle spielen. Zu den durch MG-132 stabilisierten pro-apoptotischen Proteinen gehört z. B. Smac, welches zur Aktivierung der Caspasen beiträgt [Yuan *et al.*, 2008]. Die Apoptose kann somit durch MG-132 direkt induziert werden, oder die Tumorzellen werden infolge der Behandlung für klassische Chemotherapeutika sensibilisiert [Giuliano *et al.*, 2003].

Trotz andauernder Fortschritte in der Erkennung und Behandlung von Tumorerkrankungen, sind die meisten Tumorerkrankungen immer noch schwer durch Operationen, Chemotherapie und/oder Strahlentherapie heilbar. Dies gilt besonders für Tumore in fortgeschrittenen und metastasierenden Stadien. Bei soliden Tumoren kann eine schlechte Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen zu einem eingeschränkten Transport der Chemotherapeutika zu den Tumorzellen führen und somit zur Chemotherapieresistenz beitragen [Krishna & Mayer, 2000]. Darüber hinaus sind die Tumorzellen genetisch so verändert, dass sie den programmierten Zelltod (Apoptose) umgehen [Hanahan & Weinberg, 2000]. So können z. B. Mutationen im *p53*-Gen den Ablauf der Apoptose stören, aber auch der Verlust von pro-apoptotischen Signalmolekülen, wie Bax, kann zum einen zur Anreicherung von neoplastischen Zellen im Gewebeverband führen und zum anderen zur Chemotherapie-Resistenz beitragen [Igney & Krammer, 2002]. Ein weiterer Mechanismus der *Multi-Drug-Resistance* (MDR) von Tumorzellen ist die erhöhte Aktivität von Transportern, z. B. der ABC (ATP-binding-cassette)-Familie. Diese Efflux-Pumpen sind meist in der Zytoplasmamembran lokalisiert und führen zu einer stark verminderten intrazellulären Konzentration der Chemotherapeutika [Lage, 2008]. Eine Interaktion der Chemotherapeutika mit ihren Zielmolekülen in der Zelle ist somit nicht mehr möglich. Zur Chemotherapie-Resistenz tragen viele verschiedene Mechanismen bei. Aus diesem Grund ist man auch weiterhin auf der Suche nach Tumormarkern, die eine möglichst spezifische Therapie der Tumorerkrankung ermöglichen.

1.2. Das Bronchialkarzinom

1.2.1. Ursachen und Subtypen des Bronchialkarzinoms

Laut der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) ist das Bronchialkarzinom in Deutschland, mit 33 000 Neuerkrankungen pro Jahr, die dritthäufigste Krebserkrankung insgesamt. Aufgrund der schweren Früherkennung und der Aggressivität des Bronchialkarzinoms liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei durchschnittlich nur 15 % [Batzler, 2008].

Der Hauptrisikofaktor, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken, ist das aktive Rauchen. 90 % der am Bronchialkarzinom erkrankten Männer und 60 % der am Bronchialkarzinom erkrankten Frauen sind oder waren Raucher [Batzler, 2008]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 68 Jahren und ist zum einen auf die Dauer des Einwirkens schädlicher Substanzen und zum anderen auf im Alter fehlerhafter werdende Reparaturmechanismen in den Zellen zurückzuführen [Batzler, 2008]. Aufgrund der Schadstoffe, die im Nebenstromrauch enthalten sind, ist auch bei Passivrauchern das Risiko, am Bronchialkarzinom zu erkranken, erhöht [Molina *et al.*, 2008]. Des Weiteren können Umweltfaktoren, die Ernährung und die genetische Prädisposition die Entstehung eines Bronchialkarzinoms beeinflussen. Eine hohe Schadstoffbelastung der Außenluft kann das Lungenkrebsrisiko genauso wie die Exposition gegenüber Asbest, Radon und anderen kanzerogenen Stoffen erhöhen [Molina *et al.*, 2008].

Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit Bronchialkarzinom ist neben dem Stadium, in dem die Erkrankung erkannt wird, auch vom histologischen Tumortyp abhängig (Abb. 3) [Wiethage *et al.*, 2000]. Die Bronchialkarzinom-Zellen stammen von genetisch veränderten Epithelzellen der Lunge ab. Aus therapeutischer Sicht werden zwei Hauptgruppen von Bronchialkarzinomen unterschieden, das Kleinzellige Bronchialkarzinom und das Nicht-Kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) [Schiller, 2001]. Die am häufigsten auftretenden Formen sind mit 70 % bis 75 % die Plattenepithelkarzinome und die Adenokarzinome, die zur Gruppe des NSCLC gehören. Die Plattenepithelkarzinome stammen von Schleimhautdeckzellen ab, wohingegen die Adenokarzinome durch maligne Veränderungen drüsenartiger Epithelzellen entstehen und in ihrer Histologie sehr variabel sind. Zu der Gruppe des NSCLC gehören des Weiteren das Großzellige Lungenkarzinom (10 %), Carcinoide (2-3 %) und andere. Die Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinome sind meist lokal begrenzt und bilden seltener Metastasen, sprechen jedoch weniger empfindlich auf eine Behandlung mit Chemotherapeutika an [Schiller, 2001]. Im Gegensatz dazu wachsen Kleinzellige Bronchialkarzinome wesentlich schneller und metastasieren schnell in entfernte Organe [Schiller, 2001]. Die in dieser Arbeit untersuchten Zellen und Gewebe stammen vom bronchialen Adenokarzinom ab.

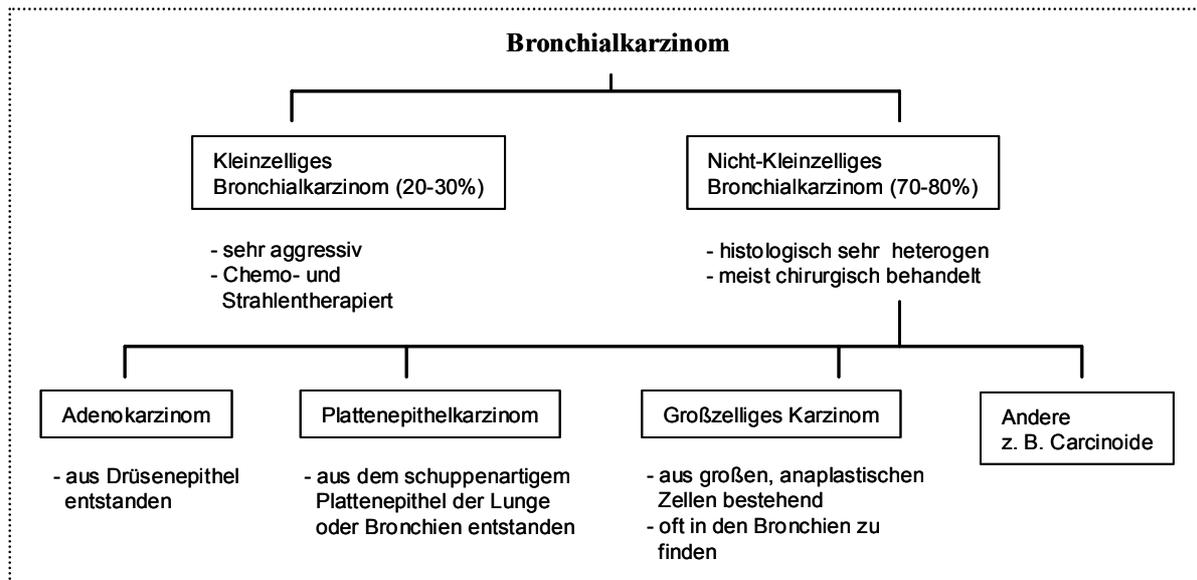


Abb. 3: Histologische Einteilung des Bronchialkarzinoms nach therapeutischen Gesichtspunkten

Die Bestimmung des Tumortyps erfolgt nach der Entnahme einer Lungenbiopsie. Diese Gewebeprobe wird makroskopisch und mikroskopisch untersucht. Neben dem Tumortyp wird auch der sogenannte Differenzierungsgrad (G1 bis G4) der Tumore bestimmt. Bei einem hohem Differenzierungsgrad (G1) sind die Tumore ihrem Ursprungsgewebe noch sehr ähnlich und sie wachsen langsam und wenig aggressiv [Chung *et al.*, 1982]. Undifferenzierte Tumorzellen (G4) hingegen sind kaum noch als bronchiale Epithelzelle zu erkennen. Sie wachsen schneller und bilden schneller Metastasen [Chung *et al.*, 1982].

Des Weiteren werden Bronchialkarzinome nach dem TNM-System der WHO (*World Health Organisation*) eingeteilt [Watanabe, 2003]. Im T-Stadium wird die Tumorgroße erfasst, im N-Stadium wird der Lymphknotenbefall beurteilt und das M-Stadium richtet sich nach dem Auftreten von Fernmetastasen. In Abhängigkeit vom Tumortyp, vom Differenzierungsgrad und vom TNM-Stadium wird über die Behandlung des Bronchialkarzinoms entschieden [Wiethage *et al.*, 2000]. Bronchialkarzinome werden sowohl durch chirurgische Eingriffe als auch durch Bestrahlung und/oder Chemotherapie behandelt. Die Kleinzelligen Bronchialkarzinome sprechen aufgrund ihrer hohen Proliferationsrate sehr gut auf die Chemotherapie-Behandlung an. Im Gegensatz dazu wird das am häufigsten auftretende NSCLC aufgrund seiner hohen Chemotherapie-Resistenz meist chirurgisch behandelt [Schiller, 2001]. Die Resistenz gegenüber der Chemotherapie-Behandlung basiert bei dem NSCLC auf der verminderten Proliferation der Tumorzellen, aber auch auf genetischen Veränderungen, die in einem gestörten Apoptoseweg resultieren [Joseph *et al.*, 2001].

1.2.2. Die veränderte Genexpression im NSCLC - der RAGE-Rezeptor

Die Anhäufung multipler Veränderungen auf genetischer und epigenetischer Ebene führt auch beim NSCLC zu Wachstumsvorteilen und Überlebensvorteilen der malignen Zellen. Zu diesen Veränderungen gehören der Verlust von Tumorsuppressorgenen (z. B. *p53*), die Aktivierung von Onkogenen (z. B. *EGFR*, *ras*), die daraus resultierende Deregulation der Apoptose und die Förderung der Angiogenese und der Metastasierung [Breuer *et al.*, 2005; Risch & Plass, 2008; Sato *et al.*, 2007].

Die Transformation des Epithelgewebes zum Tumorgewebe ist im NSCLC mit der verminderten Expression des RAGE-Rezeptors (*receptor for advanced glycation endproducts*) verbunden [Bartling *et al.*, 2005]. Im Gegensatz zu anderen Geweben ist RAGE in normalem Lungengewebe sehr hoch exprimiert [Brett *et al.*, 1993]. RAGE ist ein transmembraner Rezeptor der Immunglobulin-Superfamilie. Wie in Abb. 4 gezeigt, besitzt er eine extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Region, bestehend aus einer V-Typ-Domäne und zwei C-Typ-Domänen, einer transmembranen Domäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne. Die V-Typ-Domäne bindet die Liganden, während der intrazelluläre Teil die Weiterleitung intrazellulärer Signale vermittelt [Logsdon *et al.*, 2007; Neeper *et al.*, 1992]. In Abhängigkeit der Liganden werden intrazellulär unterschiedliche Signalwege, wie z. B. $p21^{ras}$, MAP-Kinasen und NF κ B, aktiviert [Bierhaus *et al.*, 2005], die Entzündungsreaktionen fördern und die Proliferation und Migration der Zellen stimulieren [Logsdon *et al.*, 2007; Morbini *et al.*, 2006]. Von RAGE sind verschiedene Splice-Varianten bekannt. Eine RAGE-Isoform ist das lösliche RAGE, dem die transmembrane und die zytoplasmatische Domäne fehlen. Das lösliche RAGE wird von den Zellen sekretiert und kann im extrazellulären Raum die Liganden binden [Logsdon *et al.*, 2007]. Darüber hinaus gibt es künstlich hergestellte RAGE-Varianten (z. B. Δ cytoRAGE), die der Untersuchung der Funktion einzelner Domänen (z. B. der intrazellulären Domäne) von RAGE dienen (Abb. 4).

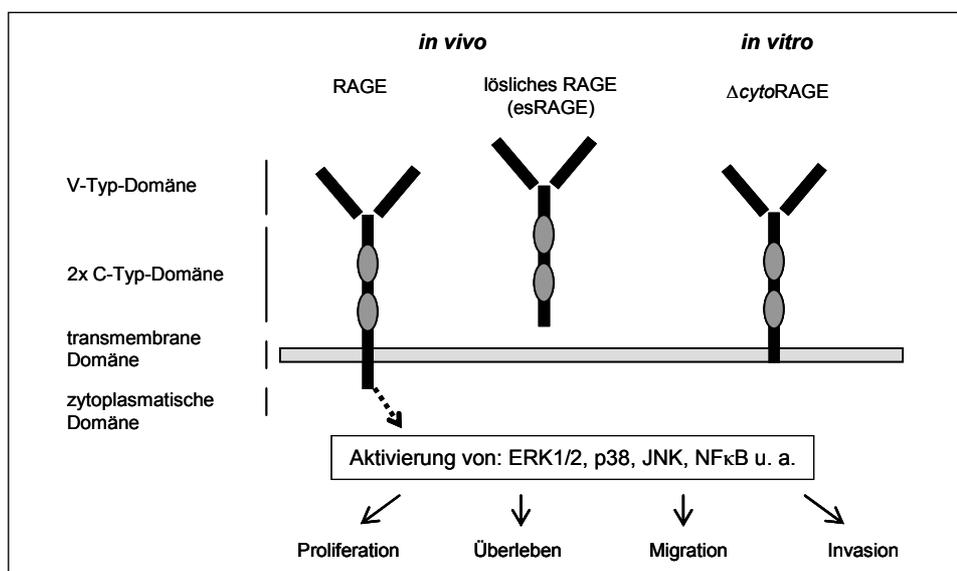


Abb. 4: Die molekulare Struktur des RAGE-Rezeptors und seine Splice-Varianten (nach Logsdon *et al.*)

RAGE wird auf Endothelzellen und auf verschiedenen Immunzellen, wie z. B. Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten, exprimiert. Durch die Ligand-RAGE-Interaktion kommt es zur Aktivierung der an der Immunantwort beteiligten Zellen. Die Endothelzellen setzen Adhensionsmoleküle und VEGF frei, die Chemotaxis von Makrophagen wird induziert und die Proliferation von Lymphozyten wird stimuliert [Clynes *et al.*, 2007; Stern *et al.*, 2002]. Durch die RAGE-Aktivierung und der daraus resultierenden Immunantwort wird ein inflammatorisches Milieu geschaffen, welches die Tumorentwicklung fördert [Gebhardt *et al.*, 2008]. Eine sehr hohe Expression von RAGE wurde außerdem in Alveolarepithelzellen Typ I (AT I) gefunden. Man nimmt an, dass RAGE in gesundem Bronchialgewebe zur Differenzierung und zur Polarität der AT I-Zellen und somit zur Organisation des Alveolarepithels beiträgt [Bartling *et al.*, 2005; Demling *et al.*, 2006].

In einer Vielzahl von Tumorerkrankungen wurde im Vergleich zum normalen Gewebe eine erhöhte Expression des RAGE-Rezeptors im Tumorgewebe nachgewiesen, die mit einer erhöhten Proliferation und Metastasierung der Tumorzellen korrelierte [Huttunen *et al.*, 2002; Taguchi *et al.*, 2000]. Im Gegensatz dazu ist die Expression von RAGE im Bronchialkarzinom im Vergleich zu normalen Lungengewebe vermindert. Man geht davon aus, dass die verringerte Expression von RAGE im NSCLC zum Verlust der epithelialen Gewebestruktur führt und das tumorigene Wachstum fördert [Bartling *et al.*, 2005].

Der Multiligandenrezeptor RAGE bindet eine Vielzahl von Liganden, zu denen unter anderem AGEs (*advanced glycation end products*), Amphoterin (HMGB-1) und verschiedene extrazelluläre S100-Proteine gehören [Bierhaus *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2000]. Es wird vermutet, dass die S100/RAGE-Interaktion sowohl in der Gewebe-Homöostase und bei Entzündungsreaktionen als auch bei degenerativen Erkrankungen und Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle einnimmt [Donato, 2007].

1.3. Die S100-Proteine

1.3.1. Allgemeiner Aufbau und Funktion der S100-Proteine

Die S100-Proteine gehören zu einer Familie von Ca^{2+} -abhängigen Proteinen des EF-Hand-Typs. Die Ca^{2+} -Ionen sind ubiquitäre sekundäre Botenstoffe, die durch die Bindung an intrazelluläre Mediatoren eine Vielzahl zellulärer Prozesse (z. B. Muskelkontraktion, Prozesse der Sekretion, Abläufe des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung) kontrollieren. Die intrazelluläre Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration durch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum oder dem Endoplasmatischen Reticulum führt zur Bindung und somit zur Aktivierung von Ca^{2+} -Sensor-Proteinen. Diese binden und modifizieren wiederum spezifische Zielproteine (z. B. Protein-Kinasen, Protein-Phosphatasen), wodurch verschiedene Signalwege in der Zelle aktiviert werden. Die EF-Hand-Proteine bilden die größte Familie der Ca^{2+} -bindenden Proteine. Zu dieser Proteinfamilie gehören außer den S100-Proteinen auch Calmodulin, Troponin C, Parvalbumin und andere [Santamaria-Kisiel *et al.*, 2006].

Die größte Untergruppe der EF-Hand-Proteine bilden die S100-Proteine. Ihre Namensgebung erfolgte aufgrund ihrer Löslichkeit in 100%iger Ammoniumsulfatlösung [Donato, 2001]. Bislang wurden 25 verschiedene S100-Proteine im humanen Genom identifiziert. Die meisten Gene der S100-Proteine sind in einem Gen-Cluster auf der Chromosomenregion 1q21 lokalisiert, die in Tumorzellen oft umgestaltet ist [Donato, 2001; Ilg *et al.*, 1996]. Die Exon/Intron-Struktur der *S100*-Gene ist hoch konserviert. Mit Ausnahme von S100A5 sind alle S100-Gene durch drei Exons und zwei Introns gekennzeichnet, wobei der Translationsstart im zweiten Exon lokalisiert ist [Zimmer *et al.*, 1995]. Die S100-Proteine werden ausschließlich in Vertebraten exprimiert [Marenholz *et al.*, 2004] und weisen untereinander eine 25-65%ige Aminosäure-Sequenzhomologie auf [Santamaria-Kisiel *et al.*, 2006]. Sie haben ein durchschnittliches Molekulargewicht von 9 - 13 kDa und liegen als antiparallele Homo- oder Heterodimere bzw. als Oligomere in der Zelle vor. Die Monomere interagieren durch nicht-kovalente Bindungen miteinander. Jedes S100-Monomer besitzt am Carboxy (C)-Terminus und am Amino (N)-Terminus eine Ca^{2+} -bindende EF-Hand-Domäne (helix-loop-helix Ca^{2+} -Binde-Domäne), welche durch die *hinge*-Region verbunden sind und von hydrophoben N- und C-terminalen Domänen flankiert werden (Abb. 5).

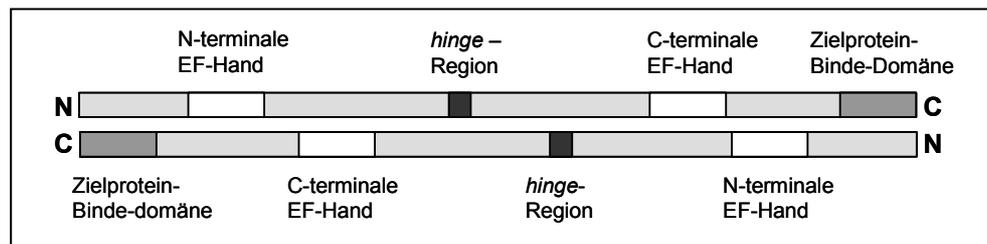


Abb. 5: Die schematische Darstellung eines S100-Protein-Dimers

Die klassische C-terminale EF-Hand ist charakteristisch für alle Proteine der EF-Hand Familie. Sie besteht aus einer 12 Aminosäuren großen Ca^{2+} -Bindungsschleife, die Ca^{2+} -Ionen mit einer 100-fach höheren Affinität als die nicht-klassische N-terminale EF-Hand bindet [Eckert *et al.*, 2004]. Die N-terminale EF-Hand besitzt eine 14 Aminosäuren große Ca^{2+} -Bindungsschleife und ist charakteristisch für die Proteine der S100-Familie. Die größten Sequenzhomologien innerhalb der S100-Familie sind in diesen Ca^{2+} -bindenden EF-Hand-Domänen zu finden [Marenholz *et al.*, 2004]. Die einzelnen S100-Proteine variieren untereinander in der Länge und Sequenz ihrer *hinge*-Region und der für jedes S100-Protein spezifischen C-terminalen Zielprotein-Binde-Domäne [Donato, 2001]. Durch die Ca^{2+} -Bindung verändert sich die Tertiärstruktur der Dimere, infolgedessen die hydrophoben Reste exponiert und die Bindestellen für die Zielproteine an den gegenüberliegenden C-terminalen Enden frei werden. Aufgrund der hohen Sequenzvariabilität am C-Terminus ist die Bindung der Zielproteine (z. B. p53) sehr spezifisch [Donato, 2003]. Durch die Interaktion der S100-Proteine mit spezifischen Zielproteinen wird deren biologische Aktivität reguliert. Somit sind die S100-Proteine als Ca^{2+} -Sensoren an der Regulation von zellulären Prozessen (z. B.

Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Regulation der Zytoskelett-Zellmembran-Interaktion) beteiligt [Donato, 2001].

Darüber hinaus ist die zell- und gewebespezifische Expression der S100-Proteine charakteristisch für diese Protein-Familie [Santamaria-Kisiel *et al.*, 2006]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Expression der S100-Proteine auch in Verbindung mit verschiedenen Erkrankungen (z. B. Diabetes, Kardiomyopathie, Neurodegenerative Erkrankungen und Tumorerkrankungen) unterschiedlich reguliert ist [Donato, 2003; Marenholz *et al.*, 2004]. In einer Vielzahl von Studien konnte eine differentielle Expression von S100-Proteinen in unterschiedlichen Arten von Tumorgeweben im Vergleich zu dem entsprechendem gesundem Gewebe gezeigt werden. Daher wird den S100-Proteinen eine zunehmende Bedeutung in der Tumorinitiation und der Tumorprogression zugeschrieben [Bartling *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2003; Maelandsmo *et al.*, 1997; Pierce *et al.*, 2008; Salama *et al.*, 2007]. Sie sind intrazellulär an der Regulierung einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. Sie beeinflussen unter anderem den Zellzyklus, die Proliferation, die Differenzierung und die Migration von Zellen, indem sie die Enzymaktivität (z. B. Regulierung der Aktivität der Casein-Kinase I und II durch S100A8/A9), die Ca^{2+} -Homöostase (z. B. Stimulierung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Reticulum von Muskelzellen durch S100A1), Komponenten des Zytoskeletts (z. B. Regulation von Myosin durch S100A4) und Transkriptionsfaktoren (z. B. Inhibierung der p53-Phosphorylierung durch S100A4) regulieren [Donato, 2003; Marenholz *et al.*, 2004]. Zusätzlich zu ihrer intrazellulären Funktion können einige S100-Proteine (S100B, S100A4, S100A8, S100A9, S100A12 und S100A13) über bislang weitestgehend unbekannte Wege sekretiert werden. Eine potentielle Signalsequenz für sekretierte S100-Proteine ist hierfür nicht bekannt. Die extrazellulären S100-Proteine binden an Rezeptoren (z. B. RAGE) und üben eine Zytokin-ähnliche Funktion aus [Donato, 2003]. So ist zum Beispiel das extrazelluläre Heterodimer S100A8/S100A9 als chemotaktisches Molekül an der proinflammatorischen Antwort beteiligt [Sorg, 1992]. S100A8 und S100A9 gehören zu den von Phagozyten exprimierten S100-Proteinen und werden vor allem bei lokalen Entzündungen freigesetzt. Die aktive Sekretion erfolgt unabhängig vom klassischen Golgi-Weg [Foell *et al.*, 2006; Roth *et al.*, 2003]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass für die Sekretion von S100A8 und S100A9 ein intaktes Tubulin-Netzwerk notwendig ist [Rammes *et al.*, 1997].

1.3.2. Die Rolle der S100-Proteine in Tumorerkrankungen

Es gibt eine Vielzahl von Studien, die auf eine Beteiligung von S100-Proteinen an der Entstehung und Entwicklung von Tumorerkrankungen hindeuten. So wurde eine erhöhte Expression von S100A8 und S100A9 im Prostata-Karzinom gefunden. Die Stimulation mit extrazellulärem S100A8/A9 führte in Prostata-Karzinomzellen zu einer Aktivierung von NF κ B und zu einer erhöhten Phosphorylierung von ERK 1/2 und p38 MAP-Kinasen. In

diesem Zusammenhang wurde in Abhängigkeit von S100A8/A9 *in vitro* eine verstärkte Migration der Karzinomzellen gezeigt [Hermani *et al.*, 2006].

Ein weiteres pro-metastatisches S100-Protein ist S100A4. Eine mittels siRNA reduzierte Expression von S100A4 in Schilddrüsenkarzinom-Zellen führte zu einem verringerten Tumorwachstum und verminderte die Metastasierung im Mausmodell [Shi *et al.*, 2006]. Des Weiteren korreliert eine erhöhte Expression von S100A4 im Brustkarzinom [Barraclough, 1998], im kolorektalen Karzinom [Takenaga *et al.*, 1997] und im Magenkarzinom [Cho *et al.*, 2003] mit einer schlechten Prognose der Erkrankung. Die Überexpression von S100A4 in diesen Erkrankungen fördert, durch die Interaktion mit Proteinen des Zytoskeletts sowie durch die erhöhte Transkription und Aktivierung von MMPs, die Bildung von Metastasen [Salama *et al.*, 2007; Saleem *et al.*, 2006]. In Knorpelzellen konnte durch die Stimulation des RAGE-Rezeptors mit S100A4 eine gesteigerte Freisetzung von MMP-13 ins Medium gezeigt werden [Yammani *et al.*, 2006]. Auch für bronchiale Adenokarzinom-Zelllinien wurde eine stark erhöhte S100A4-Expression gegenüber normalen bronchialen Epithelzellen nachgewiesen [Matsubara *et al.*, 2005].

Im Gegensatz zu S100A4 wurde für maligne Melanome, das Prostatakarzinom und das Brustkarzinom eine verminderte Expression des S100-Proteins S100A2 gezeigt [Gupta *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 1992; Maelandsmo *et al.*, 1997]. Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, dass S100A2 ein Tumor-Suppressor ist und die Migration von Karzinomzellen negativ beeinflusst [Nagy *et al.*, 2001]. Auch die transkriptionelle Aktivierung des S100A2-Promoters durch den Tumor-Suppressor p53 weist auf eine Funktion als Tumor-Suppressor hin [Tan *et al.*, 1999]. Demgegenüber steht jedoch eine erhöhte Expression von S100A2, die im NSCLC oder dem Magenkarzinom gefunden wurde [El-Rifai *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005a]. Vor allem im Frühstadium des bronchialen Plattenepithelkarzinoms wurde eine erhöhte S100A2-Expression festgestellt [Bartling *et al.*, 2007]. Die Expression und Funktion von S100A2 hängt demnach stark vom Ursprungsgewebe, der Histologie und dem Stadium der Tumorerkrankung ab.

1.3.3. S100P und seine Rolle in verschiedenen Tumorerkrankungen

Das 11 kDa große S100P-Protein gehört zur Familie der S100-Proteine und ist auf der Chromosomenregion 4p16 lokalisiert [Schafer *et al.*, 1995]. Die Aminosäuresequenz von S100P zeigt eine 44%ige Identität zu den nächsten Sequenzverwandten S100A1 bzw. S100B und besitzt im Vergleich zu den anderen Proteinen der S100-Familie den gleichen Aufbau und die gleiche Funktionsweise (s. 1.3.1) [Jin *et al.*, 2003]. Die S100-Proteine unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem Expressionsmuster und, aufgrund ihrer spezifischen C-terminalen Zielprotein-Binde-Domäne, in ihren Interaktionspartnern voneinander. S100P wurde erstmals in humanem Placenta-Gewebe gefunden [Becker *et al.*, 1992], wird aber auch in anderen Organen, wie z. B. dem Herzen, der Skelettmuskulatur und der Lunge exprimiert [Jin *et al.*, 2003]. Darüber hinaus ist S100P in verschiedenen Tumorerkrankungen, wie z. B. dem

Brustkarzinom [Wang *et al.*, 2006], dem Pankreaskarzinom [Ohuchida *et al.*, 2006] und dem Prostatakarzinom [Basu *et al.*, 2008] im Vergleich zu den entsprechenden normalen Geweben erhöht exprimiert. Eine erhöhte Expression von S100P korreliert dabei mit einer schlechten Prognose, da die Überexpression von S100P in diesen Tumorerkrankungen die Proliferation, die Metastasierung und das Überleben von Tumorzellen fördert [Arumugam *et al.*, 2005; Basu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006]. In diesem Zusammenhang konnte eine direkte Korrelation der S100P-Expression und der Metastasierung von Karzinomzellen im Mausmodell gezeigt werden [Bulk *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006]. Inwieweit S100P die Resistenz von Karzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika beeinflusst, ist umstritten. Einerseits war die Expression von S100P in verschiedenen Doxorubicin-resistenten Karzinom-Zelllinien erhöht [Bertram *et al.*, 1998], andererseits führte die Überexpression von S100P in Ovarialkarzinom-Zellen zu einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber Paclitaxel und Carboplatin [Wang *et al.*, 2008]. Im Gegensatz zu den Karzinomerkrankungen gehört S100P in der akuten myeloischen Leukämie außerdem zu den Genen, deren Expression eine gute Prognose der Erkrankung prognostiziert [Bullinger *et al.*, 2004] und zur morphologischen Differenzierung von Leukämie-Zellen zu Granulozyten beiträgt [Ishii *et al.*, 2005]. Demzufolge kann für S100P, ähnlich wie für S100A2, eine vom Ursprungsgewebe und der Histologie der Tumorerkrankung abhängige Funktion vermutet werden.

Bislang ist nur wenig über die Funktion von S100P bekannt. Es kann angenommen werden, dass auch S100P als Homodimer oder Heterodimer agiert. Für S100P konnte, neben der Bildung von Homodimeren [Austermann *et al.*, 2008b], die Heterodimerbildung mit S100A1 [Wang *et al.*, 2004] und S100Z [Gribenko *et al.*, 2001] gezeigt werden. Zu den intrazellulären Interaktionspartnern von S100P-Dimeren gehört unter anderem Ezrin, welches die Aktin-Filamente mit der Zellmembran verbindet. Die Ca^{2+} -abhängige Interaktion von S100P mit Ezrin fördert dabei die Migration von Karzinomzellen [Austermann *et al.*, 2008a; Koltzsch *et al.*, 2003]. Weitere bekannte intrazelluläre Interaktionspartner von S100P sind das Zellkern-ständige S100P-bindende Protein S100PBR [Downen *et al.*, 2005] und CacyBP/SIP [Filipek *et al.*, 2002]. Verschiedene Effekte von S100P auf Karzinomzellen werden auch auf die Aktivierung des RAGE-Rezeptors durch extrazelluläres S100P zurückgeführt. Durch die Bindung an RAGE werden unter anderem der ERK1/2-Signalweg und der NF κ B-Signalweg aktiviert, welche wiederum die Proliferation und die Migration von Karzinomzellen fördern [Arumugam *et al.*, 2004; Fuentes *et al.*, 2007].

Für das Nicht-Kleinzellige Bronchialkarzinom ist aus vorangegangenen Studien jedoch bekannt, dass die Expression von RAGE im Vergleich zum normalen Bronchialgewebe stark reprimiert ist [Bartling *et al.*, 2005]. Aus diesem Grund ist eine Interaktion von S100P mit RAGE unter pathophysiologischen Bedingungen in der Lunge nicht möglich. Im Gegensatz zu RAGE ist die Expression von S100P im Bronchialkarzinom erhöht. Die Expression von S100P ist dabei stark von der Histologie und dem Stadium des Bronchialkarzinoms abhängig. So konnte gezeigt werden, dass S100P im bronchialen Adenokarzinom gegenüber dem

bronchialen Plattenepithelkarzinom höher exprimiert war. Die Normal-Lungengewebe zeigten im Vergleich nur eine geringe S100P-Expression. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die Expression von S100P vor allem im Frühstadium des bronchialen Adenokarzinoms erhöht und in späteren Stadien wieder vermindert war [Bartling *et al.*, 2007] (Abb. 6; Abb. 7).

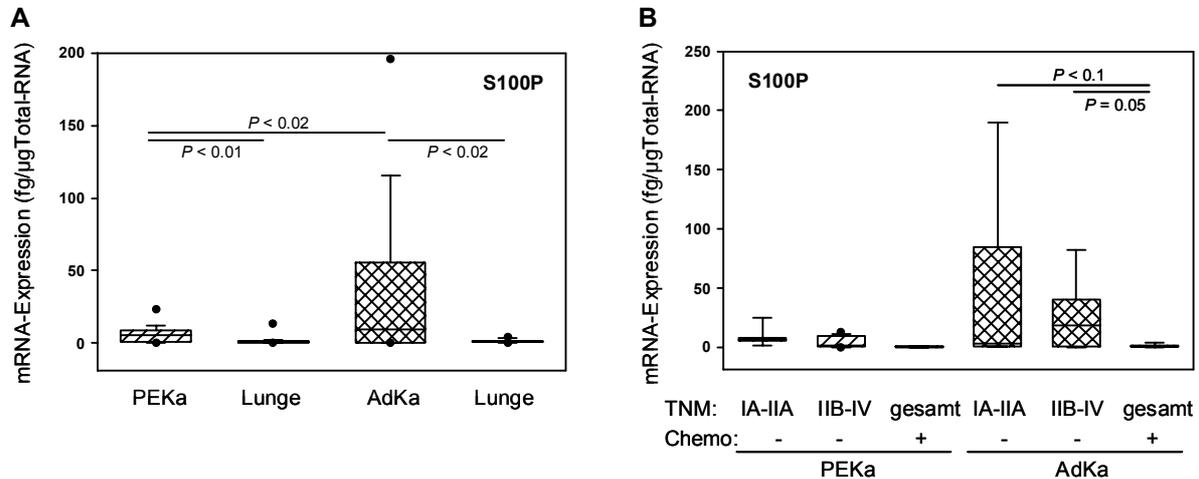


Abb. 6: Die mRNA-Expression von S100P in Bronchialkarzinom-Geweben unterschiedlicher Histologie und Stadien [Bartling *et al.*, 2007]

Dargestellt ist die mittels Real-Time-PCR analysierte mRNA-Expression von S100P in Box und Whisker-Plots. **A)** Die mRNA-Expression von S100P in Geweben des Plattenepithelkarzinoms (PEKa) und des Adenokarzinoms (AdKa) der Lunge ist im Vergleich zum entsprechenden Normal-Lungengewebe (Lunge) dargestellt. **B)** Die mRNA-Expression von S100P ist in Geweben des bronchialen Plattenepithelkarzinoms und Adenokarzinoms in Abhängigkeit vom TNM-Stadium von Patienten mit (+) oder ohne ohne (-) Chemotherapie-Behandlung dargestellt.

Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit der Einfluss von S100P auf die Entstehung und die Entwicklung im bronchialen Adenokarzinom untersucht werden. Des Weiteren sollte aufgrund der gegensätzlichen Expression von S100P und RAGE im Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinom die Funktion von S100P in Abhängigkeit von RAGE untersucht werden.

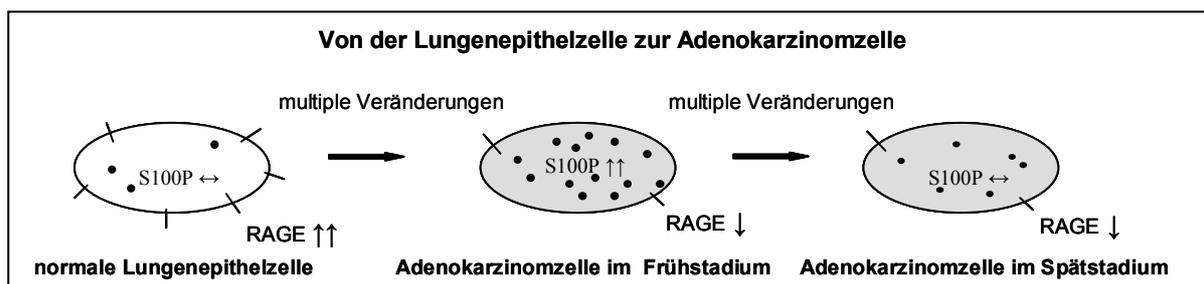


Abb. 7 Genetische Veränderungen während der Entstehung und Entwicklung des bronchialen Adenokarzinoms

1.4. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war, die Rolle von S100P bei der Entstehung (Tumorigenese), der Entwicklung (Invasivität) und der Therapieresistenz des bronchialen Adenokarzinoms zu untersuchen. Zunächst sollte deshalb die basale Expression und die Regulation von *S100P* nach Chemotherapie-Behandlung im Vergleich zu putativen Interaktionspartnern und anderen tumorrelevanten S100-Proteinen in verschiedenen Bronchialkarzinom-Zellen und Bronchialkarzinom-Geweben untersucht werden. Des Weiteren sollte der Einfluss von S100P auf die Resistenz von Bronchialkarzinom-Zellen gegenüber verschiedenen zytotoxischen Agenzien sowie auf Parameter für die Tumorentwicklung analysiert werden. Da die Expression des bronchial-spezifischen Zelloberflächenrezeptors RAGE in den bronchialen Karzinomzellen stark vermindert ist, sollte gleichzeitig der Einfluss des Verlustes von RAGE auf die Entwicklung und die Therapieresistenz bestimmt werden. Zusätzlich sollte nach weiteren Genen gesucht werden, die mit der S100P-Expression im bronchialen Adenokarzinom korrelieren. Auf diesem Weg sollten putative intrazelluläre Zielproteine von S100P identifiziert werden, die durch die Expression von S100P bzw. die Interaktion mit S100P intrazellulär reguliert werden und die Tumorigenität und Invasivität der bronchialen Adenokarzinom-Zellen in Abhängigkeit von S100P beeinflussen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Aceton	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Acrylamid/Bisacrylamid (40 % w/v)	Serva, Heidelberg
Agar Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe
Agarose SERVA Premium <i>low melting</i>	Serva, Heidelberg
alamarBlue [®] -Färbelösung	Biosource, Camarillo, USA
Albumin-Fraktion V	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Annexin-V-Fluos	Roche, Mannheim
5-Aza-2'-deoxy-cytidin	Sigma, Taufkirchen
Brij [®] 35-Lösung (30 % w/v)	Sigma, Taufkirchen
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-	
β-D-galactopyranosid	Biomol, Hamburg
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ ×2H ₂ O)	Merck, Darmstadt
5(6)-Carboxy-fluorescein-diacetat-	
succinimidylester (CFSE)	Molecular Probes, Göttingen
3-(Cyclohexylamino)-1-propan-sulfonsäure	
(CAPS)	AppliChem, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau G 250	Bio-Rad, München
Cytochalasin B	Sigma, Taufkirchen
D-Glucose	Sigma, Taufkirchen
Dextran (aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	Sigma, Taufkirchen
4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-	
dihydrochlorid (DAPI)	Sigma, Taufkirchen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
DL-α-Difluor-methylornithin (DFMO)	Merck-Calbiochem, Darmstadt
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
DNA-Größenmarker	
(<i>Gene Ruler</i> [™] 100 bp DNA Ladder Plus,	
<i>Gene Ruler</i> [™] 1 kb DNA Ladder)	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP-Mix, 10 mM	Promega, Mannheim
Ethanol (99,8 %)	Merck, Darmstadt

Ethylenglykol-bis-(2-Aminoethyl)-N,N,N',N'-	
Tetraessigsäure (EGTA)	Merck, Darmstadt
Essigsäure (99,7%)	Sigma, Taufkirchen
FACS <i>Clean</i>	BD Biosciences, Heidelberg
FACS <i>Flow</i>	BD Biosciences, Heidelberg
FACS <i>Rinse</i>	BD Biosciences, Heidelberg
Formaldehyd-Lösung ($\geq 37\%$)	Merck, Darmstadt
Gelatine	Sigma, Taufkirchen
Glycergel [®] Eindeckmedium	Dako, Cambridgeshire, UK
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Serva, Heidelberg
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-	
ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Taufkirchen
Hoechst 33342	Sigma, Taufkirchen
2-Propanol	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Luminol (3-Aminophthalhydrazid)	Sigma, Taufkirchen
Luria Agar (Miller's LB Agar)	Invitrogen, Karlsruhe
Luria Broth (Miller's LB broth)	Sigma, Taufkirchen
Lymphosep	c.c.pro, Oberdorla
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ ×6H ₂ O)	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs SG, Schweiz
3-Mercaptopropionsäure	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Fluka, Buchs SG, Schweiz
M-MLV Reverse Transkription 5x Puffer	Promega, Mannheim
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Natriumcitrat	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Natriumdesoxycholat (DOC)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Na ₂ EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natrium-Orthovanadat (NaVO ₃)	Sigma, Taufkirchen
Nonidet P40	AppliChem, Darmstadt

Okadainsäure	Merck-Calbiochem, Darmstadt
Oligo(dT)15-Primer	Promega, Mannheim
Orange G	Merck, Darmstadt
PCR Master Mix	Promega, Mannheim
p-Cumarsäure	Sigma, Taufkirchen
Propidiumiodid (95 %)	Sigma, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma, Taufkirchen
Protein A-Agarose	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Proteinmolekulargewichtsmarker (<i>Magic Mark</i> TM XP Western Standard) (<i>Page Ruler</i> TM Prestained Protein Ladder)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Random Primer</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Promega, Mannheim
Rotisilon C/D	Roche, Mannheim
Salzsäure (37 %)	Roth, Karlsruhe
Sucrose	Merck, Darmstadt
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Thapsigargin	AppliChem, Darmstadt
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Merck-Calbiochem, Darmstadt
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt
Ziegenserum (Normal)	Sigma, Taufkirchen
	Dako, Cambridgeshire, UK

Kinase-Inhibitoren

SB203580	AXXORA, Grünberg
SP 600125	AXXORA, Grünberg
U0126	AXXORA, Grünberg

Zytostatika und andere zytotoxische Agenzien

Cisplatin	Hexal AG, Holzkirchen
Etoposid	Bristol-Myers Squibb GmbH, München
Paclitaxel	Merck-Calbiochem, Darmstadt
MG-132	Tocris, Bristol, UK
CGP 74514A	Sigma, Taufkirchen

2.1.2. Enzyme

Benzonase	VWR, Darmstadt
<i>Easy A</i> TM High-Fidelity PCR Cloning-Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA

M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H(-)	Promega, Mannheim
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
RQ1 RNase-freie DNase	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe

Restriktionsenzyme

<i>Bam</i> HI	Promega, Mannheim
<i>Bgl</i> II	Promega, Mannheim
<i>Eco</i> RI	Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Nco</i> I	Promega, Mannheim
<i>Nhe</i> I	Fermentas, St.Leon-Rot

2.1.3. Antikörper

Alexa Fluor [®] 350 Esel anti-Ziege IgG	Molecular Probes, Göttingen
Alexa Fluor [®] 594 Ziege anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes, Göttingen
Alexa Fluor [®] 488 Ziege anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes, Göttingen
Alexa Fluor [®] 594 Ziege anti-Maus IgG	Molecular Probes, Göttingen
Alexa Fluor [®] 488 Ziege anti-Maus IgG	Molecular Probes, Göttingen
Maus Anti-Human β -Catenin (monoklonal)	BD Biosciences, Heidelberg
Maus Anti-Human CD11b APC (monoklonal)	Caltag Laborities GmbH, Hamburg
Maus Anti-Human CD14 APC (monoklonal)	Caltag Laborities GmbH, Hamburg
Kaninchen Anti-Human Ezrin (polyklonal)	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen Anti-GAPDH (polyklonal)	abcam, Cambridge, UK
Maus Anti-GFP (monoklonal)	Roche, Mannheim
Kaninchen Anti-Human HMG1 (polyklonal)	BD Biosciences, Heidelberg
Kaninchen Anti-Phospho-p38 MAP Kinase (monoklonal)	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen Anti-Phospho-ERK 1/2 (polyklonal)	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen Anti-Phospho-JNK (monoklonal)	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen Anti-RAGE A905	Labor der Herz-Thoraxchirurgie
Maus Anti-RAGE 4F11	Prof. Weigle, Dresden
Ziege Anti-Human S100P (polyklonal)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Peroxidase-konjugiertes Esel Anti-Ziege IgG	Dianova, Hamburg
Peroxidase-konjugiertes Esel Anti-Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg
Peroxidase-konjugiertes Ziege Anti-Maus IgG	Dako, Cambridgeshire, UK

2.1.4. Kits

BCA TM Protein Assay-Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
<i>BigDye</i> [®] Terminator v1.1 <i>Cycle Sequencing</i> -Kit	Applied Biosystems, Warrington, UK
BLOCK-iT TM Fluorescent Oligo	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Effectene</i> [®] Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
<i>EndoFree Plasmid Mega</i> -Kit	Qiagen, Hilden
iQ TM SYBR [®] Green-Supermix	Bio-Rad, München
<i>MinElute Gel Extraction</i> -Kit	Qiagen, Hilden
<i>MinElute</i> [®] PCR Purification-Kit	Qiagen, Hilden
<i>Oligofectamine</i> TM Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
<i>QIAprep Spin Miniprep</i> -Kit	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy Mini</i> -Kit	Qiagen, Hilden

2.1.5. Lösungen und Medien für die Zellkultur

Dulbecco's Modifiziertes <i>Eagle Medium</i> (DMEM), <i>High Glucose</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	PB Perbio, Bonn
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Berlin
Lidocain	Sigma, Taufkirchen
<i>Minimum Essential Medium</i> (MEM) (10×)	Invitrogen, Karlsruhe
rh GM-CSF (Granulocyten-Makrophagen- Kolonie-stimulierender Faktor)	Immuno Tools, Friesoythe
Opti-MEM [®] I GlutaMAX TM I	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 (+ L-Glutamine)	Invitrogen, Karlsruhe
Transferrin aus menschlichem Blutplasma	Sigma, Taufkirchen
10× Trypsin-EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe

Antibiotika

Ampicillin	Roth, Karlsruhe
100× Penicillin-Streptomycin (PS)	Invitrogen, Karlsruhe
Geneticin (G418 Sulfat)	Merck-Calbiochem, Darmstadt
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Kanamycin	Serva, Heidelberg

2.1.6. Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien stammen von der *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, USA) und wurden am *National Cancer Institute* (NCI; USA) generiert (Tab. 1).

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien

Zelllinie	ATCC® - Nummer	Ursprung	Besonderheiten
H358	CRL-5807	Adenokarzinom der Lunge	p53 negativ
H322	CRL-5806	Adenokarzinom der Lunge	p53 endogen mutiert
A549	CCL-185	Adenokarzinom der Lunge	p53 positiv
Panc-1	CRL-1469	Adenokarzinom des Pankreas	p53 endogen mutiert

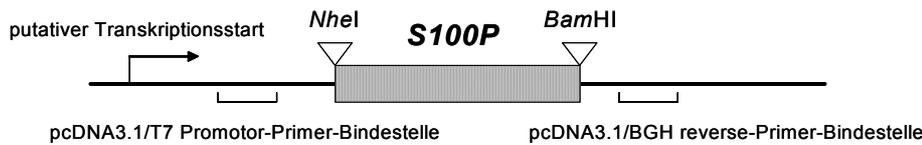
2.1.7. Plasmide, Bakterienstämme und genetisch veränderte humane Zelllinien

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von S100P auf humane Bronchialkarzinomzellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden zwei eukaryotische Expressionsvektoren, die humanes S100P als Nicht-Fusionsprotein (Abb. 9A) und als Fusionsprotein mit GFP (Abb. 9B) exprimierten, hergestellt. Hierfür wurde aus humanem Bronchialkarzinomgewebe RNA isoliert (s. 2.2.3.1.) und in cDNA umgeschrieben (s. 2.2.3.3.). Der kodierende Bereich von *S100P* wurde von dieser humanen cDNA mit den entsprechenden Klonierungsprimern (Tab. 3) amplifiziert und zunächst in den *pDrive Cloning Vector* (Qiagen) kloniert. Nach der Transformation (s. 2.2.5.2.) und der Vermehrung in *E. coli* TopF'10 (s. 2.2.5.1.) wurde das Plasmid isoliert (s. 2.2.4.3.5.) und durch DNA-Sequenzierung (s. 2.2.4.3.6.) überprüft.

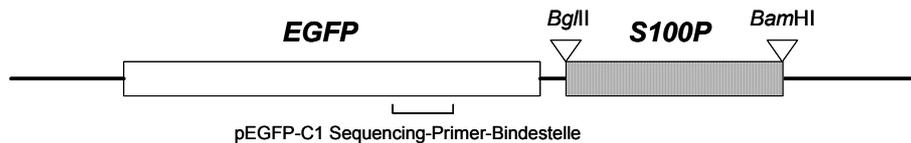
Die verwendeten eukaryotischen Expressionsvektoren pcDNA3.1(+) (Invitrogen) und pEGFP-C1 (Clontech) wurden, ebenso wie *S100P* aus dem *pDrive Cloning Vector*, mit den in Abb. 8 angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten (s. 2.2.4.3.1.). *S100P* wurde dann über diese Schnittstellen in beide Vektoren ligiert (s. 2.2.4.3.4.). In dem pEGFP-C1-Vektor wurde S100P N-terminal an das C-terminale Ende von EGFP kloniert und als Fusionsprotein exprimiert. Die Expression von S100P wurde in beiden Vektoren durch den konstitutiven Promotor CMV (vom humanen Cytomegalo-Virus) induziert. Die Vektoren wurden in *E. coli* TopF'10 vermehrt, mittels DNA-Sequenzierung überprüft und aufgereinigt.

Die S100P-exprimierenden Vektoren wurden daraufhin sowohl transient als auch stabil in verschiedene humane Zelllinien transfiziert (s. 2.2.2.2.). Für eine stabile Transfektion musste *S100P* in das Genom der Zelle integriert werden. Die Zellklone wurden mittels PCR (s. 2.2.4.1.1.) und Immuno-Blot (s. 2.2.6.1.) auf das Vorhandensein von S100P überprüft. Die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Vektoren sind in Abb. 8 schematisch dargestellt.

A) pcDNA::S100P



B) pEGFP::S100P

**Abb. 8 In dieser Arbeit generierte eukaryotische Expressionsvektoren mit humanem S100P**

Die Sequenz von *S100P* wurde mit den entsprechenden Klonierungsprimern aus humaner cDNA amplifiziert. A) *S100P* wurde über die Schnittstellen *NheI* und *BamHI* in den pcDNA3.1(+)-Vektor kloniert. B) *S100P* wurde über die Schnittstellen *BglII* und *BamHI* in den pEGFP-C1-Vektor kloniert. Das Gen wurde C-terminal an das *enhanced green fluorescent protein (eGFP)*-Gen kloniert und liegt im selben Leserahmen.

Die genetisch veränderten humanen Zelllinien sind in Tab. 2 aufgelistet. Die genetisch veränderten H358 RAGE-Zellen und die H358 Δ *cytoRAGE*-Zellen lagen als stabil transfizierte Zelllinien im Labor der Herz-Thoraxchirurgie vor.

Tab. 2: Plasmide und Zelllinien

Vektor	Insert	humane Zellen
pDrive Cloning Vector (Qiagen)	humanes <i>S100P</i> ^{a)}	
pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen)	kein Insert	H358 pcDNA-ko ^{a, b)} Panc1 pcDNA-ko ^{a, b)}
pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen)	humanes <i>RAGE</i>	H358 RAGE
pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen)	humanes Δ <i>cytoRAGE</i>	H358 Δ <i>cytoRAGE</i>
pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen)	humanes <i>S100P</i> ^{a)}	H358 pcDNA::S100P ^{a, b)} Panc-1 pcDNA::S100P ^{a, b)}
pEGFP-C1 (BD Biosciences Clontech)	kein Insert	H358 pEGFP-ko ^{a, b)} Panc-1 pEGFP-ko ^{a, b)}
pEGFP-C1 (BD Biosciences Clontech)	humanes <i>S100P</i> ^{a)}	H358 pEGFP::S100P ^{a, b)} H358 RAGE pEGFP::S100P ^{a, b)} H358 Δ <i>cytoRAGE</i> pEGFP::S100P ^{a, b)} Panc-1 pEGFP::S100P ^{a, b)} H322 pEGFP::S100P ^{a, c)} A549 pEGFP::S100P ^{a, c)}

^{a)} in dieser Arbeit generierte Plasmide und Zelllinien,

^{b)} stabil transfizierte Zelllinien, ^{c)} transient transfizierte Zelllinien

2.1.8. Oligonukleotide

Die Auswahl der genspezifischen Primersequenz erfolgte, wenn nicht anders angegeben, aus bekannten Sequenzen (s. Genbanknummer) unter Verwendung des Internetprogramms Primer3 (Version 0.4.0, Rozen). Die Oligonukleotid-Primer wurden von kommerziellen Anbietern (Invitrogen, Karlsruhe; Biomers, Ulm) bezogen. Sie wurden auf eine Endkonzentration von 5 pmol/μl in *aqua bidest* gelöst.

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Primer

Gen-Name	5'→ 3'-Sequenz ^{a)}	Annaeling-Temp. [°C]	Produkt-größe [bp]	Genbank-Nummer	Referenz
Primer für RT- und Real-Time-PCR					
S100A1 sense	AGGAGCTGAAAGAGCTGCTG	65	278	NM_006271	[Ji <i>et al.</i> , 2004]
S100A1 antisense	AGGGATAAGTGGGGTGAGGT				
S100A2 sense	AAGAGGGCGACAAGTTCAAG	58	259	NM_005978	
S100A2 antisense	ATCCATGGCAGGAAGTCAAG				
S100A4 sense	CTGACTGCTCATATGGCGTGCC	52	341	NM_002961	[Teratani <i>et al.</i> , 2002]
S100A4 antisense	CCAACCGGATCCGAGGAGTTTT				
S100A6 sense	GCCCTCACATATGGCATGCC	52	294	NM_014624	[Teratani <i>et al.</i> , 2002]
S100A6 antisense	TATGGATCCTCAGCCCTTGAGG				
S100A8 sense	ACAAGTACTCCCTGATAAAGGGG	50	193	NM_002964	
S100A8 antisense	TGCCACGCCCATCTTTATCACCAG				
S100A9 sense	ATGGAGGACCTGGACACAAATGC	58	109	NM_002965	
S100A9 antisense	TCGTCACCCTCGTGATCTTCTC				
S100P sense	ATCTAGCACCATGACGGAAC	55	383	NM_005980	[Teratani <i>et al.</i> , 2002]
S100P antisense	AGCCTAGGGGAATAATTGCC				
S100A12 sense	TAGGCTGGGCATATGACAAAAC	45	315	NM_005621	[Teratani <i>et al.</i> , 2002]
S100A12 antisense	TAAAAGGATCCAGAGAGCTAC				
S100Z sense	ATGCCACCCAGCTCGAGATGGC CATGGAC	69	450	NM_130772	[Gribenko <i>et al.</i> , 2001]
S100Z antisense	CTCAAGCAGCTTTCTCAAAGCCC CCAAGC				
DLC-1 sense	GGACACCATGATCCTAACAC	55	261	NM_182643	[Kim <i>et al.</i> , 2003]
DLC-1 antisense	CTCATCCTCGTCTGAATCGT				

Fortsetzung Tab. 3

GAPDH sense	CATCACCATCTTCCAGGAGCG	60	483	NM_002046	
GAPDH antisense	TGACCTTGCCCACAGCCTTG				
18S rRNA sense	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGG	60	348	NR_003286	
18S rRNA antisense	AGGGCAGGGACTTAATCAACGC				
CacyBP/SIP sense	CGAATATGGCTTCAGAAGAGCTA	50	687	NM_014412	[Sun <i>et al.</i> , 2007]
CacyBP/SIP antisense	TCAAAATTCCGTGTCTCCTTTG				
RAGE sense	TGAACACAGGCCGACAGAAG	58	326	NM_001136	
RAGE antisense	CCCATCCAAGTGCCAGCTAAG				
SMURF2 sense	TAGCCCTGGCAGACCTCTT	60	205	NM_022739	[Ohashi <i>et al.</i> , 2005]
SMURF2 antisense	CTTGTTGCGTTGTCCTCTGT				
Porcupine sense	TACCTGAAGCATGCAAGCAC	60	205	NM_022825	[Chen <i>et al.</i> , 2008]
Porcupine antisense	CGGTGTCTACCATGTGCATC				
NET-7 sense	ACTATCGACAAGGAGCGTTTCA	60	330	NM_012339	[Serru <i>et al.</i> , 2000]
NET-7 antisense	GGTGCTATCCCAGACGGTCC				
β -Catenin sense	GCCAAGTGGGTGGTATAGAG	49	330	NM_001904	[Wei <i>et al.</i> , 2008]
β -Catenin antisense	GCTGGGTATCCTGATGTGC				
Klonierungsprimer					
<i>Bgl</i> II-S100P sense	AAA <u>AGATCT</u> ATGACGGA ACTA	50	300		
<i>Nhe</i> I-S100P sense	AAAGCTA <u>GCA</u> TGACGGA ACTA	50	300		
<i>Bam</i> HI-S100P antisense	AAAGGATC <u>CT</u> CATTTGAGTCCTGC	50			
Vektorprimer					
pEGFP-C1 sequencing	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG	55			BD Biosciences
pcDNA 3.1 T7 promoter binding site	TAATACGACTCACTATAGGG	50			Invitrogen
pcDNA 3.1/BGH reverse priming site	TAGAAGGCACAGTCGAGG	50			Invitrogen
M13 -20 fwd	TTGTAAAACGACGGCCAGTG	56			
M13 revers	CAGGAAACAGCTATGACCATG	56			

^{a)} Für die Klonierung relevante Schnittstellen, die neu eingeführt wurden, sind unterstrichen.

2.2. Methoden

2.2.1. Patientengewebe

In dieser Arbeit wurden 42 bronchiale Adenokarzinome und 16 normale Lungengewebe von Patienten untersucht, die am Bronchialkarzinom erkrankt waren. Den Patienten musste aufgrund der Tumorerkrankung ein Teil der Lunge chirurgisch entfernt werden (Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie). Die Gewebeproben wurden im Schnellschnittlabor des Institutes für Pathologie präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Patienten waren über die Verwendung des Lungenmaterials aufgeklärt. Diese Studie war durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät, Halle/Saale genehmigt.

2.2.2. Kultivierung eukaryotischer Zellen

2.2.2.1. Standard-Zellkultur

Puffer und Lösungen für die Zellkultur

10× PBS (pH 7,4)	1,4 M NaCl 27 mM KCl 101,5 mM Na ₂ HPO ₄ 15 mM KH ₂ PO ₄ in <i>aqua bidest</i>
Zellkulturmedium	10 % FCS 1× Penicillin-Streptomycin (50 µg/ml) in DMEM, <i>High Glucose</i> (4500 mg/l D-Glucose + L-Glutamin, + Na-Pyruvat)
1× Trypsin-Lösung	1× Trypsin-EDTA (0,05 % Trypsin, 0,53 mM Na ₂ EDTA) in 1× PBS

Die verwendeten Tumorzelllinien wurden in Zellkulturmedium bei 37 °C in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre mit 10 % CO₂ auf 10 cm-Zellkulturschalen kultiviert. Für die Passagierung der Zellen wurden diese 4 min mit 1× Trypsin-Lösung bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Zellkulturmedium von der Zellkulturschale gelöst. Die vitale Zellzahl wurde mit Hilfe des *Casy*[®] *Cell Counter Systems* (Schärfe System GmbH, Reutlingen) bestimmt und die Zellen in definierter Zellzahl auf eine neue 10 cm-Zellkulturschale umgesetzt.

Für die Kryokonservierung wurde die Zellsuspension bei 500 g 5 min abzentrifugiert, in vorgekühltem Zellkulturmedium mit 10 % DMSO resuspendiert und in 2 ml Gefrieröhrchen

überführt. Das schrittweise Einfrieren erfolgte im *Cryo 1 °C Freezing Container* (Nalgene[®] Labware, Wiesbaden) bei -80 °C. Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte bei -160 °C über flüssigem Stickstoff in einem Espace 331 (Air Liquide, Frankfurt a.M.).

Zum Auftauen der Zellen wurden diese mit 37 °C warmem Zellkulturmedium in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 500 g 5 min abzentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und auf eine 10 cm-Zellkulturschale ausgesetzt.

Für die Behandlung der Zellen mit zytotoxischen Agenzien und anderen zu untersuchenden Substanzen wurden diese subkonfluent (Zelldichte von 50 – 70 % Konfluenz) in Zellkulturmedium ausgesetzt. Nach 24 h Kultivierung wurden diese mit den entsprechenden Agenzien inkubiert. Der Zeitraum der Inkubation war abhängig vom entsprechenden Agenz. Die Zellen wurden dann in Zelltodanalysen (s. 2.2.2.7.), in der Immunzytochemie (s. 2.2.6.5.) oder auf die mRNA-Expression (s. 2.2.3.1. - 2.2.4.1.1.) oder Proteinexpression (s. 2.2.6.1.) untersucht. Konditioniertes Medium wurde von konfluenten Zellen nach 24 h Kultivierung abgenommen und im Verhältnis von 1:1 mit frischem Zellkulturmedium versetzt.

2.2.2.2. Transfektion von Vektor-DNA in humane Zellen

Für die Transfektion wurden die humanen Zellen am Vortag subkonfluent ausgesetzt. Die Transfektion erfolgte nach dem Protokoll des *Effectene*[®]-Transfektionsreagenz. Für eine 12 well-Multischale wurden 0,3 µg Vektor-DNA auf 75 µl mit EC-Puffer verdünnt und 2,4 µl *Enhancer* zur Verdichtung der DNA zugegeben. Nach 5 min Inkubation wurden 5 µl *Effectene*[®]-Reagenz hinzugefügt. Das *Effectene*[®]-Reagenz formt mizellenartige Strukturen und schließt die DNA darin ein. Nach weiteren 10 min Inkubation wurden die *Effectene*[®]-DNA-Komplexe mit Zellkulturmedium gemischt und direkt auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz über Nacht kultiviert. Danach wurde das Medium durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

Die DNA-Sequenz des transfizierten Gens muss für eine stabile Expression durch eine spontane Rekombination in das Genom der Zellen integriert werden. Auf der eukaryotischen Vektor-DNA ist eine Antibiotikaresistenz-Kassette gegen Genetecin (G418) enthalten. Deshalb wurde dem Zellkulturmedium 1 mg/ml G418 zur Selektion dieser Zellen zugesetzt. Des Weiteren wurden die Zellen, die ein Fusionsprotein mit dem grünfluoreszierenden Protein GFP exprimierten, entsprechend ihrer Fluoreszenz am FACS *Vantage Cell Sorter* (BD Biosciences, San Diego, USA) sortiert. Zur Gewinnung von Einzelzellklonen wurden die Zellen soweit verdünnt, dass einzelne Zellen in einer Zellkulturschale herangezogen werden konnten.

Die erzeugten Mischzellklone und Einzelzellklone wurden mittels RT-PCR (s. 2.2.3.1. - 2.2.4.1.1.), Immuno-Blot (s. 2.2.6.1.) und Immunzytochemie (s. 2.2.6.5.) auf ihre Richtigkeit überprüft.

2.2.2.3. Transfektion von siRNA in humane Zellen

Die siRNA-Oligonukleotide wurden von kommerziellen Anbietern (Invitrogen, Karlsruhe; Biomers, Ulm) bezogen. Sie wurden mit DEPC-behandeltem H₂O auf eine Endkonzentration von 20 µM eingestellt (Tab. 4). Um die Bedingungen für die Transfektion der siRNA in die humanen Bronchialkarzinomzellen auszutesten und zu optimieren, wurde das BLOCK-iTTM Fluorescent Oligo, eine mit Fluorescein gekoppelte dsRNA, genutzt.

Für die Transfektion von siRNA wurden die humanen Zellen am Vortag umgesetzt, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 50 % bis 60 % erreicht hatten. Die Transfektion erfolgte nach dem Protokoll des *Oligofectamine*TM-Reagenz. Für eine 12 well-Multischale wurden 100 pmol siRNA (Tab. 4) in 50 µl Opti-MEM[®]-Medium verdünnt. Das *Oligofectamine*TM-Reagenz wurde im Verhältnis 1:4 ebenfalls mit Opti-MEM[®]-Medium verdünnt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden die beiden Ansätze gemischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Das *Oligofectamine*TM-Reagenz interagiert spontan mit den Oligonukleotiden und formt Transfektionskomplexe. Die *Oligofectamine*TM-siRNA-Komplexe wurden mit Opti-MEM[®]-Medium gemischt und auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

Tab. 4: Übersicht über die verwendete siRNA

siRNA	5' → 3'-Sequenz	Referenz
siRNA Kontrolle sense (Invitrogen)	AAUGAGGAUGCCUGCAGGGAC	
siRNA Kontrolle antisense (Invitrogen)	GUCCCUGCAGGCAUCCUCAUU	
siRNA <i>S100P</i> sense (Invitrogen)	AAUGGAGAUGCCCAGGUGGAC	[Arumugam <i>et al.</i> , 2005]
siRNA <i>S100P</i> antisense (Invitrogen)	GUCCACCUGGGCAUCUCCAUU	[Arumugam <i>et al.</i> , 2005]
siRNA <i>Porcupine</i> sense (Biomers)	AAGUUGUCACAAGCUGGAACC	[Chen <i>et al.</i> , 2008]
siRNA <i>Porcupine</i> antisense (Biomers)	GGUUCAGCUUGUGACAACUU	[Chen <i>et al.</i> , 2008]

2.2.2.4. Proliferationsassay

Die Untersuchung der Zellproliferation erfolgte in 12 well-Multischalen. Hierfür wurden $1,3 \times 10^4$ Zellen/cm² in Zellkulturmedium ausgesetzt. Die Zellzahl wurde täglich über einen Zeitraum von sieben Tagen bestimmt. Die Zellen wurden mittels Trypsin von der Zellkulturschale gelöst und die Anzahl der lebenden Zellen mit Hilfe des *Casy*[®] *Cell Counter* Systems ermittelt. Die Populationsverdopplung (PD) ist mit der Formel: $(\ln \text{Zellzahl}_{\text{Tag } x} - \ln \text{Zellzahl}_{\text{Tag } x-1}) / \ln 2$ berechnet worden [Dell'Orco *et al.*, 1973].

Des Weiteren wurde die Proliferation der Zellen mit Hilfe des Indikatorfarbstoffs alamarBlue[®] bestimmt. Aufgrund der metabolischen Aktivität lebender Zellen wird der blaue Farbstoff Resazurin (alamarBlue) durch zelluläre Reduktasen zu dem pinkfarbenen Farbstoff Resorutin umgesetzt [O'Brien *et al.*, 2000]. Geschädigte oder tote Zellen sind hingegen nicht in der Lage, den Farbstoff umzusetzen. Der Farbumschlag wurde durch Absorptionsmessung am FLUOstar OPTIMA Mikroplatten *reader* (BMG Labtechnologies, Offenburg) bei 570 nm und bei 620 nm vermessen und die Differenz ermittelt. Die Zellen wurden hierfür in einer Dichte von $2,3 \times 10^4$ Zellen/cm² auf einer Zellkulturschale ausgesetzt und die Proliferation nach vier Tagen Kultivierung bestimmt.

2.2.2.5. Zellzyklusanalyse

In der Zellzyklusanalyse wurde der DNA-Gehalt der Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu wurde die DNA der Zellen mit Hilfe des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Propidiumiodid (PI) gefärbt. Die PI-Fluoreszenz korreliert mit dem DNA Gehalt der Zellen und somit mit dem Zellzyklus der Zellen.

PI-Färbe-Lösung	3,4 mM Na-Citrat
	0,1 mM Na ₂ EDTA
	0,05 mg/ml Propidiumiodid
	0,05 mg/ml RNaseA
	in 1× PBS

Die Zellen wurden in vorgekühltem 70%igem Ethanol aufgenommen und über Nacht bei -20 °C fixiert und permeabilisiert. Nach der Fixierung der Zellen wurden diese bei 500 g 5 min zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in PI-Färbe-Lösung aufgenommen. Durch die Permeabilisierung der Zellmembranen gelangt das Propidiumiodid in den Zellkern. Da Propidiumiodid auch RNA anfärbt, wurde diese durch die RNaseA in der Färbelösung abgebaut. Nach einer weiteren Stunde Inkubation auf Eis wurden der DNA-Gehalt der Zellen am FACS *Calibur Flow Cytometer* (BD Biosciences, San Diego, USA) vermessen. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 488 nm, die Emission wurde bei 578 nm vermessen. Mit Hilfe der *Multicycle* Software (Flow Systems, Phoenix, USA) wurde der prozentuale Anteil der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusstadien errechnet.

2.2.2.6. Bildung von Tumorkolonien *in vitro*

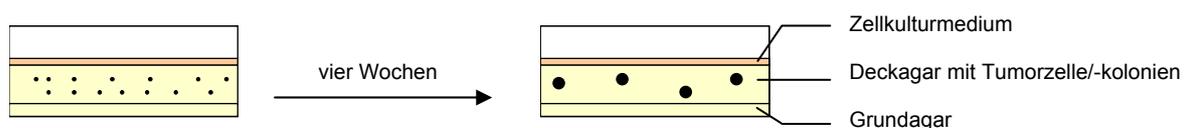
Der *tumor-colony-forming-Assay* wurde eingesetzt, um *in vitro* die Bildung von Tumorkolonien aus Einzelzellen zu analysieren.

1,2 % Deckagar	Agar Agar	1,2 g
	<i>aqua bidest</i>	auf 100 ml

1,5 % Grundagar	Agar Agar <i>aqua bidest</i>	1,5 g auf 100 ml
2× DMEM (pH 7,2)	88 mM NaHCO ₃ 2× DMEM 2 mM L-Glutamin 39 mM D-Glucose 100 µg/ml PS 20 % FCS in <i>aqua bidest</i>	

Der Agar wurde erwärmt und im flüssigen Zustand im Verhältnis von 1:1 mit 2× DMEM vermischt. Die Zellkulturschalen wurden zunächst mit dem 0,75%igen Grundagar beschichtet. Anschließend wurden die Zellen mittels Trypsin von der Zellkulturschale gelöst und gut vereinzelt. Daraufhin wurden $2,2 \times 10^3$ Zellen/cm² mit dem 0,6%igen Deckagar vermischt und auf die Grundagarschicht aufgebracht [Lawrence *et al.*, 1984]. Nach dem Festwerden wurde der Agar mit Zellkulturmedium bedeckt. Dieses wurde regelmäßig erneuert.

Nach vierwöchiger Inkubation wurden Anzahl und Größe der gebildeten Tumorkolonien am Zeiss Axiovert 200M Mikroskop (Zeiss, Jena) analysiert. Dieses war mit einer Spot RT Kamera (Zeiss, Jena) ausgestattet. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der *Metamorph 4.6.5.* Software (Visitron Systems, Puchheim) ausgewertet. Die Anzahl der gebildeten Tumorkolonien wurde pro Zellkulturschale bestimmt und auf die Ausgangszellzahl normiert. Für die Ermittlung der Größe der gebildeten Tumorkolonien wurde der Durchmesser von 100 zufällig ausgewählten Tumorkolonien bestimmt und gemittelt.



2.2.2.7. Zelltodanalyse

Bei der Zelltodanalyse von Zellen unterscheidet man zwei Arten von Zelltod, die Apoptose und die Nekrose (Spätapoptose). Bei der Nekrose gehen die Zellen aufgrund der Permeabilisierung der Zellmembran zugrunde. Der nekrotische Zelltod kann deshalb anhand der Propidiumiodid-Aufnahme in die Zellen analysiert werden. Die Apoptose ist ein programmierter Zelltod. Hierbei bleibt die Zellmembran intakt. Es kommt jedoch zu einer Kondensation des Chromatins, zur Schrumpfung der Zelle und letztlich zur Abschnürung von membranumgrenzten Vesikeln (Abb. 3). Die Chromatin-Kondensation ist mit Hilfe der Hoechst-DNA-Färbung am Mikroskop auswertbar. Der Nachweis des apoptotischen Sterbens der Zellen kann auch anhand der Annexin-V-Färbung der Zellen erfolgen. Hierbei werden

Phosphatidylserine auf der Zelloberfläche detektiert, die von apoptotisch sterbenden Zellen nach außen exponiert werden.

Propidiumiodid-Färbung

Der spät-apoptotische oder nekrotische Zelltod wurde anhand der Aufnahme des DNA-interkalierenden Fluorochroms Propidiumiodid in die Zellen untersucht. Die Zellen wurden mittels Trypsin von der Zellkulturschale gelöst, mit 5 µg/ml Propidiumiodid (in PBS verdünnt) versetzt und sofort am FACS *Calibur Flow Cytometer* (BD Biosciences) analysiert. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 488 nm, die Emission wurde bei 578 nm vermessen. Der Anteil sterbender Zellen wurde mit Hilfe der *CellQuest Pro* Software (BD Biosciences) ausgewertet.

Annexin-V-Färbung

Apoptotisch sterbende Zellen exponieren früh Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche. Dieses Phospholipid wird spezifisch durch Annexin-V gebunden. Nekrotisch sterbende Zellen besitzen ebenfalls Phosphatidylserin. Dieses wird bei der Nekrose jedoch nicht spezifisch nach außen transportiert. Da Annexin-V auch bei nekrotisch sterbenden Zellen Phosphatidylserin bindet, wurden die Zellen zusätzlich mit Propidiumiodid gefärbt. Dieses kann von apoptotisch sterbenden Zellen nicht aufgenommen werden, da diese eine intakte Zellmembran besitzen. Somit waren diese nur einfach positiv für Annexin-V gefärbt.

Die Färbung der behandelten Zellen in Annexin-V-PI-Färbelösung erfolgte für 15 min bei RT. Der Anteil apoptotisch und nekrotisch sterbender Zellen wurde am FACS *Calibur Flow Cytometer* mit der *CellQuest Pro* Software (BD Biosciences) ausgewertet. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 488 nm, die Emission der Fluorochrome wurde bei 578 nm für Propidiumiodid und bei 519 nm für Fluorochrom-gekoppeltes Annexin-V vermessen.

10× Inkubationspuffer (pH 7,4)	100 mM HEPES-NaOH 1,4 M NaCl 50 mM CaCl ₂ ×2 H ₂ O in <i>aqua</i> bidest
Propidiumiodid-Lösung	50 µg/ml Propidiumiodid in 1× Inkubationspuffer
Annexin-V-PI-Färbelösung	1× Fluorochrom-gekoppeltes Annexin-V (Annexin-V-Fluos) 10 µg/ml Propidiumiodid-Lösung 1× Inkubationspuffer in <i>aqua</i> bidest

Hoechst-Färbung

Der apoptotische Zelltod wurde anhand der Kondensation bzw. Fragmentierung des Zellkerns bestimmt. Die Zellen wurden in 70%igem Ethanol fixiert und auf Objektträgern trocknen gelassen. Die getrockneten Objektträger wurden mit 1 µg/ml des Fluorochroms Hoechst 33342 (in 1× PBS verdünnt) gefärbt. Es wurden je 300 Zellen pro Versuch am Zeiss Axiovert 200M Mikroskop (Zeiss, Jena) ausgewertet. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde anhand fragmentierter oder kondensierter Zellkerne bestimmt.

2.2.2.8. Migration von Zellen

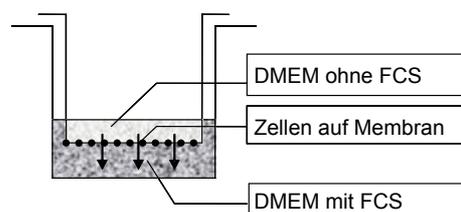
Die Migration der Zellen wurde zum einen mit Hilfe des sogenannten Wundheilungs-Tests untersucht. Zum anderen wurde mit Hilfe von Transwell-Einsätzen die Migrationsfähigkeit von Zellen durch eine permeable Membran überprüft.

in vitro Wundheilungs-Test

Für den Wundheilungs-Test wurde in eine *Monolayer* konfluent gewachsener Zellen mit einer Pipettenspitze eine „Wunde“ (Spalt) gesetzt, um festzustellen, wie gut der Spalt durch die Migration geschlossen wird. Die Zellen wurden daraufhin in FCS-reduziertem-Zellkulturmedium (1% FCS) kultiviert, um zu verhindern, dass sie in den Spalt hinein proliferieren. Die Spaltbreite wurde in regelmäßigen Abständen mit dem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit Spot RT-Kamera und der dazugehörigen *Metamorph* 4.6.5. Software ausgewertet. Der Abstand zwischen den Zellen wurde pro Spalt und Tag an drei verschiedenen Stellen vermessen und gemittelt.

in vitro Transwell-Test

Für den Transwell-Test wurden die Zellen in Zellkultur-Inserts (*ThinCerts*, Frickenhausen) ausgesetzt. Die Inserts bestehen aus einer porösen Membran mit definierter Porengröße von 8 µm. Die Zellkultur-Inserts enthielten FCS-freies Zellkulturmedium. Um die Zellmigration zu stimulieren, wurde das Insert in eine Zellkulturkammer überführt, welche Zellkulturmedium (10% FCS) enthielt. Das Medium in beiden Kammern wurde täglich erneuert. In Abhängigkeit der Zelllinie wurden die Zellen nach entsprechender Kultivierungszeit im Inneren des Transwells mit einem Tupfer entfernt. Die Anzahl migrierter Zellen, die sich sowohl an der Unterseite des Einsatzes als auch am Boden der Zellkulturschale befinden konnten, wurde indirekt mittels alamarBlue® Färbelösung nachgewiesen (s. 2.2.2.3.).



2.2.2.9. *In vitro* Phagozytose-Test [Kask *et al.*, 2004]

Isolierung der Makrophagen

Mononukleäre Zellen wurden aus *Buffy Coats* gewonnen. Die *Buffy Coats* wurden von der Transfusionsmedizin zur Verfügung gestellt und waren mit Blutzellen (weiße und rote Blutkörperchen und Blutplättchen) angereichert. Diese wurde durch die Zentrifugation einer Vollblutspende, welche mit Gerinnungshemmern versetzt worden war, gewonnen.

Die *Buffy Coats* wurden zu gleichen Anteilen mit 1× PBS versetzt. In einer Endkonzentration von 0,6 % (v/v) wurde Dextran hinzugegeben. Das Gemisch wurde für eine Stunde bei RT inkubiert, um die Erythrozyten von den restlichen enthaltenen Blutbestandteilen abzutrennen. Der erythrozytenfreie Überstand wurde daraufhin abgenommen, abzentrifugiert und mit 1× PBS gewaschen. Die in PBS aufgenommenen Zellen wurden auf einen Ficoll-Gradienten mit einer Dichte von 1,077 g/ml überschichtet und bei 500 g für 35 min zentrifugiert. Die mononukleären Zellen aus der Interphase wurden nochmals bei 500 g für 30 min zentrifugiert, in 1× PBS gewaschen und in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/cm² in eine 24 well-Multischale ausgesetzt. Die Zellen wurden im Differenzierungsmedium bei 37 °C in einer 5% CO₂ Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre für 7 d kultiviert. Die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen erfolgte durch den Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF). Nach sieben Tagen wurden die Makrophagen im *in vitro* Phagozytose-Test eingesetzt.

Differenzierungsmedium	25 µg/ml Transferrin
	50 µg/ml Gentamycin
	5 ng/ml GM-CSF
	in RPMI (+ L-Glutamin)

Phagozytose-Test

Apoptotische Zellen werden im Körper zumeist durch Makrophagen erkannt und mittels Phagozytose aus dem Gewebe entfernt, um die Freisetzung intrazellulärer Toxine oder Immunogene zu verhindern.

Die Apoptose von H358-Zellen wurde durch die Behandlung mit 50 µM Etoposid für 48 h induziert. Der apoptotische Zelltod wurde anhand der Annexin-V-Färbung am FACS *Calibur Flow Cytometer* mit der *CellQuest Pro* Software überprüft (s. 2.2.2.7.).

Die auf Phagozytose zu testenden Zellen wurden für 15 min mit 20 µM CFSE markiert. Dieses Fluorochrom wird durch intrazelluläre Esterasen gespalten und fluoresziert im grünen Wellenlängenbereich (Extinktion 488 nm/Emission 492-517 nm). Die so markierten Tumorzellen wurden in einem Verhältnis von 2:1 zu den adhärennten Makrophagen gegeben. In einführenden Untersuchungen wurde der Phagozytose-Test nach 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 24 h gestoppt und ausgewertet. Es zeigte sich, dass nach zweistündiger Inkubation der Tumorzellen mit den Makrophagen die maximale Phagozytose-Rate erreicht wurde. Aus

diesem Grund wurde für weiterführende Studien die Phagozytose nach zwei Stunden vermessen. Hierfür wurde das Zellgemisch gewaschen, um nicht-phagozytierte Tumorzellen zu entfernen. Die adhärente Makrophagenpopulation mit den phagozytierten Tumorzellen wurde dadurch nicht beeinflusst. Die Makrophagen wurden mit 1 % Lidocain (in 1× PBS) von der Zellkulturschale gelöst und anschließend mit Allophycocyanin- (APC-) konjugierten CD11- und CD14-Antikörpern markiert. Diese fluoreszieren im roten Bereich (Extinktion 635 nm/Emission 660 nm). CD11 und CD14 sind spezifische Oberflächenmarker für Monozyten/Makrophagen. Somit konnte die Phagozytose anhand der Doppelfluoreszenz von CFSE (Tumorzellen) und APC (Makrophagen) am FACS *Calibur Flow Cytometer* mit der *CellQuest Pro* Software (BD Biosciences) ausgewertet werden. Tumorzellen, die nicht phagozytiert wurden, zeigen nur eine CFSE-Fluoreszenz und Makrophagen zeigen nur eine APC-Fluoreszenz.

2.2.3. Molekulargenetische Arbeiten mit RNA

Für die Arbeit mit RNA wurde *aqua bidest* mit 0,1 % (v/v) DEPC, welches ein starker Inhibitor von RNasen ist, behandelt, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend autoklaviert.

2.2.3.1. RNA-Isolation mittels RNeasy Mini Kit

Die Isolation der RNA aus humanen Zellen und Gewebe erfolgte nach dem Protokoll des *RNeasy Mini*-Kit. Der DNase-Verdau wurde auf der Säule durchgeführt und die RNA wurde mit 60 µl DEPC-behandeltem H₂O eluiert. Nach der Isolation wurde 1 µg RNA im Agarose-Gel aufgetrennt, um DNA-Kontamination oder Abbau der RNA auszuschließen.

2.2.3.2. RNA- bzw. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der isolierten RNA bzw. DNA wurde am NanoDropTM 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) mit Hilfe der ND-1000 Spectrophotometer Software (v. 3.2.0) bestimmt. Die Nukleinsäuren wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀) vermessen, wobei eine OD von 1,0 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml und einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Durch den Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ können Rückschlüsse auf die Reinheit der Nukleinsäuren gezogen werden. Dieser sollte in einem optimalen Bereich von 1,8 bis 1,9 liegen.

2.2.3.3. Reverse Transkription

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte am Biometra TRIO-Thermoblock (biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) nach dem folgenden Protokoll:

Gesamt-RNA	300 ng
M-MLV RT 5× Buffer	5 µl
Oligo(dT)15 Primer (50ng/µl)	1,5 µl
Random-Primer (30 ng/µl)	1,5 µl
dNTPs (12,5 mM)	1 µl

Dieser Ansatz wurde für 3 min bei 72 °C inkubiert und sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde diesem Ansatz ein Mix aus:

M-MLV Reverse Transcriptase,	
RNase H(-)	0,2 µl
DEPC-behandeltes H ₂ O	ad. 25 µl hinzugefügt.

Die Reverse Transkription erfolgte für 45 min bei 42 °C. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte für 1 min bei 95 °C.

2.2.4. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA

2.2.4.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Analyse der Expression spezifischer Gene, der Amplifikation von DNA-Abschnitten sowie der Analyse von durch Transformation erzeugten Klonen wurden PCR-Reaktionen am Eppendorf *Mastercycler gradient* (Eppendorf AG, Hamburg) durchgeführt.

2.2.4.1.1. Standard-PCR

Für die Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen für analytische Zwecke wurde ein PCR Master-Mix verwendet, der die *Taq*-DNA Polymerase, dNTPs, MgCl₂ und den Reaktionspuffer enthielt. Es wurde hierfür humane cDNA als Template verwendet.

Des Weiteren wurden zur Kontrolle von transformierten Bakterien gereinigte Plasmid-DNA (s. 2.2.4.2.5.) oder DNA aus Bakterienzelllysaten als Template eingesetzt. Einzelne Zellkolonien wurden hierfür in *aqua bidest* 5 min bei 96 °C erhitzt und zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde als Template verwendet.

Reaktionsansatz	2× PCR Master-Mix	12,5 µl
	<i>aqua bidest</i>	9,5 µl
	sense Primer	1 µl
	antisense Primer	1 µl
	Template-DNA	1 µl

PCR-Programm	1)	94 °C	3 min	Denaturierung
	2)	94 °C	30 sec	Denaturierung
	3)	x °C	30 sec	<i>Annealing</i>
	4)	72 °C	1 min	Synthese
	Die Schritte 2-4 wurden in 18-40 Zyklen wiederholt.			
	5)	72 °C	3 min	Nachsynthese

Das Temperaturprotokoll wurde dem jeweiligen Primer-Paar (*Annealing*-Temperatur; Tab. 3) und dem Template (Synthese-Zeit) angepasst. Als Negativ-Kontrolle wurde eine PCR-Reaktion ohne Template mitgeführt.

2.2.4.1.2. Klonierungs-PCR

Die für die Klonierungen erforderlichen DNA-Sequenzen wurden mit der Easy A™ High-Fidelity PCR Cloning-Polymerase amplifiziert. Diese besitzt sowohl eine terminale Transferaseaktivität als auch eine 3'-5'-*proof-reading*-Aktivität. Als Template diente humane cDNA (s. 2.2.3.3.), die aus humaner RNA von bronchialem Tumorgewebe synthetisiert wurde (s. 2.2.3.1.). Als Primer wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Klonierungsprimer verwendet.

Reaktionsansatz	10× Easy A™-Reaktionspuffer	5 µl
	dNTP-Lösung (10 mmol)	1 µl
	Template-cDNA	1 µl
	sense Primer	1 µl
	antisense Primer	1 µl
	Easy A™-Polymerase	0,5 µl
	<i>aqua bidest</i>	40,5 µl

PCR-Programm	1)	95 °C	2 min	Denaturierung
	2)	95 °C	40 sec	Denaturierung
	3)	50 °C	30 sec	<i>Annealing</i>
	4)	72 °C	1 min	Synthese
	Die Schritte 2-4 wurden in 40 Zyklen wiederholt.			
	5)	72 °C	7 min	Nachsynthese

2.2.4.1.3. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der DNA wurde diese entsprechend ihrer Größe in 1,5 % (w/v) (bei großen Fragmenten) bis 3 % (w/v) (bei kleinen Fragmenten) Agarosegelen aufgetrennt. Die Agarosegele enthielten 0,5 mg/ml Ethidiumbromid. Die Gelelektrophorese erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern (ReadySub-Cell GT Cells, Bio-Rad, München) in 1× TAE-Laufpuffer bei ca. 80-110 V (Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen).

50× TAE-Puffer (pH 8,0)	2 M Tris-HCl 5,71 % Essigsäure 50 mM Na ₂ EDTA in <i>aqua</i> bidest
-------------------------	--

Die aufzutragenden Proben wurden mit Orange G-Probenpuffer versetzt. Der 100 bp-DNA-Größenmarker bzw. der 1 kb-DNA-Größenmarker wurden ebenfalls im Gel aufgetragen, um die Größe linearer DNA-Fragmente bestimmen zu können. Die DNA-Banden wurden am LAS3000 *Computer based imaging* System (FujiFilm, Tokio, Japan) detektiert und mit Hilfe der AIDA3.5 Software (Raytest, Straubenhardt) ausgewertet.

Orange G-Probenpuffer	50 % Glycerin 0,05 % Orange G in <i>aqua</i> bidest
-----------------------	---

2.2.4.1.4. Real-Time-PCR

Für die quantitative Analyse der Genexpression wurde die Real-Time-PCR eingesetzt. Externe Standards wurden zuvor mit den Gen-spezifischen Primern amplifiziert, aufgereinigt und quantifiziert. In einer Konzentrationsreihe wurden diese in jeder Real-Time-PCR zeitgleich mit den Proben amplifiziert. Anhand der Standardamplifikationen konnte die cDNA-Konzentration der Proben ermittelt werden. Die Real-Time-PCR wurde am *iCycler* iQ™ System (Bio-Rad, München) durchgeführt. Die Amplifikationskurven wurden mit Hilfe der *iCycler* iQ Software *for SNP* (Bio-Rad, München) ausgewertet. Die Quantifizierung basiert auf der Fluoreszenz-Messung von *SYBR Green*. Dieses fluoresziert nach dem Einbau in doppelsträngige DNA und dient als Parameter für die cDNA-Amplifikation.

Reaktionsansatz	RNase-freies <i>aqua</i> bidest	9,5 µl
	2× iQ <i>SYBR Green</i> -PCR Master-Mix	12,5 µl
	sense Primer	1 µl
	antisense Primer	1 µl
	cDNA-Template	1 µl

PCR-Programm	1)	95 °C	2 min	Denaturierung
	2)	95 °C	20 sec	Denaturierung
	3)	x °C	20 sec	<i>Annealing</i>
	4)	72 °C	30 sec	Synthese
	Die Schritte 2-4 wurden in 40-50 Zyklen wiederholt.			
	5)	72 °C	2 min	Nachsynthese

Die *Annaeling*-Temperatur war abhängig von der Schmelztemperatur der Primer (Tab. 3). Die Fluoreszenz von *SYBR Green* wurde nach der Synthese-Phase (Schritt 4) gemessen.

Für jede PCR wurde anschließend eine Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte erstellt, um die Spezifität der Primerbindung zu überprüfen. Die Temperatur wurde hierfür um jeweils 0,5 °C von 60 °C auf 100 °C erhöht. Während dieser gleichmäßigen Temperaturerhöhung wurde die Fluoreszenz von *SYBR Green* gemessen.

2.2.4.2. DNA-Mikroarray

In dem *High Density* Oligonukleotid-Mikroarray wurde die Expression von ca. 54 000 humanen Gensequenzen untersucht. Die Gen-Chips umfassen ungefähr 47 000 mRNA-Transkripte, von denen 38 500 gut charakterisierte Gene sind. Zusätzlich können 9 900 *expressed sequence tags* (ESTs) analysiert werden, von denen allerdings noch keine Funktion bekannt ist.

Für den DNA-Mikroarray wurde RNA aus Geweben oder Zellen isoliert (s. 2.2.3.1.) und vermessen (s. 2.2.3.2.). Für die Untersuchung der Gen-Expression wurden 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die weitere Analyse (Erststrang- und Zweitstrang-cDNA-Synthese, *in vitro* Transkription in cRNA und deren Biotinmarkierung, Fragmentierung der cRNA und Hybridisierung mit den Gen-Chips, Biotin-Nachweis und densitometrische Analyse) wurde am ZMG (Zentrum für medizinische Grundlagenforschung) von Herrn Dr. Christov durchgeführt. Die Mikroarray-Analyse erfolgte entsprechend dem One-Cycle Gen-Chip-Protokoll (Affymetrix, USA). Es wurde der *GeneChip*[®] *Human Genome* U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, USA) verwendet.

2.2.4.3. Klonierung von DNA

2.2.4.3.1. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion der DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl (analytisch) bis 150 µl (präparativ). Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller mitgelieferten Puffer. Pro 1 µg DNA wurden 1-5 U Restriktionsendonuklease zugegeben. Der Restriktionsansatz wurde für mindestens 3 h bei 37 °C inkubiert.

Nach Überprüfung auf vollständige Spaltung mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.4.1.3.) wurden die Nukleasen durch Inkubation bei 70 °C für 10 min hitzeinaktiviert oder mit Hilfe des *MinElute*[®] *PCR Purification*-Kit entfernt.

2.2.4.3.2. Reinigung und Konzentrierung von PCR-Produkten und DNA

Die Reinigung präparativ amplifizierter PCR-Produkte und präparativer Restriktionsprodukte erfolgte mit dem *MinElute*[®] *PCR Purification*-Kit. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren und die DNA anschließend mit 30 µl *aqua bidest* eluiert.

2.2.4.3.3. Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Für die Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde *low melting*-Agarose verwendet. Die zu präparierenden DNA-Fragmente wurden in dem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt (s. 2.2.4.1.3.). Das entsprechende Fragment wurde unter UV-Licht (320 nm) auf dem Transilluminator (Biometra, Göttingen) aus dem Gel herausgeschnitten. Unter Anwendung des Protokolls des *MinElute Gel Extraction*-Kit konnte das Fragment aus dem Agaroseblock isoliert werden.

2.2.4.3.4. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von PCR-Produkten in den *pDrive Cloning*-Vektor erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Der *pDrive Cloning*-Vektor verfügt über einen Uracil-Überhang und kann mit dem in der Klonierungs-PCR (s. 2.2.4.1.2.) erzeugten Adenosin-Überhang hybridisieren.

Die Ligation in die Vektoren pEGFP-C1 oder pcDNA3.1(+) wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung für Ligationen erfolgte durch direkten Vergleich der miteinander zu ligierenden Fragmente im Agarose-Gel (s. 2.2.4.1.3.). Das Konzentrationsverhältnis von Vektor-DNA zu Fragment-DNA betrug 1:3. Die Vektor-DNA und die Fragment-DNA wurden mit 2 µl 10× Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase für 2-3 Tage bei 4 °C inkubiert.

2.2.4.3.5. Plasmidisolation

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden sowohl der *QIAprep Spin Miniprep*-Kit als auch der *EndoFree Plasmid Mega*-Kit eingesetzt. Eine Übernachtskultur von *E. coli* wurde bei 10 000 g in einer Hereaus[®] Biofuge *fresco* oder Hereaus[®] Biofuge *stratos* (Schütt Labortechnik, Göttingen) pelletiert. Die weitere Präparation der Plasmid-DNA aus dem Zellpellet erfolgte entsprechend des Hersteller-Protokolls. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert. Die Plasmid-DNA wurde zur Sequenzierung (s. 2.2.4.3.6.), zur präparativen Restriktion (s. 2.2.4.3.1.) und zur Transfektion (s. 2.2.2.2.) eingesetzt.

2.2.4.3.6. Sequenzreaktion

Die Sequenzierung diente der Überprüfung der generierten Plasmide. Für die Sequenzreaktion wurde der *BigDye*[®] Terminator v1.1 *Cycle Sequencing*-Kit verwendet.

Sequenzreaktion	<i>Ready Reaction PreMix</i>	4 µl
	<i>Big Dye Sequencing</i> -Puffer	2 µl
	Primer	2 µl
	DNA-Template	1 µl
	<i>aqua bidest</i>	11 µl

PCR-Programm	1)	96 °C	1 min	Denaturierung
	2)	96 °C	1 min	Denaturierung
	3)	56-68 °C	30 sec	<i>Annealing</i>
	4)	60 °C	4 min	Synthese

Die Schritte 2-4 wurden in 50 Zyklen wiederholt.

Die *Annealing*-Temperatur war abhängig von der Schmelztemperatur der Primer (Tab. 3). Die Sequenzreaktion wurde zur Aufreinigung nach folgendem Protokoll gefällt:

Sequenzreaktion	20 µl
<i>aqua bidest</i>	20 µl
250 mM Na ₂ EDTA	1 µl
3 M Natriumacetat (pH 5,2)	4 µl
96 % Ethanol	60 µl
➔	20 min bei 10 000 g zentrifugieren
Überstand abnehmen	
70 % Ethanol	500 µl
➔	5 min bei 10 000 g zentrifugieren
Überstand vorsichtig abnehmen	

Das Pellet wurde in dem *Concentrator 5301* (Eppendorf, Hamburg) Vakuum-getrocknet und bis zur Sequenzierung bei -20 °C gelagert. Die Sequenzierung wurde am ZMG von Frau Dr. Darmer am ABI PRISM[®] 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Warrington, UK) mittels Kapillar-Elektrophorese durchgeführt und beruht auf dem Prinzip der *Multicolour-Fluoreszenz-Analyse* markierter Polynukleotide. Die Sequenzdaten wurden mit der ABI PRISM[®] 3100 *Genetic Analyzer* Software (Applied Biosystems, Warrington, UK) und unter Anwendung von Chromas (Version 1.62) ausgewertet.

2.2.5. Kultivierungsbedingungen für Bakterienkulturen

2.2.5.1. Anzucht der *E. coli*-Kulturen

Nährmedien für *E. coli*-Kulturen

LB-Nähragar	LB-Agar	37 g
	<i>aqua bidest</i>	ad 1 l
LB-Flüssigmedium	Luria Broth	25 g
	<i>aqua bidest</i>	ad 1 l

Die Nährmedien wurden bei 121 °C und 2 bar für 15 min autoklaviert.

Medienzusätze

Ampicillin	125 mg/l
Kanamycin	25 mg/l
IPTG	48 mg/l
X-Gal	40 mg/l

Die X-Gal-Stammlösung wurde in Dimethylformamid gelöst. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei -20 °C und wurde den sterilen Medien in der angegebenen Konzentration zugesetzt.

Die *E. coli*-Kulturen wurden aerob in/auf LB-Medium bei 37 °C angezogen. Die Flüssigkulturen wurden in einem Schüttelinkubator (Certomat[®], B.Braun Biotech, Melsungen) bei 200 rpm angezogen. Das Zellwachstum wurde als Optische Dichte (OD₆₀₀) mit einem DU[®] 800 Spektrophotometer (Beckman Coulter, Krefeld) gegen unbeimpftes Medium gemessen. Die Anzucht der *E. coli*-Kultur auf Nähragar erfolgte über Nacht im Heraeus[®] Wärmeinkubator (Schütt Labortechnik, Göttingen).

2.2.5.2. Transformation und Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone

Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode [Mandel & Higa, 1970]. Über Nacht wurde eine Vorkultur des *E. coli* Stammes Top F' 10 angezogen. Diese Kultur wurde in frischem 50 ml LB-Medium 1:100 verdünnt und bei 37 °C bis zu einer Optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,3 kultiviert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und in ein steriles, vorgekühltes 50 ml-Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 3000 g und 4 °C in einer Heraeus[®] Biofuge *stratos* (Schütt Labortechnik, Göttingen) wurde das Pellet in 10 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und bis zur Transformation auf Eis gestellt. Nicht verwendete kompetente Zellen wurden in sterilem 25 %igen Glycerin (v/v) bei -80 °C gelagert.

Transformation

Die Transformation wurde nach Sambrook *et al.* (1989) [Sambrook *et al.*, 1989] durchgeführt. Je 100-200 µl kompetente Zellen wurden mit der Plasmid-DNA gemischt und ca. 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem folgenden Hitzeschock von 90 sec bei 42 °C im Wasserbad wurde der Ansatz für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 0,4-0,8 ml LB-Medium wurden die transformierten *E. coli*-Zellen für 45 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde ein Teil des Ansatzes auf Selektionsagar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone

Plasmidvektoren enthalten unterschiedliche Antibiotika-Resistenz-Kassetten. Nach der Transformation in die Bakterienzelle können diese auf die jeweilige Antibiotikaresistenz selektiert werden. Zu diesem Zweck wurden den Nährmedien 125 mg/l Ampicillin oder 25 mg/l Kanamycin zugegeben.

Bei rekombinanten Klonen, die durch den Test auf α -Komplementation identifiziert werden konnten, wurde den Selektionsplatten der künstliche Induktor IPTG und das chromogene Substrat X-Gal zugegeben (s. 2.2.5.1). Dem Selektionsprinzip liegt die Aufhebung der α -Komplementation der β -Galaktosidase zugrunde. Durch die im Plasmid integrierte Fremd-DNA und dem damit verbundenen Verlust der Fähigkeit zur Bildung des Indigo-Farbstoffes aus X-Gal konnten weiße Bakterien-Kolonien selektiert werden.

2.2.5.3. Stammhaltung

Von Bakterienstämmen mit neu konstruierten Plasmiden wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde die jeweilige Bakterien-Kultur in der spätexponentiellen Wachstumsphase geerntet und in 25 % sterilem Glycerin bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.2.6. Proteinbiochemische Methoden

2.2.6.1. Immuno-Blot

2.2.6.1.1. Proteinpräparation

Die Gesamt-Proteine wurden sowohl aus Gewebe als auch aus Zellen mit $1\times$ Lysepuffer extrahiert. Um den Protein-Abbau zu verhindern, wurden $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ Protease Inhibitor Cocktail frisch zum Lysepuffer gegeben. Zusätzlich wurden $10\text{ }\mu\text{M}$ Na_3VO_4 und 1 nM Okadainsäure als Phosphatasehemmer eingesetzt.

$1\times$ Lysepuffer (pH 6,8)	10 mM HEPES/NaOH
	150 mM NaCl
	1 mM Na_2EDTA
	2 % SDS
	in <i>aqua</i> bidest

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte nach Protokoll des BCATM Protein Assay-Kits. Der Ansatz wurde für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. In Abhängigkeit des Proteingehalts wird Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert. Die Farbreaktion findet dann aufgrund der Reaktion des BCA mit dem Kupfer-Kation statt und konnte bei einer Absorption von 562 nm am FLUOstar OPTIMA Mikroplatten-Reader (BMG Labtechnologies, Offenburg) vermessen werden. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer gleichzeitig gemessenen Konzentrationsreihe einer BSA-Lösung.

2.2.6.1.2. SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Puffer und Lösungen

4× Ladepuffer (pH 6,8)	40 % Glycerin 20 % 2-Mercaptoethanol 4 mM Na ₂ EDTA 8 % SDS 500 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,01 % Bromphenolblau
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	1 M Tris-HCl in <i>aqua</i> bidest
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris-HCl in <i>aqua</i> bidest
10× Laufpuffer (pH 8,8)	125 mM Tris 950 mM Glycin 1 % SDS in <i>aqua</i> bidest

Die Proteinlysate wurden nach der Vermessung mit 4× Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Proteine wurden daraufhin in einer Konzentration von 20 – 40 µg zusammen mit einem Proteinmarker auf ein SDS-PAA-Gel geladen. Für die Auftrennung der Proteine wurden lineare SDS-Polyacrylamid-Gele nach Laemmli [Laemmli, 1970] hergestellt (Tab. 5) und verwendet. In dem 5%igen Sammelgel wurden die Proben konzentriert, um im Trenngel aufgetrennt zu werden. Je nach Größe der Proteine kamen 7,5 bis 15%ige Trenngele zum Einsatz (Tab. 5). Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der *Mini-Protean*[®] 2-D *Electrophoresis Cell* (Bio-Rad, München) bei einer konstanten Spannung von 120 V.

Tab. 5: Zusammensetzung für zwei SDS-Polyacrylamid-Gelen

	Sammelgel		Trenngel		
	5 %	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %
<i>aqua</i> bidest	4,5 ml	6,3 ml	5,35 ml	4,4 ml	3,47 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (40 %)	1,5 ml	2,8 ml	3,75 ml	4,7 ml	5,63 ml
Trenngelpuffer		5,63 ml	5,63 ml	5,63 ml	5,63 ml
Sammelgelpuffer	1,5 ml				
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
APS (40 %)	12,5 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Total	7,5 ml	14,8 ml	14,8 ml	14,8 ml	14,8 ml

2.2.6.1.3. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot)

Puffer und Lösungen

CAPS-Blotpuffer (pH 10,0) 50 mM CAPS
 1 mM 3-Mercaptopropionsäure
 10 % Methanol
 in *aqua* bidest

Waschlösungen (TBS-T 150 / 300 / 500) (pH 7,5)
 50 mM Tris-HCl
 150/300/500 mM NaCl
 0,15 % Tween 20
 in *aqua* bidest

Luminol-Detektions-Lösung 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0)
 0,025 % H₂O₂
 198 µM p-Cumarsäure
 1,3 mM Luminol

Das Blotpapier, die Membran und das Gel wurden mit CAPS-Blotpuffer äquilibriert und der Blot wurde luftblasenfrei zusammengebaut. Der Protein-Transfer aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel erfolgte auf eine Protran Nitrocellulose-Transfer-Membran (Whatman GmbH, Dassel) in einer *Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad, München) bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm² Membran. Die Blotzeit war von der Größe der zu untersuchenden Proteine abhängig (45-60 min).

Nach dem Protein-Transfer erfolgte die Blockierung der Membran für 1 h in einer 5%igen-BSA-TBS-T 500-Lösung. Nach zweimaligem Waschen mit TBS-T 500 erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C. Der primäre Antikörper wurde in TBS-T 150 mit 0,02 % Natriumazid nach Angaben des Herstellers verdünnt.

Am nächsten Tag wurde die Membran nach 30 min Waschen mit TBS-T 500 für 1 h mit dem spezifischen sekundären Antikörper inkubiert. Dieser wurde 1:10 000 in TBS-T 150 verdünnt. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Membran nochmals 30 min mit TBS-T 500 gewaschen.

Die sekundären Antikörper waren mit der *horse radish*-Peroxidase (HRP) gekoppelt und konnten mittels Chemilumineszenz-Nachweis detektiert werden. Für den Chemilumineszenz-Nachweis wurde die Luminol-Detektions-Lösung verwendet. Die Detektion der Proteine erfolgte am LAS3000 *computer based imaging* System (FujiFilm, Tokio, Japan) mit Hilfe der AIDA3.5 Software (Raytest, Straubenhardt).

2.2.6.2. Immunpräzipitation (IP)

Die Immunpräzipitation wurde durchgeführt, um mögliche Bindungspartner von Proteinen nachweisen zu können. Das zu untersuchende Protein wurde zunächst mit spezifischen Antikörpern und Protein A-Agarose aus dem Zellysate präzipitiert. Das Präzipitat wurde im SDS-Polyacrylamid-Gel (s. 2.2.6.1.2.) aufgetrennt. Die Bindungspartner konnten dann mit Hilfe eines weiteren Antikörpers im Immuno-Blot (s. 2.2.6.1.3.) nachgewiesen werden.

Puffer und Lösungen nach Whiteman *et al.* [Whiteman *et al.*, 2007]

CRB 300 (Lysepuffer)	20 mM Tris (pH 8,0) 0,5 % Mercaptoethanol 5 mM CaCl ₂ 300 mM NaCl 0,5 % Nonidet P40 1:100 Protease-Inhibitor in <i>aqua bidest</i>
----------------------	---

CRB 100 (Waschpuffer)	20 mM Tris (pH 8,0) 0,5 % Mercaptoethanol 5 mM CaCl ₂ 100 mM NaCl 0,5 % Nonidet P40 1:100 Protease-Inhibitor in <i>aqua bidest</i>
-----------------------	---

Die Zellen wurden mit CRB 300-Lysepuffer aufgeschlossen. Das Gesamtlisat wurde 10 min bei 20 000 g zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Proteingehalt des Überstandes wurde bestimmt und 100 µg Protein wurden in die Immunpräzipitation (IP) eingesetzt.

IP-Reaktionsansatz	Protein	100 µg
	CRB 100-Puffer	100 µl
	<i>aqua bidest</i>	ad 200 µl
	Protease-Inhibitor	1-2 µl
	primärer Antikörper	1 µg

Der IP-Reaktionsansatz wurde rotierend bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden 25 µl Protein A-Agarose pro Ansatz mehrmals mit CRB 100-Puffer gewaschen und in 50 µl CRB 100-Puffer pro Ansatz aufgenommen. Die gewaschene Protein A-Agarose wurde zusammen mit dem IP-Reaktionsansatz rotierend bei 4 °C inkubiert. Nach 3 h wurde dieser Ansatz mit CRB 100-Puffer gewaschen und 1 min bei 14 000 g zentrifugiert, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die IP wurde dann in 1× Probenpuffer aufgenommen und konnte nach 5 min bei 70 °C im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden (s. 2.2.6.1.2.).

2.2.6.3. Präparation von Zellkern und Zellplasma (Zellfraktionierung)

Zellkern und Zellplasma wurden separiert, um Rückschlüsse auf die Lokalisierung bestimmter Proteine in der Zelle ziehen zu können. Die einzelnen Zellfraktionen wurden dann im SDS-Polyacrylamid-Gel (s. 2.2.6.1.2.) aufgetrennt und das Protein nach Immuno-Blot (s. 2.2.6.1.3.) abhängig von der Fraktion detektiert.

Puffer und Lösungen

Nukleus Puffer (NP)	10 mM HEPES-NaOH (pH 7,4) 250 mM Sucrose 10 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 10 µM Cytochalasin B in <i>aqua</i> bidest
Lysepuffer	10 M Tris-HCl (pH 7,4) 0,5 % Triton X-100 0,5 % SDS in <i>aqua</i> bidest

Die Zellen wurden in der Zellkultur zunächst für 30 min mit 20 µM Cytochalasin B inkubiert, um das Zytoskelett vom Zellkern zu lösen. Die Zellen wurden danach mit 1× PBS und mit NP-Puffer gewaschen und mit NP-Puffer von der Zellkulturschale gelöst. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit einer 25 G-Kanüle (B. Braun, Melsungen) aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde bei 1000 g für 5 min in der Hereaus[®] Biofuge *fresco* (Schütt Labortechnik, Göttingen) zentrifugiert und der zytoplasmahaltige Überstand abgenommen. Das zellkernhaltige Pellet wurde über einen Sucrose-Gradienten gereinigt. Das Pellet wurde hierfür in NP-Puffer aufgenommen und über 30% Sucrose geschichtet. Der Sucrose-Gradient wurde bei 200 g und 4 °C für 10 min in der Hereaus[®] Biofuge *stratos* (Schütt Labortechnik, Göttingen) zentrifugiert. Das hierbei gewonnene Kernpellet wurde zweimal mit NP-Puffer gewaschen und in Lysepuffer aufgenommen. Die DNA im Kernlysate wurde durch die Inkubation mit 100 U Benzonase für 10 min bei 37 °C verdaut. Das Enzym wurde bei 70 °C inaktiviert.

2.2.6.4. Zymographie

In der Zymographie wurde der Substratverdau von Gelatine durch Gelatinasen im Gel nachgewiesen. Die Gelatinasen gehören zur Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs). MMPs sind löslich oder membrangebunden und können extrazelluläre Matrixkomponenten (Kollagen, Fibronectin, Laminin, Gelatine usw.) verdauen.

Puffer und Lösungen

Probenpuffer	0,4 M Tris-HCl (pH 6.8) 5 % SDS 20 % Glycerin 0,03 % Bromphenolblau in <i>aqua</i> bidest
Waschpuffer	2,5 % Triton X 100 in <i>aqua</i> bidest
Zymographie-Puffer	0,15 M NaCl 5 mM CaCl ₂ 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0,05 % NaN ₃ 0,05 % Brij35 in <i>aqua</i> bidest
Coomassie Brilliant Blue G-250-Färbung	
Färbe-Lösung	0,05 % Coomassie G-250 50 % Methanol 10 % Eisessig in <i>aqua</i> bidest
Entfärber-Lösung	5 % Methanol 1 % Eisessig in <i>aqua</i> bidest

Für die Zymographie wurde Medium aus dem Zellkulturüberstand ohne FCS mit Probenpuffer versetzt und in einem 12,5%igen modifizierten SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Diese Gele enthielten im Trenngel zusätzlich 2 mg/ml Gelatine. Die Proteine wurden bei 130 V und 4 °C aufgetrennt.

Die Gele wurden anschließend mehrmals mit Waschpuffer gewaschen, um das SDS zu entfernen. Es folgte eine 24-stündige Inkubation in Zymographie-Puffer, während die im Gel enthaltene Gelatine von renaturierten MMPs verdaut wurde. Nach dieser Inkubation wurde das Gel mit Färbe-Lösung gefärbt. An den Stellen im Gel, an denen die Gelatine verdaut wurde, konnte das Gel mit Entfärber-Lösung wieder entfärbt werden. Die Gele wurden am LAS3000 *computer based imaging* System (FujiFilm, Tokio, Japan) mit Hilfe der AIDA3.5 Software (Raytest, Straubenhardt) ausgewertet.

2.2.6.5. Immunzytochemie

Für die Antikörperfärbung von Zellen wurden diese zunächst auf einem sterilen Deckglas (Menzel-Gläser, Braunschweig) ausgesetzt. Nach eintägiger Kultivierung wurden die Zellen für 30 min bei RT mit 2 % Formaldehydlösung (in 1× PBS) fixiert. Nach dem Waschen mit 1× PBS erfolgte eine einstündige Blockierung der Zellen mit 5 % Ziegen Serum und gleichzeitiger Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,5 % Triton X-100 in 1× PBS. Die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Danach wurden die Zellen gewaschen und für 30 min bei RT mit dem entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörper (Alexa Fluor[®], 1:4000 in PBS) inkubiert.

Durch eine 10-minütige Inkubation mit 1 µg/ml DAPI (in 1× PBS) konnte zusätzlich der Zellkern gefärbt werden. Die Deckgläser wurden in Glycergel[®] Eindeck-Medium eingebettet und am Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit der Spot RT Kamera aufgenommen. Mit der dazugehörigen *Metamorph* 4.6.5. Software wurden die Bilder ausgewertet.

2.2.6.6. Immunhistochemie

Die Antikörperfärbung von Gewebeschnitten wurde am Institut für Pathologie von Herrn Dr. Schmitt durchgeführt. Hierfür wurden Paraffinschnitte von ausgewählten bronchialen Tumorgeweben und normalen Bronchialgeweben mit dem Primärantikörper Anti-human S100P inkubiert. Die Detektion von S100P erfolgte dann durch die Bindung des sekundären Antikörpers, an den das Peroxidase-Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) gekoppelt war. DAB bildet ein in Alkohol unlösliches braunes Endprodukt, welches am Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit der Spot RT Kamera detektiert und aufgenommen wurde. Die Paraffinschnitte waren zusätzlich mit Hämalaun (Blaufärbung der Zellkerne) gefärbt, um die Lokalisierung von S100P besser bestimmen zu können.

2.2.7. Statistik

Die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen wurden als absolute Daten oder als relative Veränderung im Vergleich zu den Kontrolldaten angegeben. Die Ergebnisse der einzelnen Experimente sind als Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit Hilfe des Computerprogrammes MS Excel. Signifikanzanalysen wurden mit dem Student's t-Test durchgeführt. Eine signifikante Veränderung ist durch * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Expressionsanalyse von S100P

Die basale mRNA-Expression von S100P wurde im Vergleich zu potentiellen Interaktionspartnern von S100P (S100A1, S100Z, RAGE) und zu anderen tumorrelevanten S100-Proteinen (S100A2, S100A4, S100A8, S100A9) in verschiedenen humanen Karzinomzelllinien und weiteren Zellen bzw. Geweben untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von S100P und anderen S100-Proteinen nach der Behandlung mit verschiedenen zytotoxischen Agenzien analysiert. Der Einfluss der MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 auf die mRNA-Expression von S100P wurde unter Verwendung spezifischer Inhibitoren für die entsprechenden MAP-Kinase-Signalwege überprüft. Als Expression wurde der momentane Gehalt an mRNA oder Protein in der Zelle bezeichnet, der durch den Abbau und die Neusynthese gekennzeichnet ist.

3.1.1. Die basale Expression verschiedener tumorrelevanter S100-Proteine

Die mRNA-Expression von S100-Proteinen und RAGE wurde mittels semiquantitativer RT-PCR in den humanen Bronchialkarzinom-Zelllinien H358, H322 und A549 sowie der humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie Panc-1, in Bronchialkarzinomgeweben und Normallungengewebe sowie in Blutpräparationen analysiert. Die Pankreaskarzinom-Zelllinie wurde vergleichend in diesen Untersuchungen eingesetzt, da ein Großteil bisheriger Erkenntnisse über S100P durch Studien an Panc-1-Zellen gewonnen worden sind [Arumugam *et al.*, 2004; Arumugam *et al.*, 2005]. Da einige S100-Proteine (S100A8, S100A9) als Phagozyten-spezifisch bekannt sind [Roth *et al.*, 2003], dienten isolierte Monozyten und Gesamt-Blut als Referenzkontrolle.

Die Abb. 9 zeigt, dass die mRNA von S100P ebenso wie von S100A1, S100A4 und S100A9 in allen untersuchten Karzinomzelllinien sowie im Bronchialkarzinom- und Normallungengewebe nachweisbar war. Eine mRNA-Expression von S100A2 konnte hingegen nur für die Bronchialkarzinom-Zelllinien H322 und H358, für Panc-1 und für das Bronchialkarzinomgewebe gezeigt werden. Für S100A8 und S100Z konnte die mRNA hauptsächlich in den Gewebeproben und den Blutpräparationen amplifiziert werden. Die RAGE-mRNA wurde in allen untersuchten Proben amplifiziert, wobei eine sehr starke Expression im Normallungengewebe detektiert wurde.

mRNA	A549	H322	H358	Panc-1	Normallunge	Bronchial- karzinom	Gesamt-Blut	Monozyten	Fragment- größe [bp]
S100P	—	—	—	—	—	—	—	—	383
S100A1 ^a	—	—	—	—	—	—	—	—	313
S100A2	—	—	—	—	—	—	—	—	259
S100A4	—	—	—	—	—	—	—	—	341
S100A8	—	—	—	—	—	—	—	—	193
S100A9	—	—	—	—	—	—	—	—	109
S100Z ^a	—	—	—	—	—	—	—	—	450
RAGE ^a	—	—	—	—	—	—	—	—	326
18S-rRNA	—	—	—	—	—	—	—	—	345

Abb. 9 Die mRNA-Expression von S100P, seiner Interaktionspartner und anderer tumorrelevanter S100-Proteine in humanen Karzinomzelllinien und Geweben

Die mRNA-Expression von S100P, weiteren ausgewählten S100-Proteinen und RAGE (^a-Interaktionspartner von S100P) wurde in Bronchialkarzinom-Zelllinien (A549, H322, H358), in der Pankreaskarzinom-Zelllinie Panc-1, in einem Mix aus 16 unabhängigen Normallungen- bzw. Bronchialkarzinomgeweben, sowie in Gesamt-Blut und isolierten Monozyten mittels RT-PCR untersucht. Als PCR-Kontrolle wurde die 18S-rRNA amplifiziert. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

3.1.2. Die Expression von S100P unter dem Einfluss verschiedener zytotoxischer Agenzien

Die Ursachen für häufig auftretende Resistenzen gegenüber der Chemotherapie-Behandlung in Tumorerkrankungen sind zum Teil noch unbekannt. Da die S100-Proteine auch in der Vermittlung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika beteiligt sind [Bertram *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2008], sollte zunächst der Einfluss der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien auf die Expression von S100P und anderen tumorrelevanten S100-Proteinen in der bronchialen Adenokarzinom-Zelllinie H358 untersucht werden.

3.1.2.1. Zelltodinduktion durch die Behandlung mit zytotoxischen Agenzien

Für die Expressionsanalysen in Folge der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien war es zunächst erforderlich, den konzentrationsabhängigen Zelltod von H358-Zellen zu untersuchen. Aufgrund ihrer verschiedenen Wirkspektren wurden sowohl klinisch verwendete (Cisplatin, Etoposid, Paclitaxel) als auch experimentell verwendete (CGP 74514A, MG-132) zytotoxische Agenzien in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Nach 48-stündiger Inkubation wurden der nekrotische Zelltod anhand der Propidiumiodid-Aufnahme und der apoptotische Zelltod anhand der fragmentierten Zellkern-DNA ausgewertet. Da auch in der

Spätapoptose die Zellmembran permeabel wird, kann bei spätapoptotischen Zellen der apoptotische und der nekrotische Zelltod detektiert werden.

Die Wirkweise der einzelnen zytotoxischen Agenzien ist in Tabelle 6 angegeben. Paclitaxel induzierte einen überwiegend apoptotischen Zelltod. Die anderen verwendeten zytotoxischen Agenzien verursachten konzentrationsabhängig Apoptose und Nekrose (Tab. 6).

Tab. 6: Zelltodanalyse von H358-Zellen nach 48 h-Behandlung mit zytotoxischen Agenzien

zytotox. Agenzien	Wirkung	Konzentration	Apoptose [%]	Nekrose [%]
Kontrolle			2,1 ± 0,3	3,3 ± 0,2
CGP 74514A	Cyclin-Dependent Kinase (CDK)-1- Inhibitor	5 µM	5,5 ± 1,2	3,6 ± 0,4
		10 µM ^a	34 ± 4,3**	23 ± 2,0**
		15 µM	59 ± 5,0**	40 ± 2,1**
Cisplatin	DNA-interagierender Komplex	50 µM	18 ± 2,1**	13 ± 1,7**
		100 µM ^a	50 ± 4,2**	26 ± 3,1**
		200 µM	56 ± 4,9**	36 ± 3,1**
Etoposid	Topoisomerase II- Inhibitor	7,5 µM	7,2 ± 1,3**	3,2 ± 0,3
		15 µM	12 ± 1,2**	11 ± 0,8**
		30 µM ^a	23 ± 1,9**	18 ± 0,8**
MG-132	Proteasom-Inhibitor	10 µM ^a	74 ± 5,3**	49 ± 1,3**
		20 µM	72 ± 5,9**	45 ± 1,3**
		40 µM	65 ± 7,3**	43 ± 1,4**
Paclitaxel	Mikrotubuli- interagierendes Agenz	5 nM ^a	79 ± 2,5**	4,5 ± 0,6*
		10 nM	88 ± 1,1**	8,0 ± 1,6**
		20 nM	91 ± 0,9**	14 ± 2,3**

Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardfehler (n=3) mit * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ vs. unbehandelte Kontrolle.

^aDiese Konzentrationen wurden zur Behandlung von H358-Zellen für die S100-Expressionsanalyse eingesetzt.

3.1.2.2. Einfluss der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien auf die Expression von S100-Proteinen

Die Untersuchung der mRNA-Expression von S100P und der tumorrelevanten S100-Proteine S100A2, S100A4 und S100A9 unter dem Einfluss zytotoxischer Agenzien erfolgte mit den niedrigsten Konzentrationen von MG-132 und Paclitaxel bzw. mit Konzentrationen, die mit CGP 74514A, Cisplatin und Etoposid in den Zelltodanalysen nur einen moderaten Zelltod zeigten (Tab. 6). Um die mRNA-Expression in der initialen Phase des Zelltodes analysieren zu können, wurden die H358-Zellen nur für 24 h behandelt.

Die semiquantitativen RT-PCR-Analysen zeigten eine Beeinflussung der mRNA-Expression der untersuchten S100-Proteine nach der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien

(Abb. 10). Die mRNA-Expression von S100P war durch die Behandlung mit Etoposid bzw. MG-132 stark erhöht und durch die Behandlung mit Cisplatin leicht vermindert. Ein ähnliches Expressionsverhalten unter dem Einfluss zytotoxischer Agenzien konnte für die anderen analysierten S100-Proteine nicht gezeigt werden. Im Gegensatz zu S100P war die mRNA-Expression von S100A2 durch die Behandlung der Zellen mit CGP 74514A bzw. Etoposid um das zweifache erhöht. Die Behandlung mit Cisplatin, MG-132 und Paclitaxel hatte hingegen keinen Einfluss auf die Expression der S100A2-mRNA. Die mRNA-Expression von S100A4 war insgesamt durch die Behandlung mit zytotoxischen Agenzien kaum beeinflusst. Im Gegensatz dazu konnte für die S100A9-mRNA eine zweifach erhöhte Expression durch fast alle verwendeten zytotoxischen Agenzien außer für MG-132 gezeigt werden (Abb. 10).

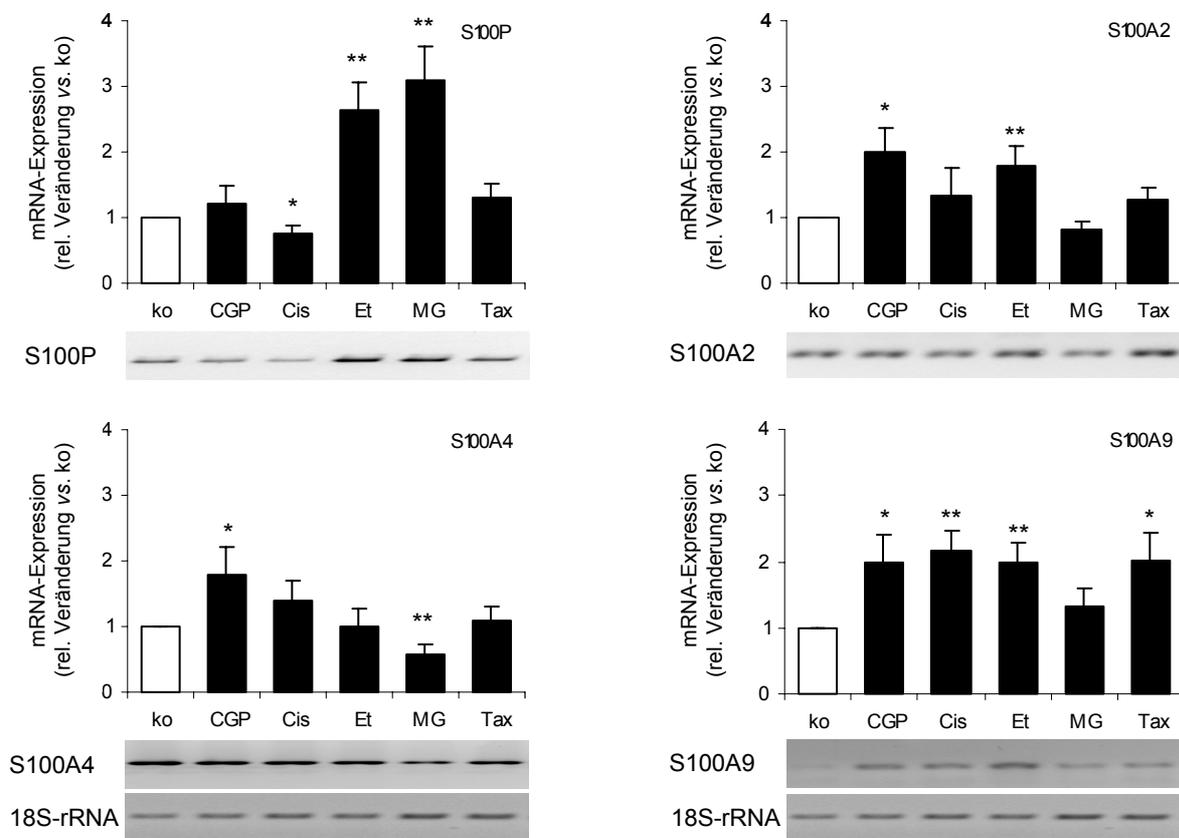


Abb. 10 Einfluss der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien auf die mRNA-Expression von S100P und anderer tumorrelevanter S100-Proteine in H358-Zellen

H358-Zellen wurden für 24 h mit zytotoxischen Agenzien (ko - unbehandelte Kontrolle; CGP - 10 μ M CGP 74514A; Cis -100 μ M Cisplatin; Et - 30 μ M Etoposid; MG - 10 μ M MG-132; Tax - 5 nM Paclitaxel) behandelt. Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expression der S100-Proteine im Verhältnis zur 18S-rRNA ermittelt. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=6) mit * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ vs. unbehandelte Kontrolle angegeben.

Die mRNA-Expression von S100P war durch die Behandlung mit Cisplatin, Etoposid oder MG-132 verändert. Deshalb wurde der Einfluss dieser zytotoxischen Agenzien auf die Protein-Expression von S100P zeitabhängig durch die Untersuchung von Gesamt-Zelllysaten der Zellen im Immuno-Blot überprüft. Im Gegensatz zur verminderten mRNA-Expression war die Protein-Expression von S100P durch die Behandlung mit Cisplatin nach 24 h erhöht.

Die Behandlung mit Etoposid, die zu einer erhöhten mRNA-Expression von S100P führte, resultierte hingegen in einer leicht verminderten Protein-Expression von S100P. Die Behandlung der Zellen mit MG-132 zeigte als einzige sowohl eine stark erhöhte mRNA-Expression als auch eine erhöhte Protein-Expression von S100P (Abb. 10 und 11).

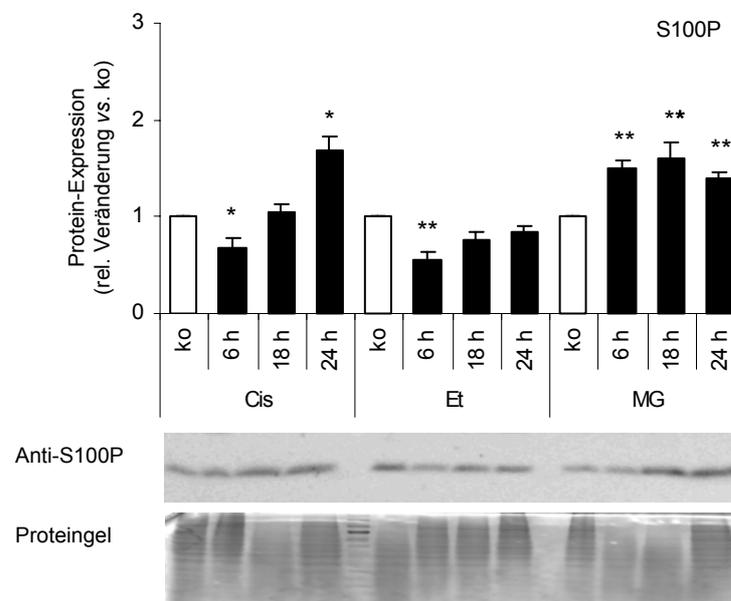


Abb. 11 Einfluss der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien auf die Protein-Expression von S100P in H358-Zellen

H358-Zellen wurden für 6 h, 18 h und 24 h mit zytotoxischen Agenzien (ko – unbehandelte Kontrolle; Cis - 100 μ M Cisplatin; Et - 30 μ M Etoposid; MG - 10 μ M MG-132) behandelt. Es wurden 40 μ g Gesamt-Zelllysate im Immuno-Blot analysiert. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=4) mit $*p \leq 0,05$ und $**p \leq 0,01$ vs. unbehandelte Kontrolle angegeben.

3.1.3. Einfluss von Proteinkinasen auf die mRNA-Expression von S100P

Bei der Stress- bzw. Zelltod-induzierten Signaltransduktion nehmen die intrazellulären Proteinkinasen p38, JNK und ERK1/2 eine wichtige Rolle ein [Liu *et al.*, 2006; Mansouri *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2000]. Da die vorangegangenen Versuche einen Einfluss von Cisplatin, Etoposid bzw. MG-132 auf die mRNA- bzw. die Protein-Expression von S100P zeigten (Abb. 10 und Abb. 11), sollte geklärt werden, ob diese Proteinkinasen einen Einfluss auf die veränderte Expression von S100P haben.

Es wurde zunächst überprüft, ob die Proteinkinasen durch die Behandlung mit den zytotoxischen Agenzien Cisplatin, Etoposid bzw. MG-132 aktiviert werden. Hierfür wurden H358-Zellen für 6 h, 18 h und 24 h mit diesen Agenzien behandelt. Die Gesamt-Zelllysate wurden im Immuno-Blot mit den Phospho-spezifischen Antikörpern auf die Phosphorylierung (Aktivierung) von p38, JNK und ERK1/2 untersucht.

In Abbildung 12 sind nur die 24 h-Werte dargestellt. Es zeigte sich, dass vor allem ERK1/2 durch die Behandlung mit allen drei Agenzien aktiviert wurde. Die anderen beiden untersuchten Proteinkinasen p38 und JNK zeigten mit Ausnahme der MG-132-Behandlung nur eine moderate Phosphorylierung (Abb. 12).

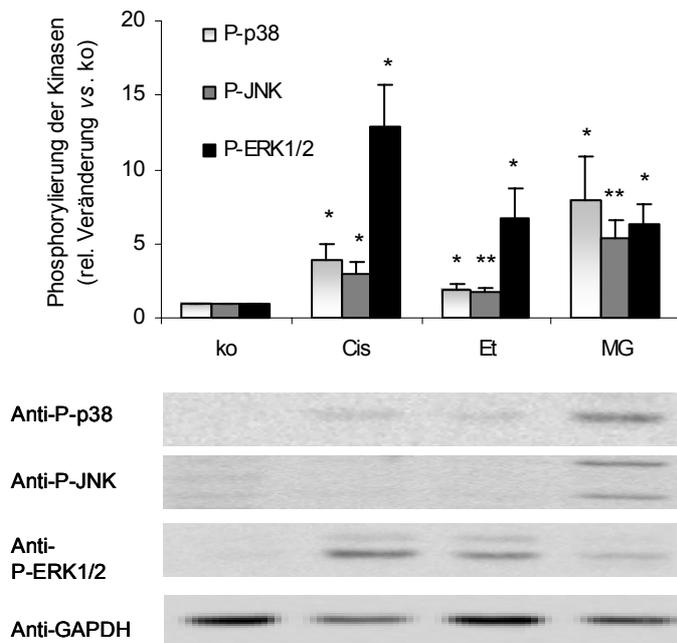


Abb. 12 Einfluss der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien auf die Phosphorylierung von p38, JNK und ERK1/2 in H358-Zellen

H358-Zellen wurden für 24 h mit Cis (100 μ M Cisplatin), Et (30 μ M Etoposid) oder MG (10 μ M MG-132) behandelt. Es wurden 20 μ g Gesamt-Zellysate im Immuno-Blot mit den Antikörpern gegen P-p38, P-JNK bzw. P-ERK1/2 analysiert. Die Phosphorylierung der Proteine wurde auf die GAPDH-Expression normalisiert. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=4) mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ vs. unbehandelte Kontrolle (ko) angegeben.

Die Signalwege, die zur Aktivierung von p38, JNK oder ERK1/2 führen, können durch die spezifischen Kinase-Inhibitoren SB 203580 (p38), SP 600125 (JNK) oder U 0126 (ERK1/2) blockiert werden. SB 203580 bzw. SP 600125 binden an die ATP-Bindestelle von p38 bzw. JNK und inhibieren somit direkt deren Phosphorylierung [Bennett *et al.*, 2001; Young *et al.*, 1997]. U 0126 inhibiert die Aktivierung der MAP Kinase Kinasen (MEKs), welche hauptsächlich für die Phosphorylierung von ERK1/2 verantwortlich sind [Favata *et al.*, 1998]. Der Immuno-Blot in Abbildung 13 zeigt exemplarisch die spezifische Inhibierung der Aktivierung von p38 und JNK durch MG-132 bzw. der ERK1/2 durch Cisplatin.

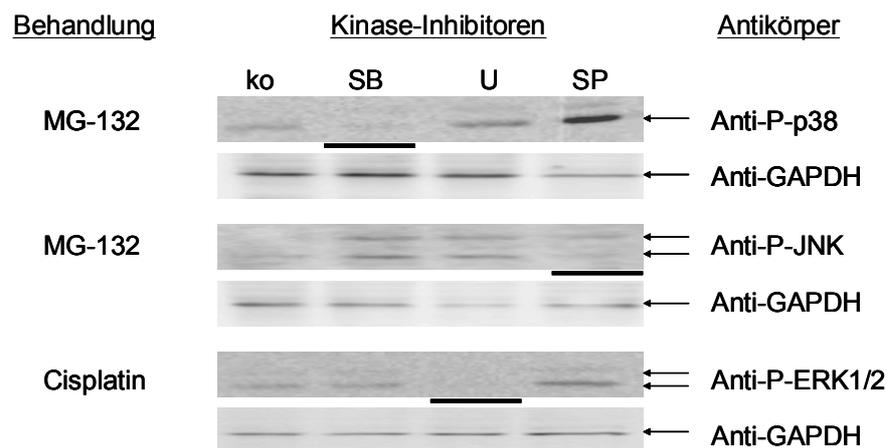


Abb. 13 Nachweis der spezifischen Inhibierung der Phosphorylierung von p38, JNK und ERK1/2 durch Kinase-Inhibitoren nach Behandlung von H358-Zellen mit zytotoxischen Agenzien

H358-Zellen wurden für 24 h mit MG-132 (10 μ M; Stimulation von p38 und JNK) oder Cisplatin (100 μ M; Stimulation von ERK1/2) behandelt. Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit den Kinase-Inhibitoren gegen P-p38 (SB – 5 μ M SB 203580), P-JNK (SP – 2 μ M SP 600125) oder P-ERK1/2 (U – 10 μ M U 0126) zeigte im Immuno-Blot mit den Phospho-spezifischen Antikörpern die Inhibierung der Phosphorylierung der Proteinkinasen. Zum Vergleich wurden Kontrollen (ko) ohne Behandlung mit zytotoxischen Agenzien oder Kinase-Inhibitoren mitgeführt. Die Normalisierung erfolgte mittels GAPDH-Detektion. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

In den vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass in den H358-Zellen sowohl die S100P-Expression (Abb. 10 und 11) als auch die Aktivierung der intrazellulären Proteinkinasen p38, JNK bzw. ERK1/2 (Abb. 12) durch die Behandlung mit Cisplatin, Etoposid oder MG-132 verändert waren. Durch die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit den zytotoxischen Agenzien und den spezifisch wirkenden Kinase-Inhibitoren (Abb. 13), sollte die Abhängigkeit der mRNA-Expression von S100P von der Aktivierung der Proteinkinasen untersucht werden. Durch die Behandlung mit SB 203580 und U 0126 zeigten die H358-Zellen eine basal verringerte mRNA-Expression von S100P (Abb. 14 - graue Balken). Die Inhibierung der Kinase-Signalwege hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die durch zytotoxische Agenzien induzierte mRNA-Expression von S100P (Abb. 14).

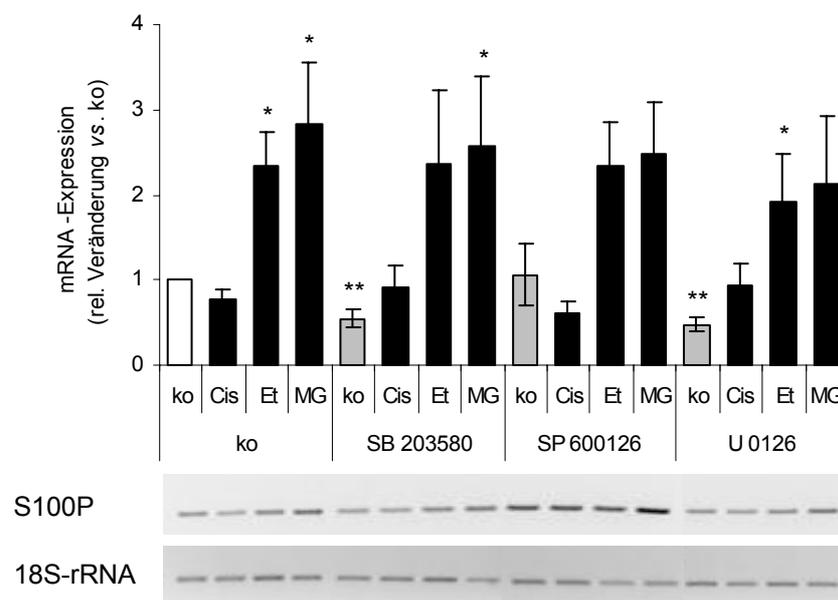


Abb. 14 Auswirkung der Inhibierung der Phosphorylierung von p38, JNK und ERK1/2 durch spezifische Kinase-Inhibitoren auf die mRNA-Expression von S100P nach der Behandlung von H358-Zellen mit zytotoxischen Agenzien

H358-Zellen wurden für 24 h gleichzeitig mit zytotoxischen Agenzien (Cis - 100 μ M Cisplatin; Et - 30 μ M Etoposid; MG - 10 μ M MG-132) und mit den Kinase-Inhibitoren gegen P-p38 (SB - 5 μ M SB 203580), P-JNK (SP - 2 μ M SP 600125) oder P-ERK1/2 (U - 10 μ M U 0126) behandelt. Mittels RT-PCR wurde die mRNA-Expression von S100P im Vergleich zur 18S-rRNA ermittelt. Als Kontrollen (ko) wurden H358-Zellen ohne Kinase-Inhibitoren und ohne die Behandlung mit zytotoxischen Agenzien (weißer Balken) bzw. nur ohne die Behandlung mit zytotoxischen Agenzien (graue Balken) mitgeführt. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=4) mit * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ vs. unbehandelte Kontrolle angegeben.

3.2. Einfluss von S100P auf die Resistenz und Phagozytose von Bronchialkarzinom-Zellen

In verschiedenen Karzinom-Zelllinien wurde S100P als Faktor beschrieben, welcher Resistenzen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika vermittelt [Arumugam *et al.*, 2005; Bertram *et al.*, 1998], oder sie gegenüber der Chemotherapie-Behandlung sensibilisiert [Wang *et al.*, 2008]. Darüber hinaus wurde in unseren Expressionsanalysen ein Effekt einiger zytotoxischer Agenzien auf die Expression von S100P in H358-Zellen festgestellt. Aus diesem Grund sollte im Folgenden untersucht werden, ob S100P in bronchialen Adenokarzinomzellen die Induktion der Apoptose und die sich anschließende Phagozytose beeinflusst. Darüber hinaus sollte gleichzeitig überprüft werden, welche Bedeutung RAGE in diesem Zusammenhang hat.

Zu diesem Zweck wurde zunächst die bronchiale Adenokarzinom-Zelllinie H358 stabil mit S100P transfiziert. S100P wurde zum einen als GFP-Fusionsprotein (pEGFP::S100P) in den Zellen exprimiert, um besser lokalisierbar zu sein. Zum anderen wurde S100P auch als Nicht-Fusionsprotein (pcDNA::S100P) stabil in die Zellen transfiziert. Um mögliche S100P-Effekte, die über RAGE vermittelt werden, untersuchen zu können, wurden H358-Zellen, die RAGE bzw. Δ cytoRAGE stabil exprimierten, zusätzlich mit pEGFP::S100P überexprimiert (RAGE pEGFP::S100P, Δ cytoRAGE pEGFP::S100P) (Abb. 15).

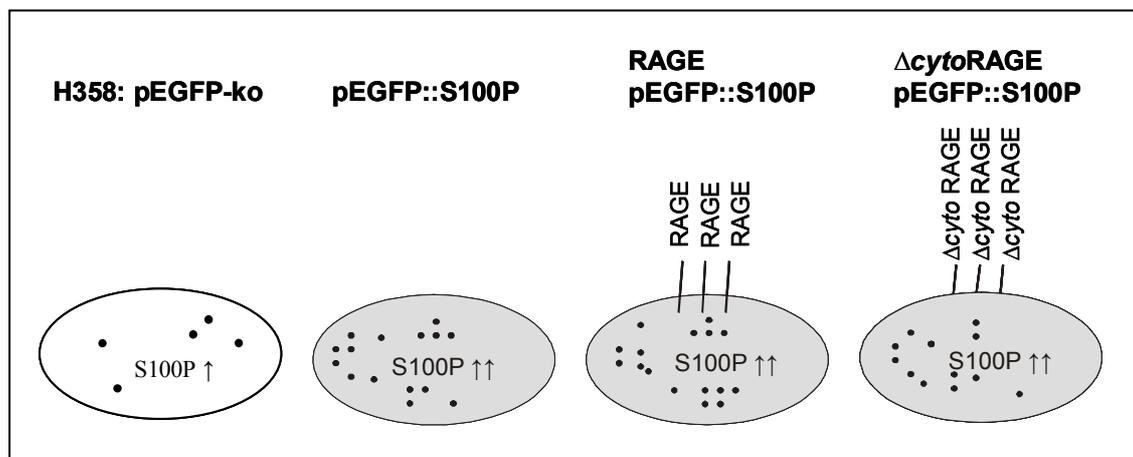


Abb. 15 Schematische Darstellung der in dieser Arbeit generierten und verwendeten H358-Zellen

3.2.1. Nachweis der stabilen Überexpression von S100P in H358-Zellen

Die Überexpression von S100P und GFP-S100P in den H358-Zellen mit und ohne die Koexpression von RAGE bzw. Δ cytoRAGE wurde durch Immuno-Blot-Analysen (Abb. 16A) sowie durch Fluoreszenzmikroskopie bzw. Immunzytochemie (Abb. 16B) nachgewiesen. Zusätzlich wurde überprüft, ob GFP-S100P von den überexprimierenden Zellen in das Zellkulturmedium sekretiert wurde. Die am FLUOstar OPTIMA Mikroplatten-Reader gemessene GFP-Fluoreszenz zeigte keine erhöhten Werte der H358 pEGFP::S100P-Zellen im Vergleich zu den H358 pEGFP-ko-Zellen in den Zellkultur-Überständen (nicht

gezeigt). Darüber hinaus konnte auch mikroskopisch keine Kollokalisierung mit dem potentiellen S100P-Rezeptor RAGE nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

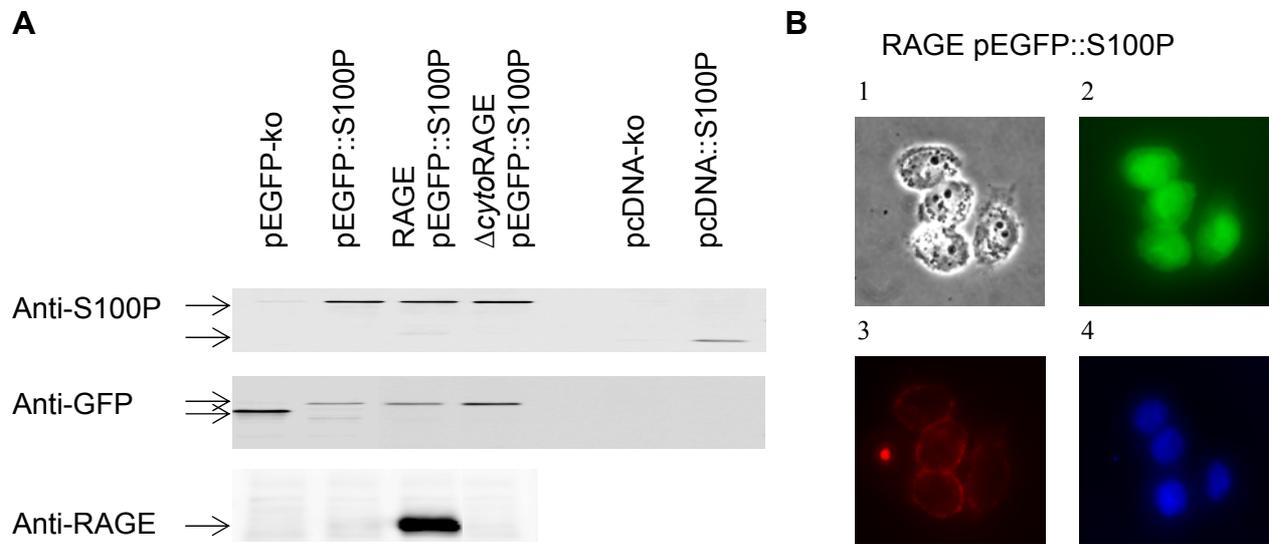


Abb. 16 Nachweis der stabilen Überexpression von S100P und RAGE in H358-Zellen

Die stabil transfizierten Einzelzellklone (pEGFP::S100P, RAGE pEGFP::S100P, Δ_{cyto} pEGFP::S100P) und Mischzellklone (pEGFP-ko, pcDNA-ko, pcDNA::S100P) von H358-Zellen wurden **A**) im Immuno-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen S100P, GFP oder RAGE (Anti-RAGE A905 bindet die intrazelluläre Domäne von RAGE) auf die Überexpression überprüft. **B**) Die Koexpression von pEGFP::S100P und RAGE in den H358 RAGE pEGFP::S100P-Zellen wurde außerdem am Fluoreszenz-Mikroskop nachgewiesen (1 – Durchlicht, 2 – GFP-Fluoreszenz, 3 – Immunzytochemie Anti-RAGE, 4 – Zellkern-Färbung mit DAPI).

3.2.2. Einfluss von S100P auf den durch zytotoxische Agenzien induzierten Zelltod von H358-Zellen

Zytotoxische Agenzien greifen in der Regel in den Ablauf des Zellzyklus ein und führen dabei zur Induktion des Zelltodes der behandelten Zellen. Im Folgenden wurde die Zelltod-induzierende Wirkung von klinisch eingesetzten Chemotherapeutika (Cisplatin, Etoposid und Paclitaxel) und von bislang nur experimentell eingesetzten zytotoxischen Agenzien (CGP 74514A, MG-132) untersucht. Die Behandlung mit diesen Agenzien erfolgte für 48 h. Für die Zelltodanalyse in Abhängigkeit von der S100P-Überexpression wurden der apoptotische Zelltod anhand der DNA-Veränderungen nach Hoechst-Färbung und der nekrotische Zelltod anhand der Propidiumiodid-Aufnahme in die Zellen ausgewertet.

Der basale Zelltod der H358-Zellen lag bei 2 – 5 % und war durch die Überexpression von S100P nicht verändert. Die Analyse der Apoptose-Induktion in den H358-Zellen durch die verschiedenen zytotoxischen Agenzien ergab nur geringe Veränderungen in Abhängigkeit von der S100P-Überexpression. Auch die Koexpression von RAGE oder Δ_{cyto} RAGE mit S100P hatte keinen Einfluss auf die Apoptose der Zellen (Abb. 17A). Im Gegensatz dazu war der Anteil nekrotisch sterbender Zellen durch die S100P-Überexpression erhöht. Besonders

deutlich trat die erhöhte Nekrose-Induktion in Koexpression mit RAGE bzw. $\Delta cytoRAGE$ nach der Behandlung mit Cisplatin und Etoposid auf (Abb. 17B).

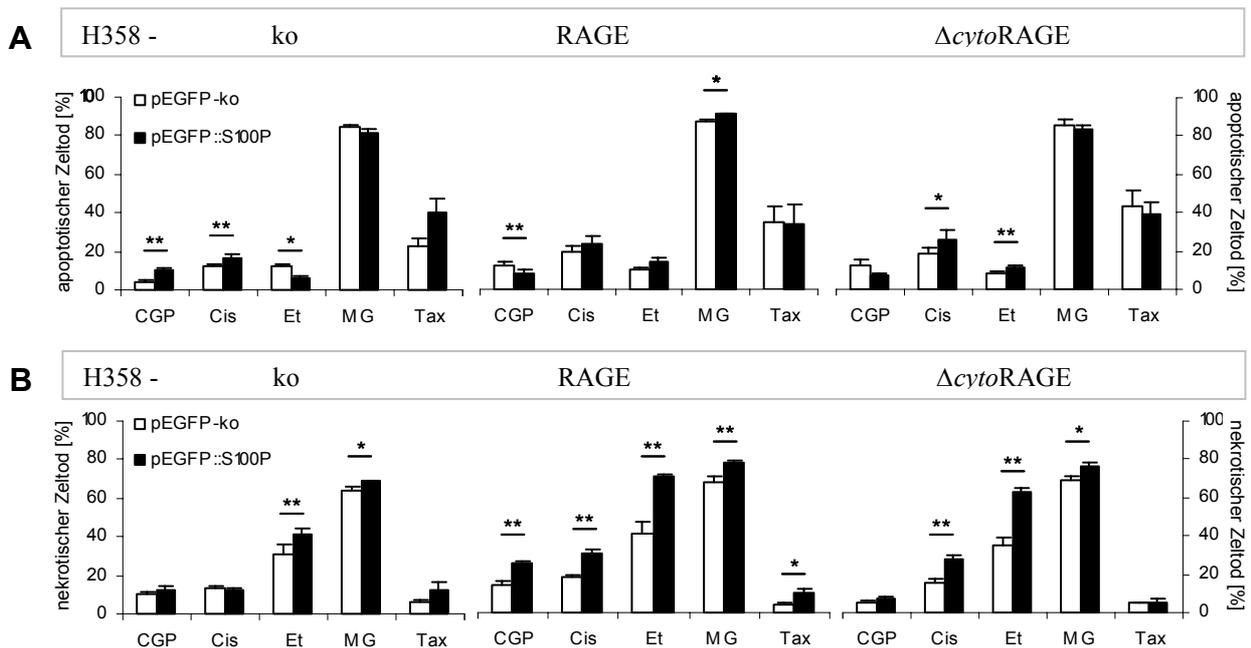


Abb. 17 Einfluss der S100P-Überexpression auf die Zelltod-Induktion von H358-Zellen nach der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien

Die H358-Zellen wurden für 48 h mit zytotoxischen Agenzien (ko - unbehandelte Kontrolle; CGP - 10 μ M CGP 74514A;

Cis - 30 μ M Cisplatin; Et - 20 μ M Etoposid; MG - 10 μ M MG-132; Tax - 5 nM Paclitaxel) behandelt. **A)** Zur Bestimmung des apoptotischen Zelltodes wurde von je 300 Zellen der Anteil der Zellen mit DNA-Veränderungen (Hoechst-Färbung) am Mikroskop ausgewertet. **B)** Zur Ermittlung des Anteils nekrotisch sterbender Zellen wurde der prozentuale Anteil Propidiumiodid-positiver Zellen am Durchflusszytometer ausgewertet. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=6) mit * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ vs. pEGFP-ko angegeben.

Die vorherigen Versuche zeigten, dass S100P den durch zytotoxische Agenzien vermittelten Zelltod beeinflusst (Abb. 17). Ob diese Wirkung auf der Ebene des Zellzyklus vermittelt wird, sollte anhand von Zellzyklusmessungen überprüft werden. Für diese Untersuchungen wurden die H358-Zellen für 48 h mit Etoposid oder Paclitaxel behandelt, da Etoposid überwiegend die Nekrose und Paclitaxel überwiegend die Apoptose der Zellen induziert. Die Zellzyklusphasen G1, S und G2 wurden anhand des unterschiedlichen DNA-Gehaltes der Zellen nach Färbung der DNA mit Propidiumiodid am Durchflusszytometer ausgewertet.

Die Behandlung der H358-Zellen mit Etoposid resultierte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen in einem stark erhöhten Anteil von Zellen in der G2-Phase. Im Gegensatz zu Etoposid wurden durch die Paclitaxel-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen kaum Unterschiede in der Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen gezeigt. Die Überexpression von S100P hatte unter Chemotherapie-Behandlung keinen Einfluss auf den Zellzyklus. Allerdings führte die Überexpression von S100P in den unbehandelten Zellen zu einem erhöhten Anteil von Zellen in der G1- und

S-Phase des Zellzyklus (Tab. 7). Die Koexpression von RAGE oder $\Delta cytoRAGE$ mit S100P hatte keinen Einfluss auf den Zellzyklus der H358-Zellen (nicht gezeigt).

Tab. 7: Zellzyklusanalyse Chemotherapie-behandelter H358-Zellen

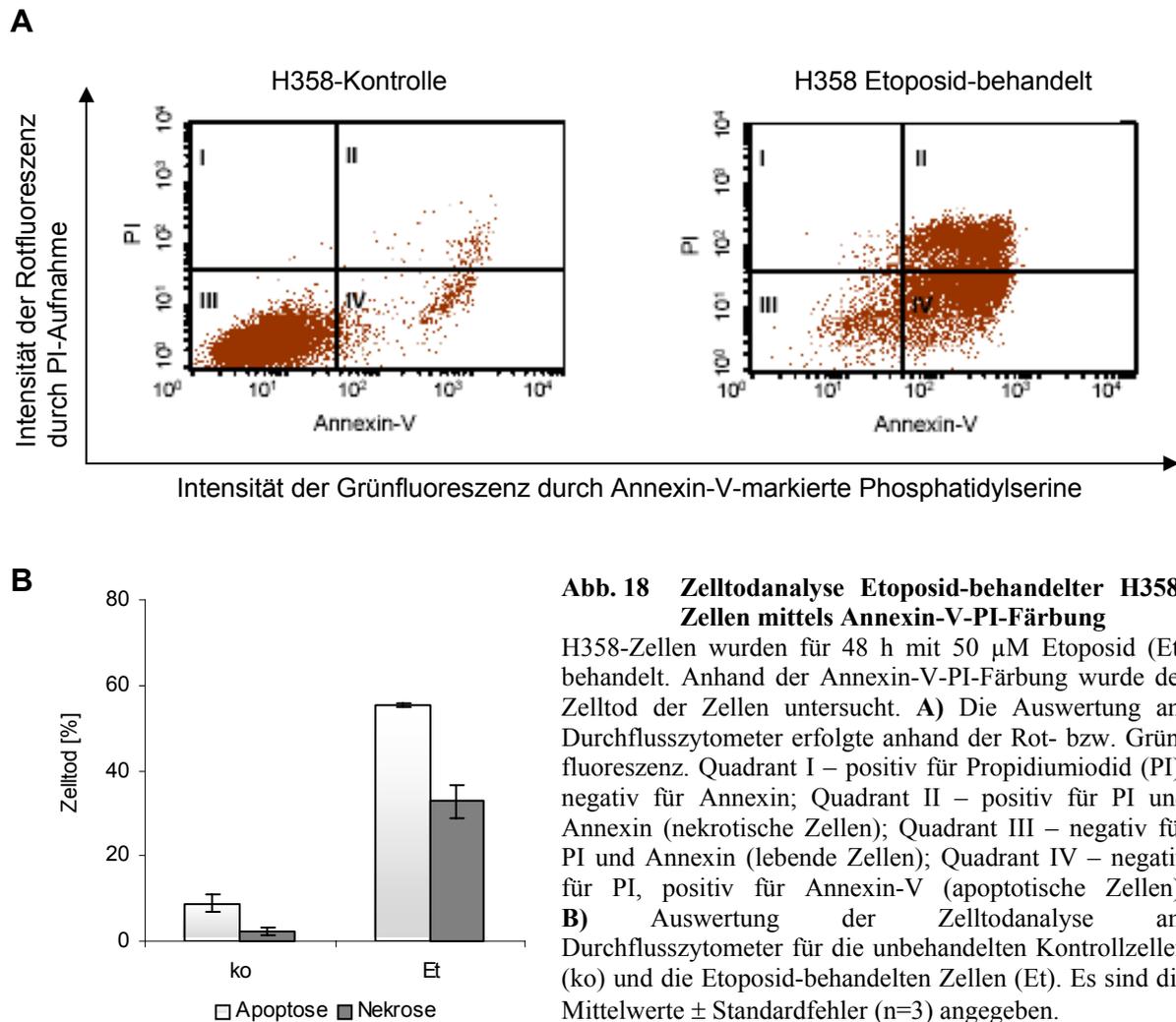
Chemotherapeutika	H358-Zellen	Zellzyklusphasen		
		G1-Phase [% Zellen]	S-Phase [% Zellen]	G2-Phase [% Zellen]
unbehandelte Kontrolle	pEGFP-ko	48,5 ± 0,96	14,0 ± 0,57	37,5 ± 0,77
	pEGFP::S100P	53,0 ± 1,38**	16,1 ± 0,60*	30,9 ± 0,84**
Etoposid	pEGFP-ko	9,6 ± 2,76	19,7 ± 3,72	70,7 ± 6,10
	pEGFP::S100P	5,7 ± 0,51	22,1 ± 2,60	72,1 ± 2,82
Paclitaxel	pEGFP-ko	40,1 ± 3,65	18,8 ± 1,30	41,1 ± 2,49
	pEGFP::S100P	46,0 ± 2,02	15,9 ± 1,20**	38,0 ± 1,44

Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardfehler (n=6) mit * $p \leq 0,05$ and ** $p \leq 0,01$ vs. pEGFP-ko.

3.2.3. Einfluss von S100P auf die Phagozytose apoptotisch sterbender H358-Zellen

Die Phagozytose von körperfremden Partikeln oder sterbenden Zellen im menschlichen Organismus ist ein wichtiger Mechanismus der Immunabwehr. Die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch die Makrophagen basiert auf der Erkennung von Phosphatidylserinen, welche durch die Apoptose auf der Zelloberfläche sterbender Zellen exponiert werden. In dem Phagozytose-Assay wurde *in vitro* untersucht, ob die Expression von S100P und/oder RAGE in den Tumorzellen die Erkennung der Zellen durch die Makrophagen beeinflusst.

Zunächst wurde überprüft, ob die H358-Zellen infolge der Chemotherapie-Behandlung Phosphatidylserine auf ihrer Zelloberfläche exponieren. Die Translokalisierung von Phosphatidylserinen auf die Zelloberfläche apoptotischer Zellen wurde *in vitro* durch die Bindung von Fluoreszenz-gekoppeltem Annexin-V an Phosphatidylserin am Durchflusszytometer überprüft. Die Zellen wurden zusätzlich mit Propidiumiodid (PI) gefärbt, um die Population nekrotisch sterbender Zellen ausschließen zu können (Abb. 18A). Die für 48 h mit 50 μM Etoposid behandelten H358-Zellen wiesen anhand dieser Analyse einen apoptotischen Zelltod von durchschnittlich 55 % und einen nekrotischen Zelltod von 33 % auf und konnten im Phagozytose-Assay eingesetzt werden (Abb. 18A und B).



Für den Phagozytose-Assay wurden die mit Etoposid behandelten H358-Zellen mit dem grünen Zellfluorochrom CFSE markiert und im Verhältnis von 2:1 mit den Makrophagen kokultiviert. Nach 10 – 120 min Kokultivierung wurden die Zellen von der Zellkulturschale gelöst und mit makrophagenspezifischen Rotfluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen CD11 und CD14 markiert. Zellen, die sowohl grün als auch rot fluoreszierten, zeigten die Phagozytose der H358-Zellen durch die Makrophagen an (Abb. 19A). Für die Phagozytoserate wurde der prozentuale Anteil doppelt positiver Zellen im Verhältnis zu den einfach positiven Makrophagen berechnet. Die Phagozytose wurde außerdem am Fluoreszenzmikroskop überprüft, um die doppelt positiven Fluoreszenz-Signale als phagozytierte Zellen zu verifizieren (Abb. 19B). Mit diesem Phagozytose-Assay konnte *in vitro* die Phagozytose von apoptotischen Karzinomzellen durch die Kokultur mit Makrophagen gezeigt werden (Abb. 19).

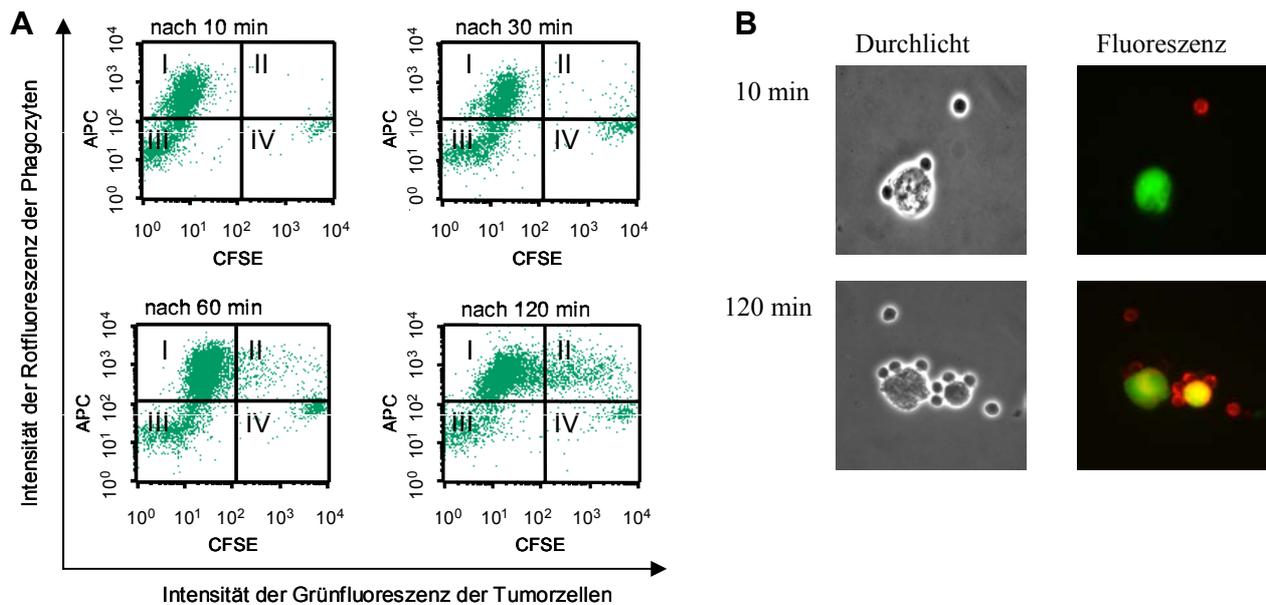


Abb. 19 Analyse der Phagozytose apoptotischer H358-Zellen *in vitro*

Die apoptotischen H358-Zellen waren mit dem grünen Fluorochrom CFSE markiert. Die Makrophagen wurden mit APC-gekoppelten Antikörpern (Rotfluoreszenz) gegen CD11 und CD14 markiert. Die Phagozytose der H358-Zellen durch die Makrophagen wurde nach 10, 30, 60 und 120 min am Durchflusszytometer analysiert (**A**) und am Fluoreszenz-Mikroskop überprüft (**B**). **A**) Am Durchflusszytometer wurde die Phagozytose der Zellen anhand der Fluoreszenz ausgewertet. Quadrant I - CD11 und CD14 positive Makrophagen; Quadrant II - CD11 und CD14 positive Makrophagen mit CFSE gefärbten H358-Zellen; Quadrant III - CD11 und CD14 negative Makrophagen; Quadrant IV - CFSE gefärbte H358-Zellen. Der Anteil doppelt positiver Zellen (II) wurde im Vergleich zu einfach positiven Makrophagen (I) ausgewertet. **B**) Die Phagozytose wurde mithilfe des Fluoreszenz-Mikroskops überprüft. Die Überlagerung der CFSE- und der APC-Fluoreszenz nach 120 min zeigte die Phagozytose der H358-Zellen an.

Für die Phagozytose der H358-Zellen durch die Makrophagen konnte eine Zeitabhängigkeit gezeigt werden, die nach 2 h Kokultur eine maximale Phagozytoserate von 68 % erreichte (Abb. 20A). Während nach 2 h eine geringe Verschlechterung der Phagozytose durch die Überexpression von S100P um ca. 10 % festgestellt wurde, hatte die Koexpression von RAGE oder Δ cytoRAGE mit S100P keinen weiteren Einfluss auf die Phagozytose der H358-Zellen (Abb. 20B).

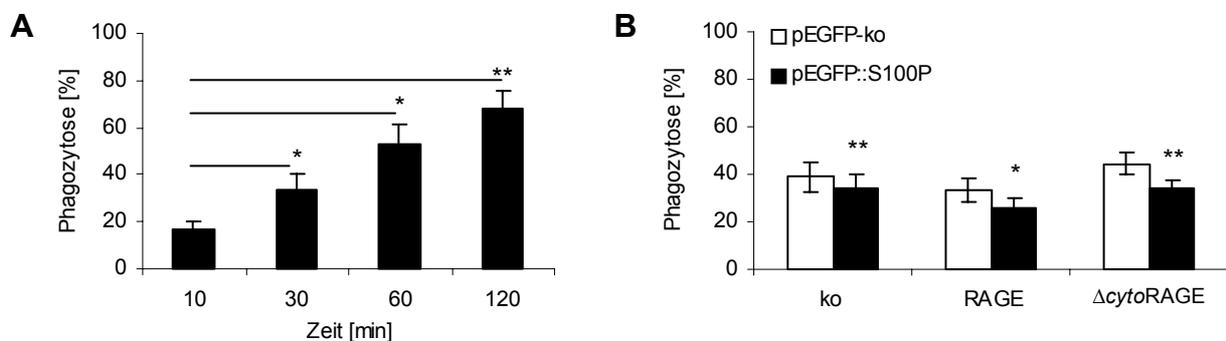


Abb. 20 Auswertung der Phagozytose apoptotischer H358-Zellen *in vitro*

A) Die Phagozytose apoptotischer H358-Zellen wurde nach 10, 30, 60 und 120 min analysiert. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=4) mit $*p \leq 0,05$ und $**p \leq 0,01$ vs. 10 min angegeben. **B**) Die Phagozytose der H358-Zellen durch die Makrophagen wurde in Abhängigkeit der S100P- bzw. RAGE-Expression nach 2 h ausgewertet. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=8) mit $*p \leq 0,05$ und $**p \leq 0,01$ vs. pEGFP-ko angegeben.

3.3. Einfluss von S100P auf die Malignität von Karzinomzellen *in vitro*

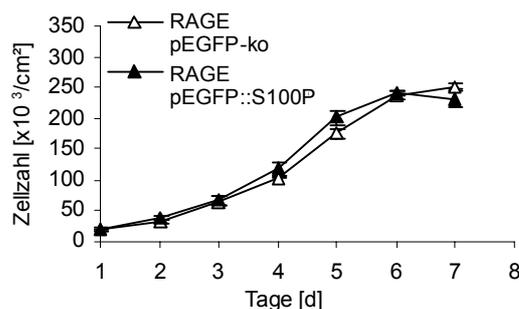
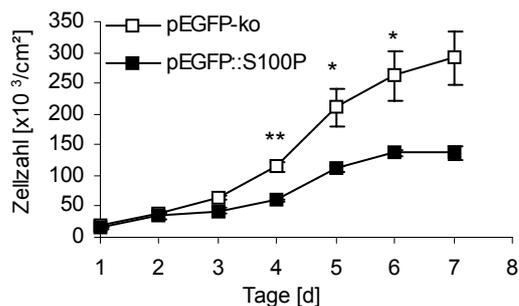
In den folgenden Versuchen wurde der Einfluss einer erhöhten Expression von S100P auf die Proliferation, auf die Tumorzellkolonie-Bildung und auf die Migration von H358-Zellen *in vitro* analysiert. Diese Untersuchungen wurden zusätzlich in Abhängigkeit der Expression von RAGE durchgeführt. Da die meisten Literaturdaten bezüglich S100P bisher mit der humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie Panc-1 gewonnen wurden, wurde diese in die Untersuchungen mit einbezogen.

3.3.1. Einfluss von S100P auf die Proliferation der H358-Zellen

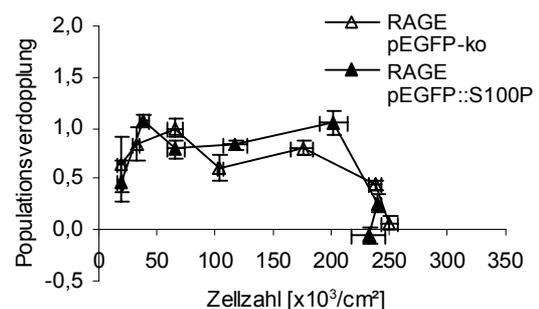
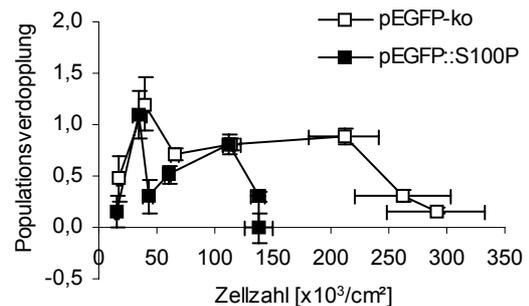
Die Proliferation der H358-Zellen sollte in Abhängigkeit der Überexpression von S100P mit und ohne die Koexpression von RAGE bzw. $\Delta cytoRAGE$ untersucht werden. Die Proliferation wurde als Zunahme der Zellzahl gegen die Zeit vermessen und aufgetragen (Abb. 21A). Zusätzlich wurde daraus die Zahl der Zellteilungen pro Tag berechnet (Populationsverdopplung) und im Vergleich zur Zellzahl ausgewertet (Abb. 21B).

Die Überexpression von S100P resultierte in einer verminderten Proliferation der H358-Zellen. Mit Erreichen einer Zelldichte von ca. 150 000 Zellen/cm² stellten die Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen ihre Zellteilung ein (Abb. 21A, Abb. 21B). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die Koexpression von S100P mit RAGE dieser Einfluss komplett bzw. durch die Koexpression von S100P mit $\Delta cytoRAGE$ partiell aufgehoben werden konnte (Abb. 21). Darüber hinaus wurde bei den $\Delta cytoRAGE$ -Zellen im Vergleich der Zellzahlen ein vermindertes Wachstum gegenüber den ko-Zellen festgestellt (Abb. 21).

A Zellzahl vs. Zeit



B Populationsverdopplung vs. Zellzahl



Fortsetzung nächste Seite

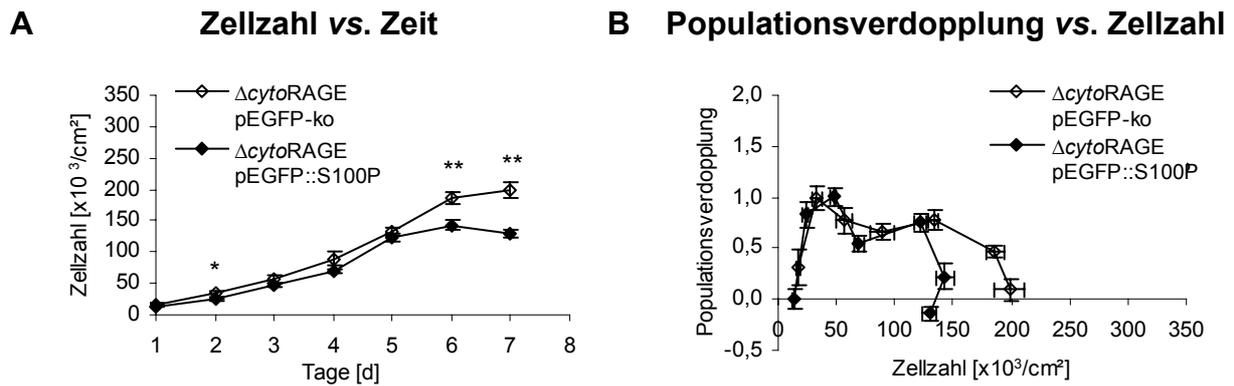


Abb. 21 Einfluss von S100P auf die Proliferation von H358-Zellen

Die Proliferation der H358-Zellen wurde abhängig von S100P und der Koexpression von RAGE bzw. $\Delta cytoRAGE$ untersucht. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert. **A)** Die Zellzahl wurde zeitabhängig aufgetragen. **B)** Außerdem wurde die Populationsverdopplung (Zahl der Zellteilungen pro Tag) berechnet $[(\ln \text{Zellzahl}_{\text{Tag } x} - \ln \text{Zellzahl}_{\text{Tag } x-1})/\ln 2]$ und abhängig von der Zellzahl dargestellt. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=4) mit * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ vs. pEGFP-ko angegeben.

Die Proliferation der H358-Zellen wurde durch die Überexpression von S100P vermindert. Ob dies auf einen Einfluss von S100P auf den Zellzyklus zurückzuführen ist, wurde anhand von Zellzyklusanalysen überprüft. Die Zellzyklusanalysen wurden parallel zu den Zellzählungen durchgeführt. In Tab. 8 ist der Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase für Tag 1 der Zellzählung angegeben, da sich die Zellen zu diesem Zeitpunkt in der initialen Proliferationsphase befinden.

Der verminderten Proliferation entsprechend wurden die Zellen in Abhängigkeit von S100P vermehrt in der G1-Phase und vermindert in der S- und der G2-Phase des Zellzyklus detektiert. Dieser Effekt war durch die Koexpression von RAGE mit S100P aufgehoben bzw. durch die Koexpression von $\Delta cytoRAGE$ mit S100P umgekehrt (Tab. 8).

Tab. 8: Zellzyklusanalyse der in Wachstumsversuchen eingesetzten H358-Zellen nach 1d

H358-Zellen		Zellzyklusphase		
Rezeptor		G1-Phase [% Zellen]	S-Phase [% Zellen]	G2-Phase [% Zellen]
Kontrolle	pEGFP-ko	40,4 \pm 0,88	37,5 \pm 1,20	21,6 \pm 1,34
	pEGFP::S100P	46,3 \pm 1,80**	34,7 \pm 1,14**	16,9 \pm 0,77**
RAGE	pEGFP-ko	34,9 \pm 1,27	38,2 \pm 1,61	22,5 \pm 2,63
	pEGFP::S100P	32,5 \pm 0,74*	44,1 \pm 0,88**	19,6 \pm 2,38**
$\Delta cytoRAGE$	pEGFP-ko	43,9 \pm 1,34	34,4 \pm 1,0	21,0 \pm 1,32
	pEGFP::S100P	38,0 \pm 0,83**	39,5 \pm 1,52*	24,8 \pm 1,08**

Angaben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=6) mit * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ vs. pEGFP-ko.

3.3.2. Einfluss von S100P auf die Bildung von Tumorzellkolonien *in vitro*

Der Einfluss von S100P auf die Bildung von Tumorzellkolonien aus Einzelzellen wurde anhand des so genannten *tumor-colony-forming*-Assays untersucht. Für diesen Assay wurde die Tumorzellsuspension soweit verdünnt, dass einzelne Tumorzellen im Softagar ausgesetzt werden konnten. Nach vier Wochen wurden die Anzahl (Abb. 22A) und die Größe der gebildeten Tumorzellkolonien (Abb. 22B) mikroskopisch ausgewertet.

Die Überexpression von S100P führte zu einer vermehrten Bildung von Tumorzellkolonien. Gleichzeitig war die Größe der Tumorzellkolonien durch S100P verringert. Auch in Koexpression mit RAGE wurden durch S100P mehr Tumorzellkolonien gebildet. Diese waren mit einer Tumorzellgröße von ca. 30 μm ebenfalls kleiner als die Tumorzellkolonien der RAGE-Zellen. Die Tumorzellkolonien der $\Delta\text{cytoRAGE}$ - und der $\Delta\text{cytoRAGE}$ pEGFP::S100P-Zellen erreichten durchschnittlich nur eine Größe von 20 μm . Es konnten hier keine Unterschiede in Anzahl oder Größe durch die Überexpression von S100P festgestellt werden. (Abb. 22A und B).

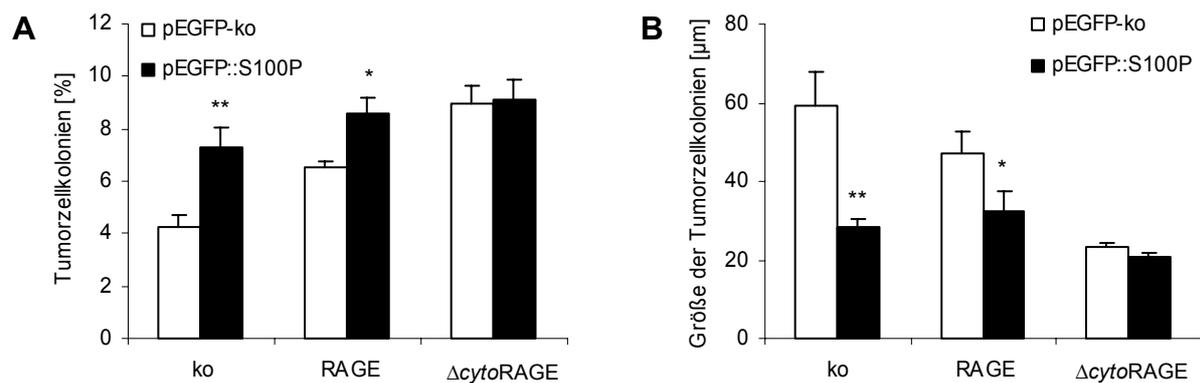


Abb. 22 Einfluss von S100P auf die Bildung und das Größenwachstum von Tumorzellkolonien *in vitro*
 Einzelzellen von H358-Zellen wurden über einen Zeitraum von vier Wochen in 0,6%igen Softagar kultiviert und am Mikroskop deren Anzahl und deren durchschnittliche Größe ausgewertet. **A)** Die Anzahl der gebildeten Tumorzellkolonien mit einer Mindestgröße von 20 μm bezieht sich prozentual auf 20 000 eingesetzte Einzelzellen. **B)** Die durchschnittliche Größe der Tumorzellkolonien wurde durch die Mittlung von jeweils 100 zufällig ausgewählten Tumorzellkolonien ausgewertet. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=6) mit * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ vs. pEGFP-ko angegeben.

3.3.3. Einfluss von S100P auf die Migration von H358-Zellen *in vitro*

Eine entscheidende Eigenschaft von Tumoren ist ihre Fähigkeit, im Gewebe zu migrieren und in andere Organe zu metastasieren (sekundäre Tumore). Eine Voraussetzung für die Metastasierung von Tumoren ist die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen. Diese hängt sowohl von extrazellulären als auch von intrazellulären Faktoren ab. Der Einfluss von S100P auf die Migration von H358-Zellen wurde anhand des so genannten „Wundheilungs“-Assays und des Transwell-Assays *in vitro* untersucht.

In dem „Wundheilungs“-Assay wurde untersucht, wie schnell die Zellen in Abhängigkeit von S100P in einen zellfreien Bereich („Wunde“) hineinwachsen. Die Abstände zwischen den

„Wundrändern“ wurden regelmäßig über einen Zeitraum von 16 Tagen am Mikroskop vermessen (Abb. 23A). Die Überexpression von S100P verminderte in den untersuchten H358-Zellen den Verschluss der „Wunde“. Diese verminderte Migration der Zellen durch die Überexpression von S100P war durch die Koexpression von RAGE mit S100P nicht so stark ausgeprägt und durch die Koexpression von $\Delta cytoRAGE$ mit S100P sogar weiter verstärkt (Abb. 23B).

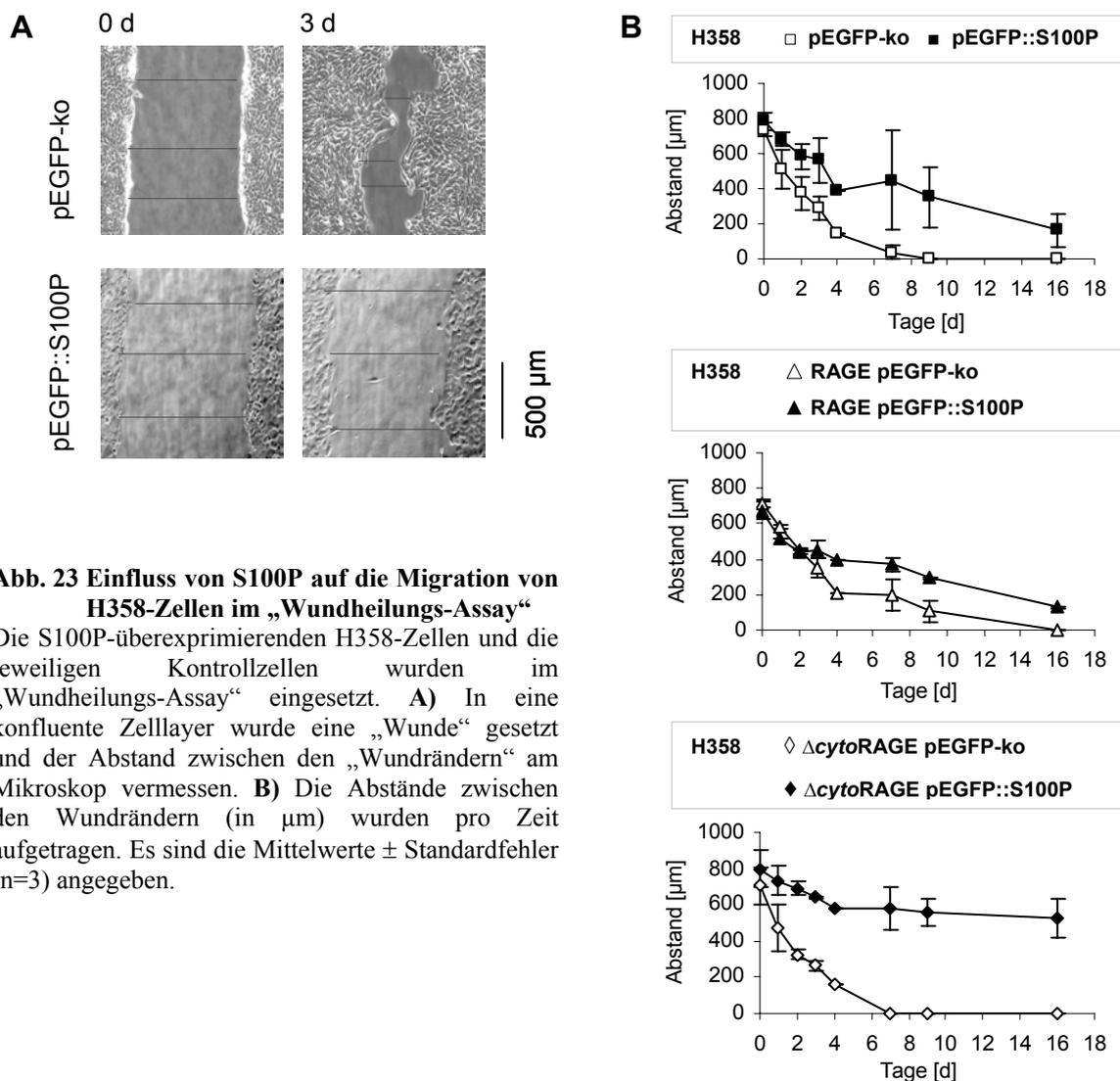


Abb. 23 Einfluss von S100P auf die Migration von H358-Zellen im „Wundheilungs-Assay“

Die S100P-überexprimierenden H358-Zellen und die jeweiligen Kontrollzellen wurden im „Wundheilungs-Assay“ eingesetzt. **A)** In eine konfluente Zellschicht wurde eine „Wunde“ gesetzt und der Abstand zwischen den „Wundrändern“ am Mikroskop vermessen. **B)** Die Abstände zwischen den Wundrändern (in μm) wurden pro Zeit aufgetragen. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler ($n=3$) angegeben.

Im Transwell-Assay wurde die Migration der Zellen durch eine poröse Membran untersucht. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde indirekt mittels Alamar Blue-Assay bestimmt. Ebenso wie im „Wundheilungs“-Assay (Abb. 23) war die Migration der H358-Zellen durch die Überexpression von S100P auch im Transwell-Assay nach sechstägiger Kultivierung vermindert (Abb. 24). Die Koexpression von RAGE bzw. $\Delta cytoRAGE$ mit S100P hatte keinen weiteren Einfluss auf diesen S100P-Effekt (Abb. 24).

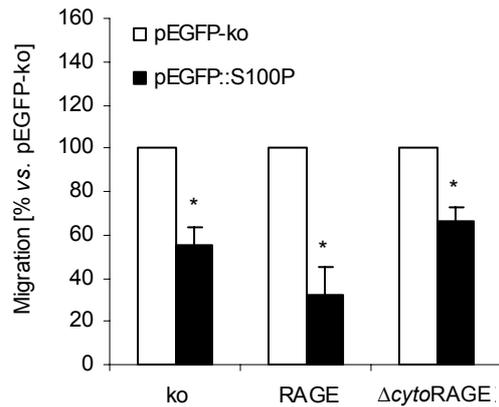


Abb. 24 Einfluss von S100P auf die Migration von H358-Zellen im Transwell-Assay

Im Transwell-Assay wurden die S100P-überexprimierenden H358-Zellen und die jeweiligen Kontrollzellen auf eine poröse Membran (Porengröße=8 μm) ausgesetzt. Die gerichtete Migration der Zellen erfolgte durch die Serumstimulation (0% FCS im Insert, 10% FCS in der Zellkulturschale). Die Auswertung der Migration erfolgte nach 6 d mittels Alamar Blue-Assay. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=4) mit * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ vs. pEGFP-ko angegeben.

3.3.4. Einfluss von S100P auf die Proliferation, Tumorzellkolonie-Bildung und Migration von Panc-1-Zellen *in vitro*

Im Gegensatz zu der verminderten Proliferation und Migration von H358-Zellen durch die Überexpression von S100P hat eine andere Arbeitsgruppe an Panc-1-Zellen eine gesteigerte Proliferation und Migration dieser Zellen in Abhängigkeit von S100P gefunden [Arumugam *et al.*, 2005]. Aus diesem Grund wurde zur Überprüfung der Ergebnisse auch die humane Pankreaskarzinom-Zelllinie Panc-1 mit dem Fusionsprotein GFP-S100P stabil transfiziert (Abb. 25) und der Einfluss von S100P auf die Malignität dieser Zellen untersucht.

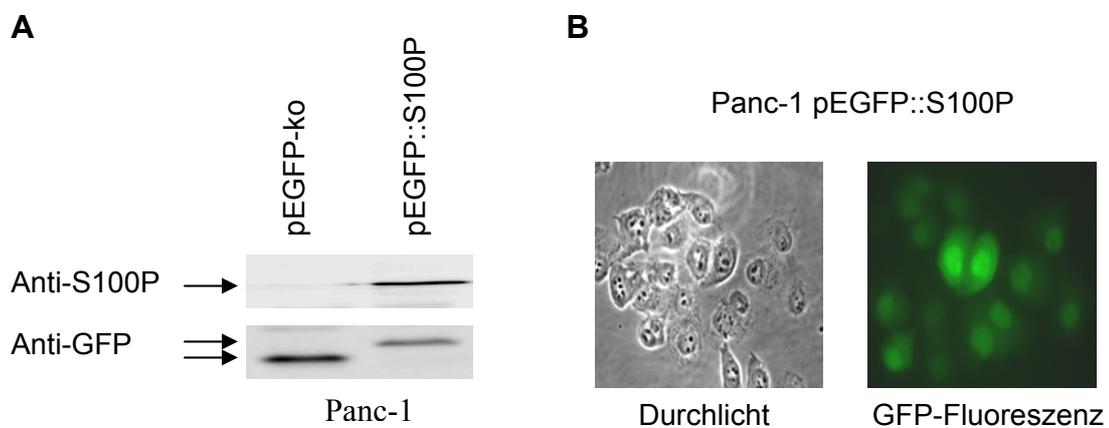


Abb. 25 Nachweis der stabilen Überexpression von S100P in Panc-1-Zellen

Die stabil transfizierten Mischklone (pEGFP-ko und pEGFP::S100P) der Panc-1-Zellen wurden A) im Immunoblot mit den spezifischen Antikörpern gegen S100P und GFP auf die Überexpression überprüft. B) Die Expression von pEGFP::S100P in den Panc-1-Zellen wurde außerdem am Fluoreszenz-Mikroskop kontrolliert.

Im Gegensatz zu den S100P-überexprimierenden H358-Zellen (Abb. 21) war die Proliferation der Panc-1-Zellen durch die Überexpression von pEGFP::S100P unter unseren Bedingungen nur geringfügig vermindert (Abb. 26).

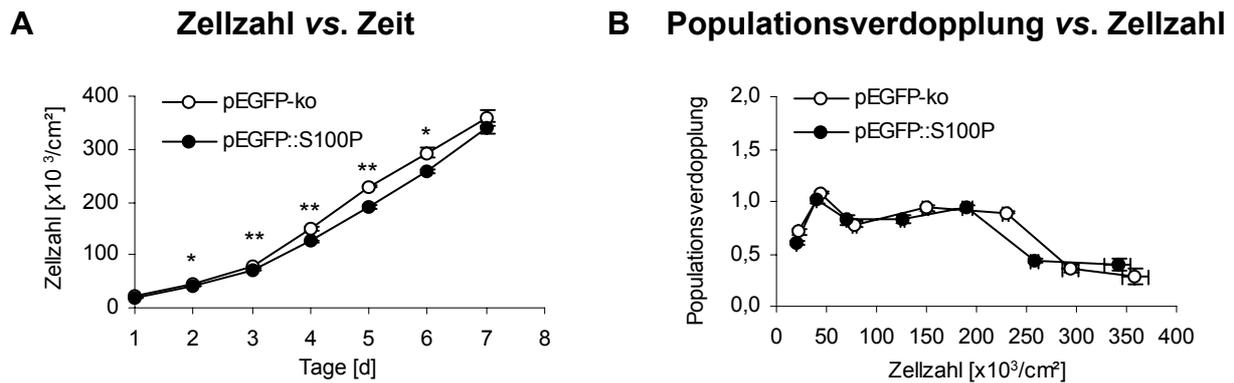


Abb. 26 Einfluss von S100P auf die Proliferation von Panc-1-Zellen

Die Proliferation der Panc-1-Zellen wurde abhängig von S100P untersucht. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert. **A)** Die Zellzahl wurde zeitabhängig aufgetragen. **B)** Außerdem wurde die Populationsverdopplung berechnet $[(\ln \text{Zellzahl}_{\text{Tag } x} - \ln \text{Zellzahl}_{\text{Tag } x-1})/\ln 2]$ und abhängig von der Zellzahl dargestellt. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler ($n=4$) mit $*p \leq 0,05$ und $**p \leq 0,01$ vs. pEGFP-ko angegeben.

Im Gegensatz zu den H358-Zellen hatte die Überexpression von S100P in den Panc-1-Zellen im *tumor-colony-forming*-Assay keine Auswirkung auf die Bildung der Tumorzellkolonien (Abb. 27A). Im Vergleich zu den H358-Kontrollzellen bildeten die Panc-1-Kontrollzellen eine erhöhte Anzahl von Tumorzellkolonien (Abb. 27A). Die Größe der gebildeten Tumorzellkolonien war durch S100P in den Panc-1-Zellen leicht erhöht (Abb. 27B). Die Tumorzellkolonien der Panc-1-Kontrollzellen waren kleiner als die Tumorzellkolonien der H358-Kontrollzellen (Abb. 27B).

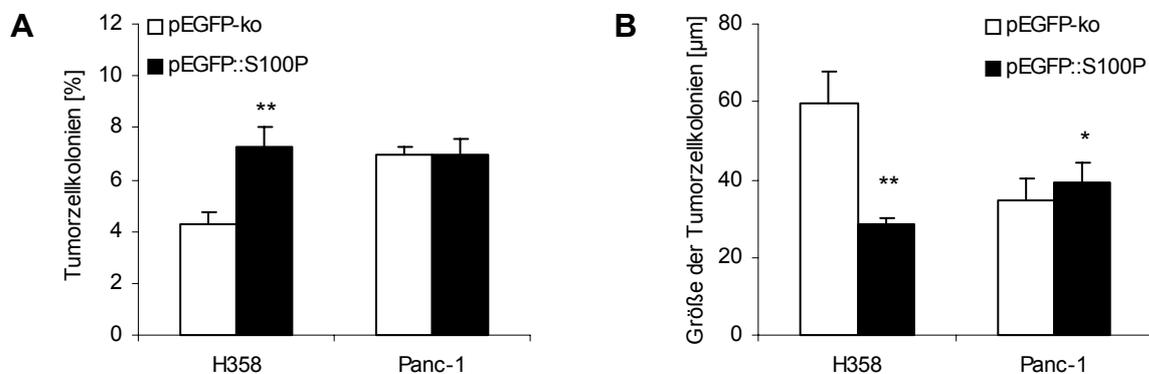


Abb. 27 Einfluss von S100P auf die Bildung und das Größenwachstum von Tumorzellkolonien von H358-Zellen und Panc-1-Zellen *in vitro*

Einzelzellen von H358-Zellen und Panc-1-Zellen wurden über einen Zeitraum von vier Wochen in 0,6%igen Softagar kultiviert und am Mikroskop deren Anzahl und deren durchschnittliche Größe ausgewertet. **A)** Die Anzahl der gebildeten Tumorkolonien mit einer Mindestgröße von 20 μm bezieht sich prozentual auf 20 000 eingesetzte Einzelzellen. **B)** Die durchschnittliche Größe der Tumorkolonien wurde durch die Mittlung von jeweils 100 zufällig ausgewählten Tumorzellkolonien ausgewertet. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler ($n=6$) mit $*p \leq 0,05$ und $**p \leq 0,01$ vs. pEGFP-ko angegeben.

Der Einfluss von S100P auf die Migration der Panc-1-Zellen wurde mittels Transwell-Assay untersucht. Im Gegensatz zu den H358-Zellen konnte für die Panc-1-Zellen eine verbesserte Migration in Abhängigkeit von S100P gezeigt werden (Abb. 28). Da die Panc-1-Zellen im Vergleich zu den H358-Zellen besser migrieren, wurde zusätzlich der Einfluss von

S100P auf die gut migrierende humane Bronchialkarzinom-Zelllinie H322 im Transwell-Assay untersucht. Die H322-Zellen zeigten ebenso wie die Panc-1-Zellen eine verbesserte Migration durch die Überexpression von S100P (Abb. 28).

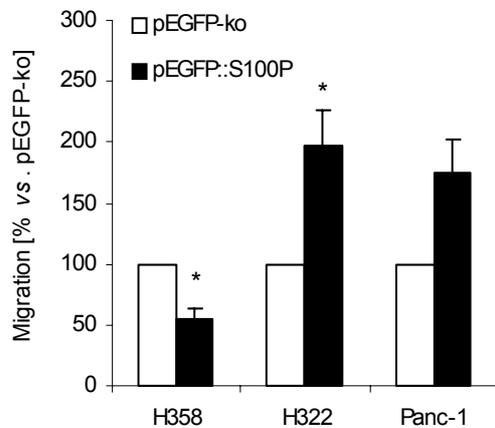


Abb. 28 Einfluss von S100P auf die Migration von Bronchialkarzinom- und Pankreaskarzinomzellen im Transwell-Assay

Im Transwell-Assay wurde der Einfluss von S100P auf Bronchialkarzinomzellen (H358, H322) und Pankreaskarzinomzellen (Panc-1) untersucht. Die Zellen wurden auf eine poröse Membran (Porengröße=8 µm) ausgesetzt. Die gerichtete Migration der Zellen erfolgte durch die Serumstimulation (0 % FCS im Insert, 10 % FCS in der Zellkulturschale). Die Auswertung der Migration erfolgte abhängig von der Migrationsfähigkeit für die H358-Zellen nach 6 d, für die H322-Zellen nach 3 d und für die Panc-1-Zellen nach 2 d mittels Alamar Blue-Assay. Es sind die Mittelwerte ± Standardfehler (n=4) mit * $p \leq 0,05$ vs. pEGFP-ko angegeben.

Für das Tumorwachstum und die Migration von Tumorzellen sind intrazelluläre und extrazelluläre Faktoren notwendig. Es ist bekannt, dass Tumorzellen *in vivo* Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) freisetzen, welche die umgebende Matrix abbauen und den Zellen somit ermöglichen, invasiv zu wachsen und zu migrieren [Yano *et al.*, 2003]. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob S100P einen Einfluss auf die Freisetzung der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 hat. Hierfür wurden die Zellkulturüberstände mittels Zymographie untersucht. Für die H358-Zellen konnte im Allgemeinen nur eine sehr schwache Aktivität von MMP-2 (72 kDa) und MMP-9 (92 kDa) gezeigt werden. Für die Panc-1-Zellen hingegen konnte eine starke Aktivität von MMP-2 und eine schwache Aktivität von MMP-9 nachgewiesen werden (Abb. 29). S100P hatte dabei keinen Einfluss auf die Aktivität der MMPs im Überstand.

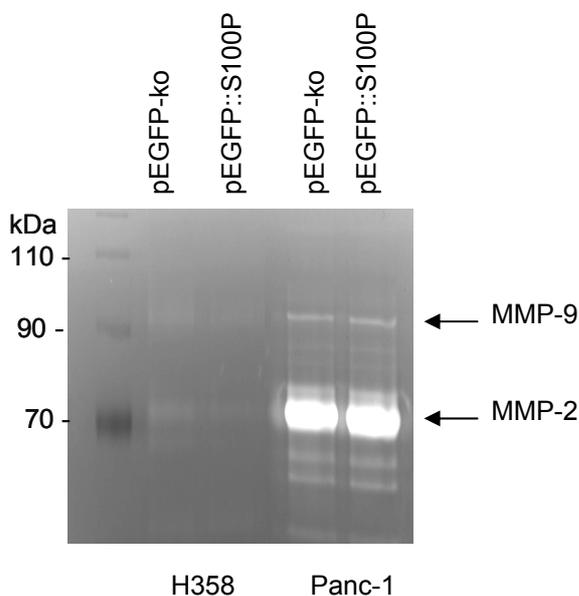


Abb. 29 Einfluss von S100P auf die Freisetzung von MMP-2 und MMP-9 durch H358- und Panc-1-Zellen

Die Zellkulturüberstände (ohne FCS) von H358- und Panc-1-Zellen wurden im Zymographie-Gel (mit 2 mg/ml Gelatine) analysiert. MMP-2 läuft bei einer Größe von 72 kDa, MMP-9 ist bei einer Größe von 92 kDa nachweisbar. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

3.4. Expression, Lokalisierung und intrazelluläre Funktion von S100P in H358-Zellen

Die Analyse von Zellkulturüberständen der S100P-überexprimierenden H358-Zellen ergab im Vergleich zu den H358-Kontrollzellen keine erhöhte Freisetzung von S100P ins Medium. Des Weiteren konnte kein Einfluss von extrazellulärem S100P auf die Proliferation, Migration oder Phagozytose der H358-Zellen durch die Kultivierung der Zellen in konditioniertem Medium von S100P-überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass S100P hauptsächlich durch intrazelluläre Interaktionen Einfluss auf die Malignität der H358-Zellen nimmt. Ziel der folgenden Versuche war es deshalb, die Regulation der mRNA-Expression, die intrazelluläre Lokalisierung und potentielle Interaktionspartner von S100P zu untersuchen.

3.4.1. Einfluss der DNA-Methylierung auf die mRNA-Expression von S100P

Bei Krebserkrankungen führt eine veränderte Methylierung der DNA häufig zu einer veränderten Aktivität betroffener Gene [Ehrlich, 2002]. Durch den Einsatz des Cytosin-Analogons 5-Aza-2'-deoxycytidine (AzDe) wurde die DNA *in vitro* demethyliert. Durch die Inkubation von H358-Zellen mit AzDe zeigte sich nach zwei Tagen eine erhöhte mRNA-Expression von S100P (Abb. 30A). Als Positiv-Kontrolle für die Demethylierung der DNA wurde die mRNA des Tumorsuppressors DLC (*deleted in liver cancer*)-1 amplifiziert, welches in vielen Krebszelllinien reprimiert ist und durch die AzDe-vermittelte Demethylierung reaktiviert werden kann [Yuan *et al.*, 2004] (Abb. 30A). Darüber hinaus wurde die Expression der Gesamt-S100P-mRNA unter Verwendung der Klonierungsprimer von S100P (Tab. 3) und die endogen exprimierte S100P-mRNA unter Verwendung der RT-PCR-Primer für S100P (*sense*-Primer bindet in der 5' untranslatierten Promoterregion; Tab. 3) untersucht. Es zeigte sich, dass durch die Überexpression von S100P in den H358-Zellen die endogene S100P-mRNA vermindert exprimiert ist (Abb. 30B).

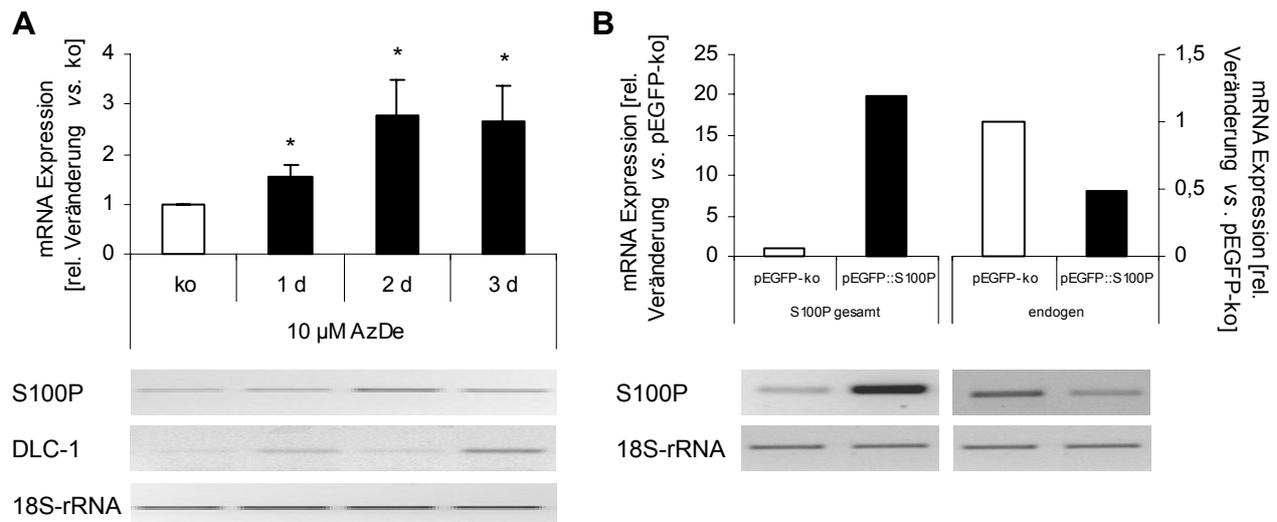


Abb. 30 Einfluss der DNA-Methylierung und der S100P-Überexpression auf die endogene mRNA-Expression von S100P in H358-Zellen

A) H358-Zellen wurden für 1, 2 und 3 Tage mit 10 µM AzDe inkubiert und die mRNA-Expression von S100P und DLC-1 (als Positivkontrolle) untersucht. Die Expressionswerte wurden im Vergleich zur 18S-rRNA ermittelt. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler ($n=6$) mit $*p \leq 0,05$ vs. unbehandelte Kontrolle (ko) angegeben. **B)** Mit spezifischen Primerpaaren wurde die Expression der gesamten S100P-mRNA (endogen + Überexpression) und der endogenen S100P-mRNA von H358-Zellen untersucht. Die Expressionswerte wurden im Vergleich zur 18S-rRNA ermittelt.

3.4.2. Intrazelluläre Lokalisierung von S100P

Vielen S100-Proteinen wird aufgrund ihrer Lokalisierung eine spezifische Wirkweise zugeschrieben. Bislang war für S100P keine genaue Lokalisierung in der Zelle bekannt. Durch die Fusion mit GFP konnte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie in den H358-Zellen eine Lokalisierung von S100P im Zellplasma und im Zellkern beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war die GFP-Fluoreszenz der pEGFP-ko-Zellen ubiquitär in der Zelle verteilt (Abb. 31A). Darüber hinaus wurde die Lokalisierung von GFP-S100P in den Zellen mittels Zellfraktionierung und anschließendem Immuno-Blot überprüft. Hierbei diente der Nachweis von HMGB1 als Kernprotein und von Ezrin als Protein des Zellplasmas als Positivkontrollen für die einzelnen Fraktionen. Für GFP-S100P konnte anhand dieser Methode ebenfalls eine Lokalisierung im Zellkern und im Zellplasma detektiert werden. Allerdings war im Vergleich zur Fluoreszenz-Mikroskopie weniger GFP-S100P in der Zellkern-Fraktion nachweisbar (Abb. 31B).

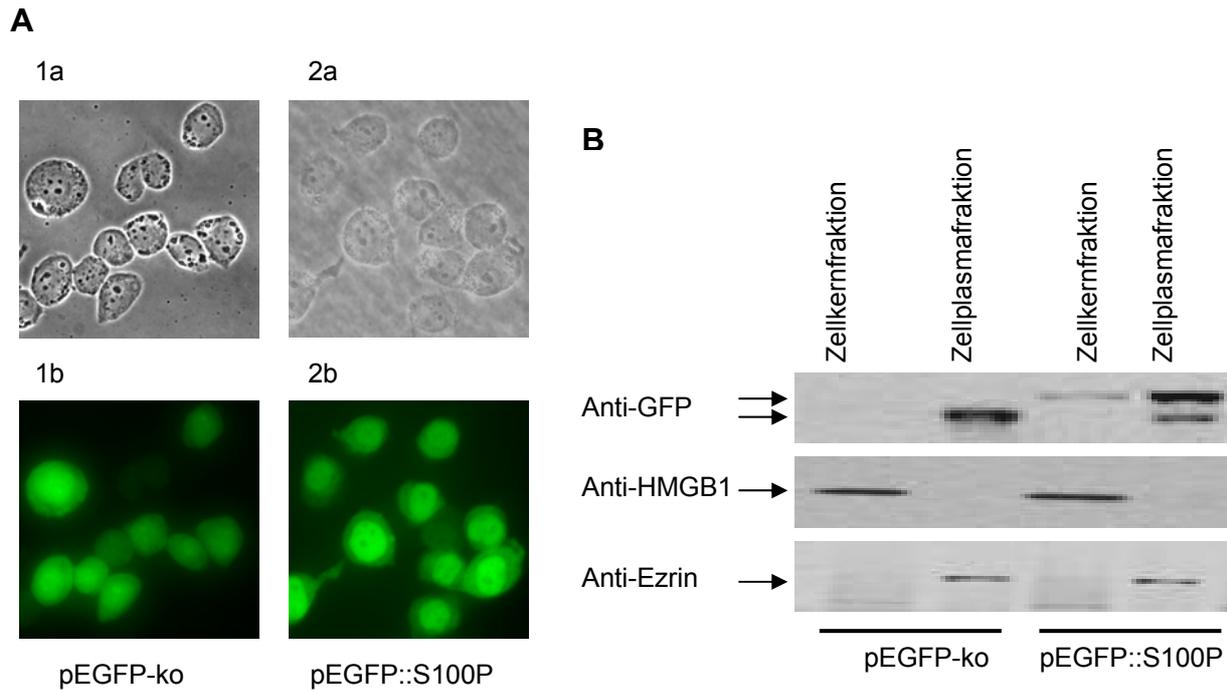


Abb. 31 Intrazelluläre Lokalisierung von GFP-S100P in H358-Zellen

A) H358-Zellen wurden stabil mit dem Kontrollvektor pEGFP-ko (1a, 1b) bzw. mit dem pEGFP::S100P-Vektor (2a, 2b) transfiziert. Dargestellt sind sowohl Durchlicht- (1a, 2a) als auch Fluoreszenz-Aufnahmen (1b, 2b). **B)** Nach der Fraktionierung von H358-Zellen über einen Sucrosegradienten wurden Zellkern- und Zellplasmafraktionen im Immuno-Blot mittels Anti-GFP analysiert. Die Detektion von HMGB1 diente als Kontrolle für die Zellkernfraktion. Ezrin wurde als zytoplasmatisches Protein detektiert. Die Abbildung ist repräsentativ für vier unabhängige Versuche.

Zusätzlich zu den Zellversuchen wurden humane Gewebeschnitte des Bronchialkarzinoms auf die Lokalisierung von S100P untersucht. Die Gewebe wurden anhand ihrer mRNA-Expression von S100P ausgewählt. Die Gewebeschnitte des bronchialen Plattenepithelkarzinoms, die sehr wenig S100P exprimieren, dienten als Negativkontrolle für den Anti-S100P-Antikörper (Abb. 32A). In Gewebeschnitten des bronchialen Adenokarzinoms, welche sehr viel S100P exprimieren, konnte S100P intrazellulär detektiert werden (Abb. 32B). Die Verteilung von S100P im Zellkern und Zellplasma der Zellen der Adenokarzinom-Gewebe entsprach der Verteilung von S100P in den H358-Zellen (Abb. 32B; Abb. 31).

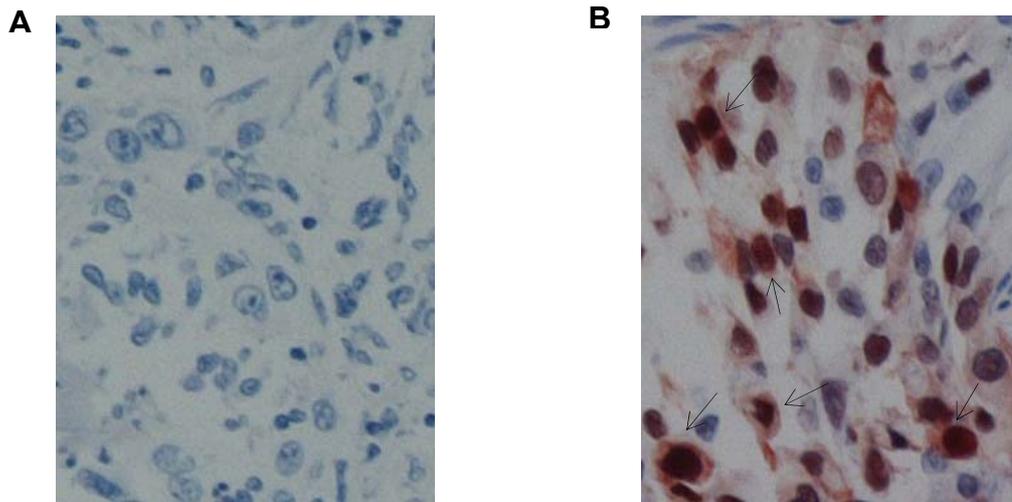


Abb. 32 Immunhistochemie mit Anti-S100P von ausgewählten humanen Bronchialkarzinom-Sektionen
A) Immunhistochemie einer bronchialen Plattenepithelkarzinom-Sektion; B) Immunhistochemie einer bronchialen Adenokarzinom-Sektion; blau – Hämalaun-Färbung des Zellkerns, braun – DAB-Färbung von S100P

3.4.3. Einfluss des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts auf die Polymerisierung von GFP-S100P

Die Bindung von S100-Proteinen an ihre Zielproteine erfolgt Ca^{2+} -abhängig und erfordert die Dimerisierung oder Polymerisierung der S100-Proteine [Donato, 2007]. Aus diesem Grund wurde zunächst überprüft, unter welchen Bedingungen eine Dimerisierung des überexprimierten GFP-S100P stattfindet. Die H358-Zellen wurden hierfür mit Thapsigargin behandelt. Thapsigargin inhibiert die Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen Reticulums, wodurch es zu einer schnellen Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern kommt. Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich mit 2% Formaldehydlösung fixiert, um potentielle Interaktionspartner zu quervernetzen. Die Zellysate wurden mit Anti-GFP immunpräzipitiert und im Immuno-Blot analysiert. Es konnten nur in dem mit Thapsigargin stimulierten und mit Formaldehyd fixierten Präzipitat der pEGFP::S100P-Zellen Proteinbanden bei ca. 72 kDa und 110 kDa detektiert werden, die auf eine Dimer- bzw. Trimerbildung von GFP-S100P (24 kDa + 12 kDa = 36 kDa) hinweisen (Abb. 33).

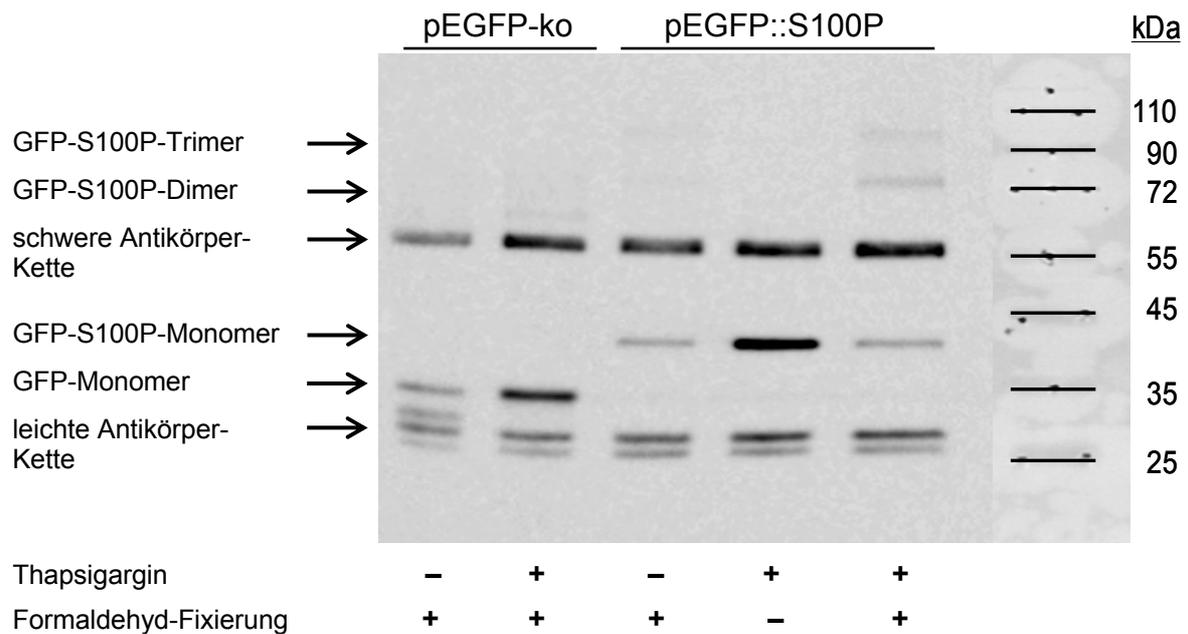


Abb. 33 Einfluss des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts auf die Polymerisierung von GFP-S100P in H358-Zellen
 H358-Zellen wurden für 2 h mit 1 μM Thapsigargin behandelt und/oder mit 2 % Formaldehydlösung fixiert (- unbehandelt bzw. unfixiert; + behandelt bzw. fixiert). Die im Immuno-Blot aufgetragene Immunpräzipitation wurde mit Anti-GFP detektiert. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

3.4.4. Ezrin als intrazellulärer Interaktionspartner von S100P

Verschiedene S100-Proteine vermitteln ihre regulatorische Funktion intrazellulär über die Bindung an Interaktionspartner. Auch für S100P sind verschiedene intrazelluläre Interaktionspartner bekannt, so z. B. Ezrin [Filipek *et al.*, 2002; Koltzschner *et al.*, 2003]. Für die Überprüfung der Interaktion von GFP-S100P mit Ezrin in H358-Zellen wurden die Zellen mit Thapsigargin behandelt, da die Bindung der S100-Proteine an ihre Zielproteine vom Ca^{2+} -Gehalt der Zellen und der daraus folgenden Dimerbildung abhängig ist. Die Zellen wurden für die Immunzytochemie nach der Behandlung mit Thapsigargin mit 2 % Formaldehydlösung fixiert und mit Anti-Ezrin gefärbt. Am Fluoreszenz-Mikroskop wurde durch die Behandlung mit Thapsigargin eine Kollokalisierung von S100P (grün fluoreszierend; 488 nm) und Ezrin (rot fluoreszierend, 594 nm) mit Hilfe der Überlagerung der beiden Fluoreszenz-Signale (Gelbfluoreszenz) in den S100P überexprimierenden H358-Zellen beobachtet. Weder die Kontrollzellen noch die unbehandelten S100P überexprimierenden H358-Zellen zeigten diese Überlagerung der Fluoreszenz-Signale (Abb. 34).

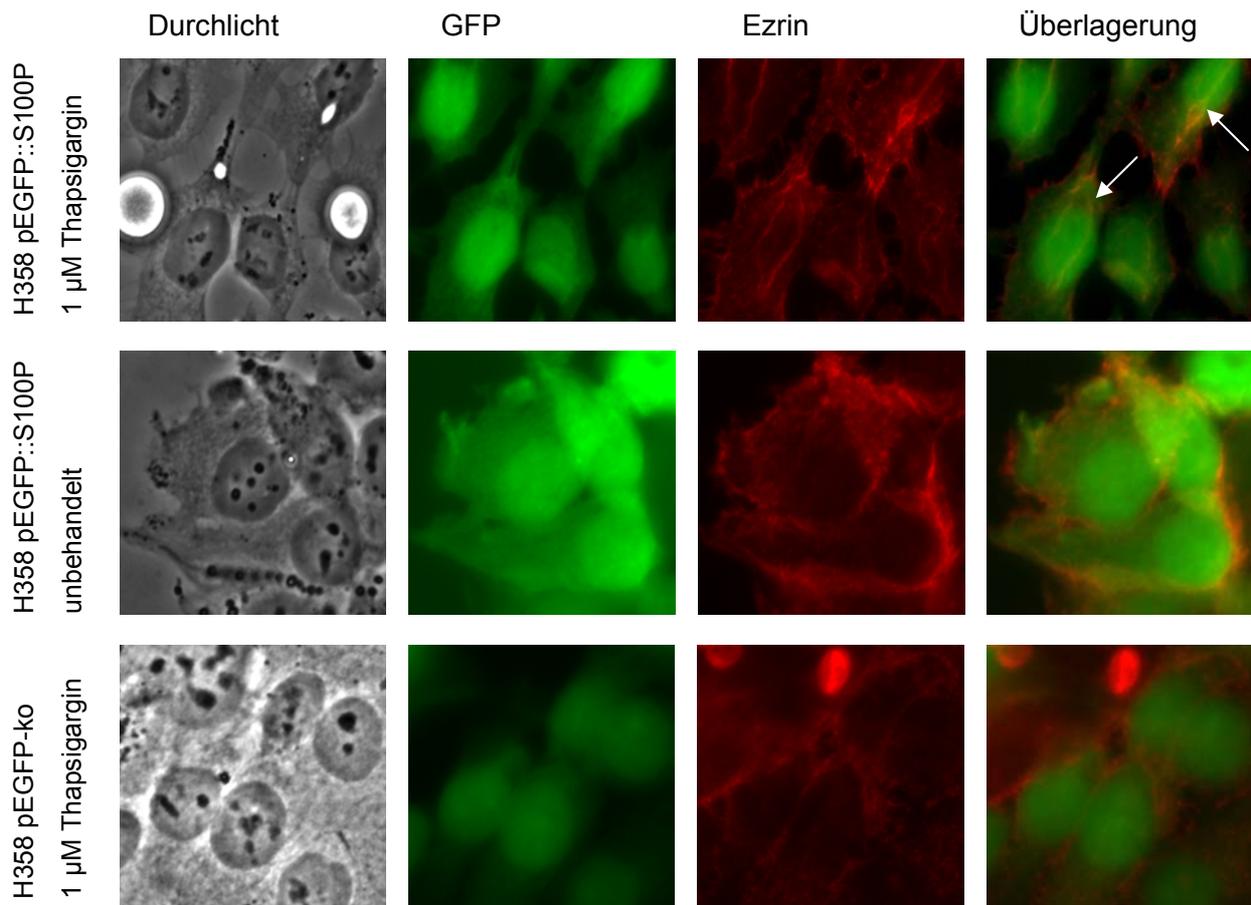


Abb. 34 Kolokalisierung von S100P mit Ezrin infolge eines erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts

S100P überexprimierende H358-Zellen wurden für 2 h mit 1 μ M Thapsigargin behandelt und mit 2% Formaldehydlösung fixiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte, fixierte S100P überexprimierende H358-Zellen bzw. behandelte und fixierte H358-Kontrollzellen. Die Abbildungen stellen die Zellen im Durchlicht, mit GFP-Fluoreszenz (488 nm), mit der Anti-Ezrin-Färbung (594 nm) und in der Überlagerung der beiden Fluoreszenzen dar.

3.4.5. Einfluss der erhöhten Expression von S100P auf die Expression anderer Gene in Geweben und Zellen

Mittels DNA-Mikroarray wurden Tumorgewebe von 40 Patienten mit einem bronchialen Adenokarzinom untersucht (Untersuchungsgruppe) [Hofmann *et al.*, 2006]. Anhand dieser Daten wurde für diese Arbeit die Korrelation der mRNA-Expression von S100P zu der mRNA-Expression anderer Gene im bronchialen Adenokarzinom analysiert. Analog dazu wurde die Gen-Expression in humanen Bronchialkarzinomzellen untersucht. Für den zellbasierten DNA-Mikroarray wurden RNA-Isolate der S100P überexprimierenden H358-Zellen und der H358-Kontrollzellen eingesetzt. Im Folgenden wurde überprüft, welche Gene übereinstimmend in den Geweben und Zellen des bronchialen Adenokarzinom mit der S100P-Expression korrelieren.

In den Gewebeproben der Untersuchungsgruppe konnten Gene identifiziert werden, deren mRNA-Expression positiv oder negativ mit der mRNA-Expression von S100P korrelierten. Der Korrelationskoeffizient sollte dabei größer als 0,3 oder kleiner als -0,3 mit einem

p-Wert < 0,05 sein. Die Auswertung der H358-Zelldaten ergab für einige Gene eine den Patientendaten entsprechende Korrelation in Abhängigkeit von der S100P-Überexpression (Tab. 9). Drei Gene wurden aufgrund ihrer Korrelation zur mRNA-Expression von S100P und ihrer hohen Expressionsrate für weiterführende Analysen ausgewählt. Die Gene sind NET-7, Porcupine und SMURF2 (Tab. 9).

Tab. 9: DNA-Microarray-Analyse von Patientendaten und Zelldaten in Abhängigkeit der mRNA-Expression von S100P

Gen-Name	Gen-Symbol	UniGene-Nummer	Patientendaten ^a (n=40; Untersuchungsgruppe)		H358-Zelldaten
			S100P-Korrelation r-Wert	p-Wert	ΔExpression nach S100P-ÜE [%]
Membranproteine					
transmembrane protein 2	TMEM2	NM_013390	0,447	0,0026	167
transmembrane 4 superfamily member	NET-7	NM_012339	0,364	0,0163	194
tetraspan 1	TSPAN-1	NM_005727	0,372	0,0141	110
chloride channel 3		NM_173872	0,560	<0,0001	214
amino acid system N transporter 2	Porcupine	NM_022825	0,638	<0,0001	147
Rezeptoren					
G protein-coupled receptor 35	GPR35	NM_005301	0,465	0,0017	154
Mikrotubuli-assoziierte Proteine					
microtubule-associated protein 7		NM_003980	0,505	<0,0005	167
mitochondriale Proteine					
ATP-binding cassette, sub-family D, member 4	ABCD4	NM_005050	-0,337	0,0269	66
creatine kinase, mitochondrial 1	CKMT1	NM_020990	0,343	0,0242	143
Kinasen					
cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1		NM_003885	-0,393	0,0091	79
mitogen-activated protein kinase 12	MAPK12	NM_002969	-0,409	0,0064	83
glycerol kinase	GK	NM_000167	0,553	0,0001	259
enzymatisch wirksame Proteine					
acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase	ASML3B	NM_014474	0,303	0,0479	141
carbonyl reductase 1	CBR1	NM_001757	0,402	0,0076	115
E3 ubiquitin ligase SMURF2	SMURF2	NM_022739	-0,388	0,0102	68
prostaglandin E synthase	PTGES	NM_004878	0,622	<0,0001	156

* - rel. Veränderung der mRNA-Expression von H358 pEGFP::S100P vs. H358 pEGFP-ko

... - in weiteren Versuchen analysierte Gene

^a - Daten Hofmann *et al.*, 2006

Die positive Korrelation der mRNA-Expression von S100P mit der mRNA-Expression von NET-7 und Porcupine und die negative Korrelation mit der mRNA-Expression von SMURF2 in den stabil S100P-überexprimierenden H358-Zellen konnte mittels Real-Time-PCR bestätigt werden. Im Gegensatz dazu konnte dieser Effekt in transient mit pEGFP::S100P-transfizierten A549-, H322- und H358-Zellen nach zweitägiger Kultivierung nicht bestätigt werden (nicht gezeigt).

3.4.6. Korrelation der mRNA-Expression von NET-7, Porcupine und SMURF2 mit der mRNA-Expression von S100P in humanen Bronchialkarzinom-Geweben

Zur Überprüfung der DNA-Mikroarray-Daten wurden zusätzlich Gewebe von 16 zufällig ausgewählten Patienten mit einem bronchialen Adenokarzinom mittels Real-Time-PCR untersucht (Validierungsgruppe). Die Gewebe wurden auf die mRNA-Expression von NET-7, Porcupine und SMURF2 im Vergleich zur mRNA-Expression von S100P analysiert. Die mRNA-Expression von S100P, NET-7, Porcupine und SMURF2 im Tumorgewebe wurde hierfür im Vergleich zur gen-spezifischen mRNA-Expression im histologisch normalen Lungengewebe des gleichen Patienten prozentual ausgewertet. Entsprechend der DNA-Mikroarray-Daten konnte auch die Real-Time-PCR eine positive Korrelation der mRNA-Expression von NET-7 und Porcupine mit der mRNA-Expression von S100P im bronchialen Adenokarzinom zeigen (Abb. 35A und B). Im Gegensatz zu den DNA-Mikroarray-Daten korreliert die mRNA-Expression von SMURF2 in der Real-Time-PCR nicht mit der mRNA-Expression von S100P (Abb. 35C).

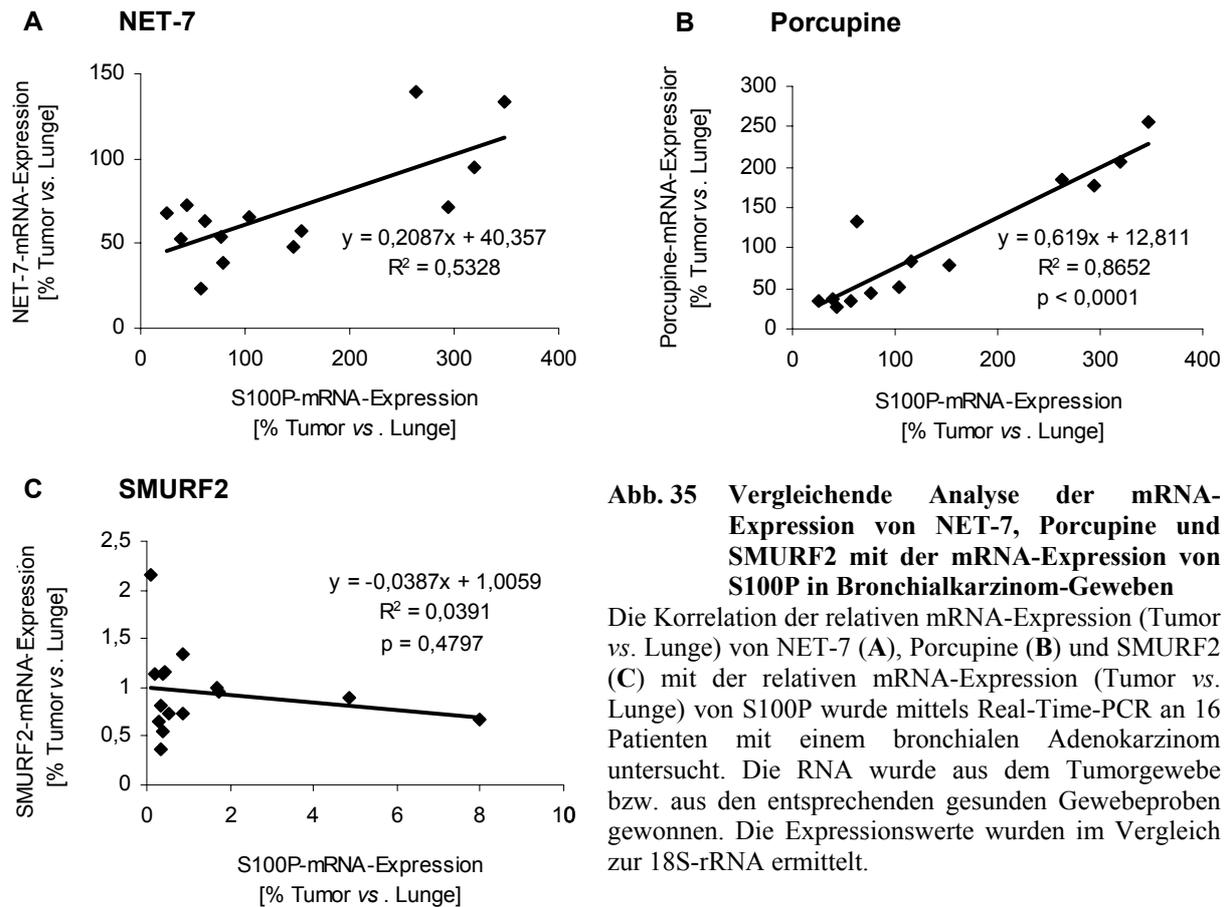


Abb. 35 Vergleichende Analyse der mRNA-Expression von NET-7, Porcupine und SMURF2 mit der mRNA-Expression von S100P in Bronchialkarzinom-Geweben

Die Korrelation der relativen mRNA-Expression (Tumor vs. Lunge) von NET-7 (A), Porcupine (B) und SMURF2 (C) mit der relativen mRNA-Expression (Tumor vs. Lunge) von S100P wurde mittels Real-Time-PCR an 16 Patienten mit einem bronchialen Adenokarzinom untersucht. Die RNA wurde aus dem Tumorgewebe bzw. aus den entsprechenden gesunden Gewebeproben gewonnen. Die Expressionswerte wurden im Vergleich zur 18S-rRNA ermittelt.

3.4.7. Regulation der mRNA-Expression von S100P und Porcupine

In den Bronchialkarzinom-Geweben wurde eine positive Korrelation der mRNA-Expression von S100P und Porcupine gezeigt (Abb. 35B). Durch die transiente Überexpression von S100P in Bronchialkarzinom-Zellen konnte dieser Effekt nicht erzeugt werden bzw. war sogar umgekehrt (nicht gezeigt). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, inwieweit sich die mRNA-Expression von S100P und Porcupine gegenseitig beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden die drei Bronchialkarzinom-Zelllinien A549, H322 und H358 mit der spezifischen siRNA gegen S100P bzw. gegen Porcupine transfiziert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einer Kontroll-siRNA behandelt, die mit keiner bekannten Gen-Sequenz übereinstimmte.

Durch die Behandlung mit der S100P siRNA konnte in allen drei Zelllinien eine Verringerung der mRNA-Expression von S100P gezeigt werden. Diese hatte jedoch keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Porcupine (Abb. 36A). Die Behandlung der Zellen mit Porcupine siRNA zeigte ebenfalls in allen drei Zelllinien eine Verringerung der mRNA-Expression von Porcupine um ca. 50 % (Abb. 36B). Die Behandlung mit Porcupine siRNA führte darüber hinaus zu einer verminderten mRNA-Expression von S100P in den H322- und den H358-Zellen, aber nicht in den A549-Zellen. Dieser Effekt war besonders in den ersten beiden Tagen der Behandlung zu beobachten (Abb. 36B).

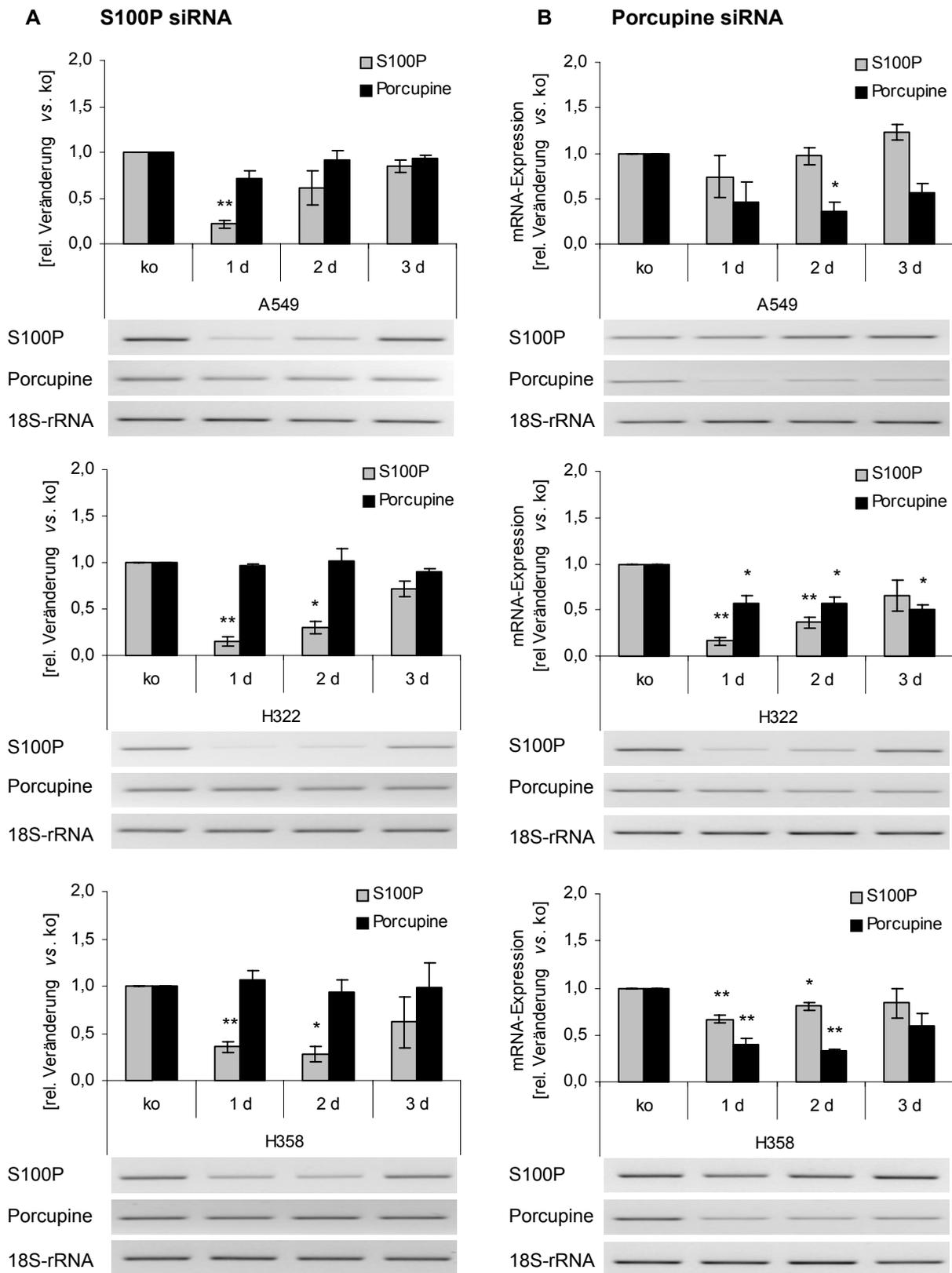


Abb. 36 Reverser Einfluss der mRNA-Expression von Porcupine und S100P

Die A549-, H322- und H358-Zellen wurden für ein, zwei oder drei Tage mit der S100P siRNA und Porcupine siRNA behandelt. Die Kontrollzellen (ko) wurden mit einer Kontroll-siRNA behandelt. Die mRNA-Expression von S100P und Porcupine wurde im Vergleich zur 18S-rRNA ermittelt. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=3) mit * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ vs. Kontrollzellen angegeben.

In den vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von S100P in H358-Zellen durch die Demethylierung der DNA mittels AzDe erhöht war (Abb. 30A) und durch die Behandlung mit Porcupine siRNA vermindert wurde (Abb. 36B). Aus diesem Grund sollte zusätzlich untersucht werden, welchen Einfluss der Methylierungstatus der DNA auf die mRNA-Expression von Porcupine hat. Durch die Behandlung von H358-Zellen mit AzDe wurde die Expression von Porcupine jedoch nicht beeinflusst (Abb. 37).

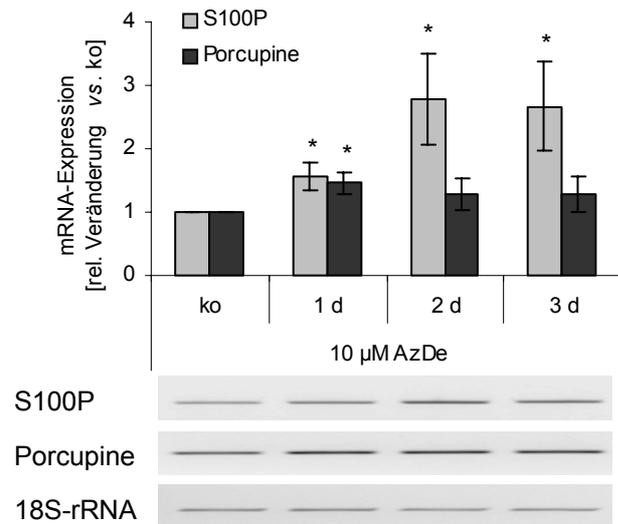


Abb. 37 Vergleich der mRNA-Expression von S100P und Porcupine infolge der AzDe-Behandlung von H358-Zellen

H358-Zellen wurden für 1, 2 und 3 Tage mit 10 µM AzDE inkubiert, um die mRNA-Expression von S100P und Porcupine infolge von Demethylierung zu untersuchen. Die Expressionswerte wurden im Vergleich zur 18S-rRNA ermittelt. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler ($n=6$) mit $*p \leq 0,05$ vs. unbehandelte Kontrolle (ko) angegeben.

3.4.8. Einfluss der Expression von Porcupine und S100P auf die Expression von β -Catenin

Chen *et al.* zeigt, dass eine reduzierte Expression von Porcupine in Bronchialkarzinom-Zelllinien zu einer verminderten Aktivität von *downstream*-Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalweges führte [Chen *et al.*, 2008]. Durch diesen Signalweg werden Gene reguliert, die an der Zellproliferation und Zelldifferenzierung beteiligt sind (z.B. *cyclin D1*, *c-myc*). Eine konstitutive Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges trägt unter anderem zur Entwicklung von Tumorerkrankungen bei [Takahashi-Yanaga & Sasaguri, 2007]. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, welchen Einfluss die veränderte mRNA-Expression von Porcupine und eine gleichzeitig veränderte Expression von S100P auf die Protein-Expression von β -Catenin in den H322- und H358-Zellen ausübt. Zunächst konnte bestätigt werden, dass durch die verminderte mRNA-Expression von Porcupine mittels spezifischer siRNA die Protein-Expression von β -Catenin in den untersuchten Bronchialkarzinom-Zelllinien über zwei Tage verringert war (Abb. 38).

Die H322-Zellen und die H358-Zellen zeigten, im Gegensatz zu den A549-Zellen, eine verminderte mRNA-Expression von S100P infolge der Behandlung mit Porcupine siRNA (Abb. 36B). Um diesen Effekt zu kompensieren und den Einfluss von S100P auf die verminderte Protein-Expression von β -Catenin zu überprüfen, wurden diese Zellen zusätzlich zur Behandlung mit der Porcupine siRNA mit dem pEGFP::S100P-Vektor transfiziert. In den

H322-Zellen hatte diese Doppeltransfektion keinen weiteren Einfluss auf die Protein-Expression von β -Catenin. Die H358-Zellen hingegen zeigten durch die Doppeltransfektion von Porcupine siRNA und pEGFP::S100P eine zusätzlich verringerte Protein-Expression von β -Catenin über einen Zeitraum von drei Tagen (Abb. 38).

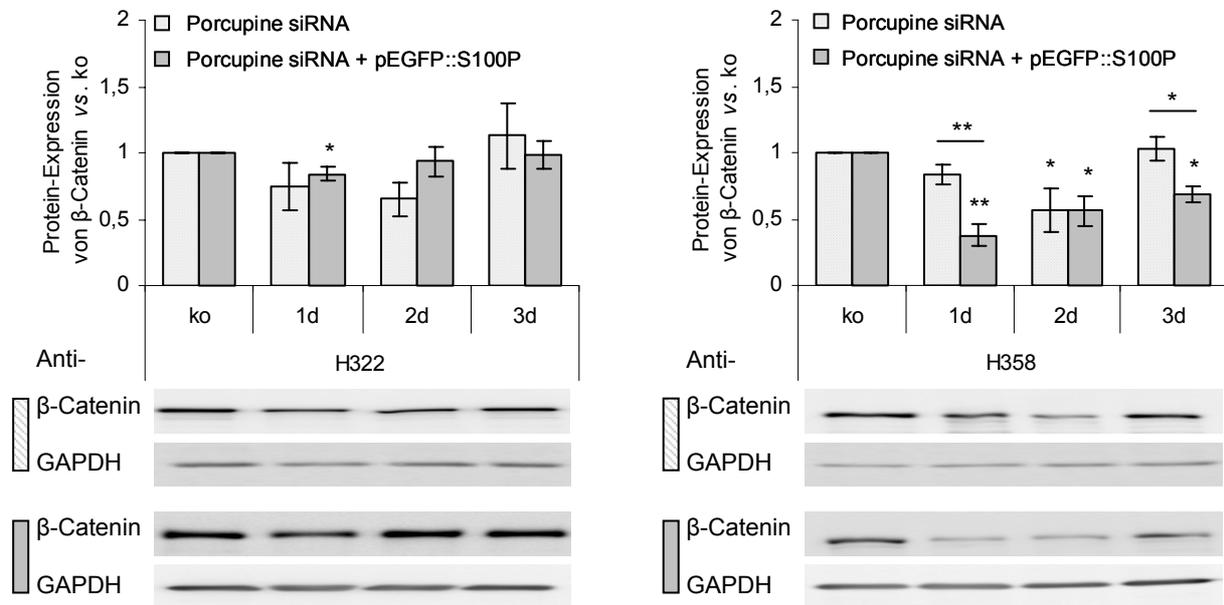


Abb. 38 Einfluss der Expression von Porcupine und S100P auf die Protein-Expression von β -Catenin

Die H322- und H358-Zellen wurden für ein, zwei oder drei Tage mit der Porcupine siRNA behandelt. Zusätzlich wurde ein Teil der H322-Zellen und der H358-Zellen mit pEGFP::S100P transfiziert. Die Kontrollzellen (ko) wurden mit einer Kontroll-siRNA bzw. mit pEGFP-ko transfiziert. Es wurden 20 μ g Totalproteinlysate im Immuno-Blot mit dem β -Catenin-spezifischem Antikörper analysiert. Die Protein-Expression wurde im Vergleich zur GAPDH ermittelt. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n=6) mit * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ vs. Kontrolle angegeben.

Zusätzlich zu dem Wnt-Signalweg wird die Protein-Expression von β -Catenin infolge der Ubiquitinylierung durch CacyBP/SIP beeinflusst [Filipek, 2006]. Darüber hinaus ist CacyBP/SIP ein potentieller Interaktionspartner von S100P [Filipek *et al.*, 2002]. Die mRNA-Expression von CacyBP/SIP wurde deshalb in den H358-Zellen überprüft. Mittels RT-PCR konnte die mRNA-Expression von CacyBP/SIP in den H358-Zellen nachgewiesen werden, die jedoch nicht durch die S100P-Überexpression beeinflusst war (nicht gezeigt).

4. Diskussion

Das Bronchialkarzinom ist die Krebserkrankung mit der höchsten Mortalitätsrate weltweit [Parkin *et al.*, 2005]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine Diagnose des Bronchialkarzinoms meist erst in vorangeschrittenen Stadien der Erkrankung gestellt wird. Zu diesem Zeitpunkt haben sich oftmals schon Metastasen in anderen Organen gebildet. Des Weiteren erschwert eine hohe Chemotherapie-Resistenz die Behandlung des Bronchialkarzinoms [Junker *et al.*, 2003]. Aus diesem Grund ist die Erforschung der genetischen Veränderungen, die zur Entstehung und Entwicklung dieser Tumorerkrankung beitragen, von essentieller Bedeutung.

Im bronchialen Adenokarzinom konnte eine erhöhte Expression des S100-Proteins S100P im Vergleich zu dem entsprechenden normalen Epithelgewebe gezeigt werden [Bartling *et al.*, 2007]. Auch in anderen Tumorerkrankungen, wie dem Zervixkarzinom [Gibadulinova *et al.*, 2005], dem Mammakarzinom [Guerreiro Da Silva *et al.*, 2000] und dem Pankreaskarzinom [Ohuchida *et al.*, 2006], wurde eine erhöhte Expression von S100P gegenüber dem normalen Gewebe festgestellt. Es wird angenommen, dass S100P einen negativen Einfluss auf den Verlauf von Tumorerkrankungen hat [Arumugam *et al.*, 2005; Basu *et al.*, 2008; Surowiak *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006], und dass es die Entwicklung von Chemotherapie-Resistenzen beeinflusst [Bertram *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008]. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von S100P auf die Entstehung und Entwicklung des bronchialen Adenokarzinoms in dieser Arbeit *in vitro* untersucht. Im Gegensatz zu S100P ist die Expression des Zelloberflächenrezeptors RAGE im Bronchialkarzinom im Vergleich zu dem normalen Lungengewebe vermindert [Bartling *et al.*, 2005]. Da RAGE ein Rezeptor für extrazelluläres S100P ist [Arumugam *et al.*, 2004; Fuentes *et al.*, 2007] und ebenfalls vermutet wird, dass RAGE die Tumorigenität von Zellen beeinflusst [Logsdon *et al.*, 2007; Taguchi *et al.*, 2000], wurde gleichzeitig der Einfluss des Verlustes von RAGE im Bronchialkarzinom *in vitro* untersucht.

4.1. Die Expression der S100-Proteine im Bronchialkarzinom

4.1.1. Die mRNA-Expression von S100P und potentieller Interaktionspartner in Geweben und Zellen des bronchialen Adenokarzinoms

S100P gehört zu den S100-Proteinen, das in vielen Tumorerkrankungen erhöht exprimiert wird und dem im Mammakarzinom [Wang *et al.*, 2006], im Pankreaskarzinom [Arumugam *et al.*, 2005], im Kolonkarzinom [Fuentes *et al.*, 2007] sowie im Prostatakarzinom [Wang *et al.*, 2007] eine tumorfördernde Wirkung zugeschrieben wird. Um den Einfluss von S100P im bronchialen Adenokarzinom näher charakterisieren zu können, wurde zunächst die mRNA-Expression von S100P im Vergleich zu den potentiellen Interaktionspartnern S100A1 [Wang *et al.*, 2004] und S100Z [Gribenko *et al.*, 2001] sowie zu weiteren tumorrelevanten S100-

Proteinen (Tab. 10) in bronchialen Adenokarzinom-Zelllinien und -Geweben analysiert. Die mRNA-Expression könnte dabei ein Hinweis auf die Protein-Expression der untersuchten Gene sein. Die Korrelation zwischen der Expression auf mRNA- und Protein-Ebene kann jedoch auch durch die posttranskriptionelle Regulation verändert sein.

Tab. 10: Expression und Funktion ausgewählter S100-Proteine in Tumorerkrankungen

S100-Protein	erhöht exprimiert im	vermindert exprimiert im	pro-tumorigen beschrieben	anti-tumorigen beschrieben
S100P	Bronchialkarzinom [Bartling <i>et al.</i> , 2007]; Mammakarzinom [Guerreiro Da Silva <i>et al.</i> , 2000]; Pankreaskarzinom [Crnogorac-Jurcevic <i>et al.</i> , 2003]		Pankreaskarzinom [Arumugam <i>et al.</i> , 2005]; Prostatakarzinom [Basu <i>et al.</i> , 2008]	
S100A1	Nierenkarziom [Salama <i>et al.</i> , 2007]	Ösophaguskarzinom [Ji <i>et al.</i> , 2004]		nicht bekannt
S100Z		nicht bekannt		nicht bekannt
S100A2	Bronchialkarzinom [Bartling <i>et al.</i> , 2007]; Magenkarzinom [El-Rifai <i>et al.</i> , 2002]	Prostatakarzinom [Gupta <i>et al.</i> , 2003]; Melanome [Maelandsmo <i>et al.</i> , 1997]	Bronchialkarzinom [Diederichs <i>et al.</i> , 2004]; [Bulk <i>et al.</i> , 2009]	Karzinome des Kopf- und Nackenbereiches [Nagy <i>et al.</i> , 2001]; [Tsai <i>et al.</i> , 2006]
S100A4	kolorektales Karzinom [Takenaga <i>et al.</i> , 1997]; Magenkarzinom [Cho <i>et al.</i> , 2003]; Prostatakarzinom [Gupta <i>et al.</i> , 2003]		Osteosarkom [Bjornland <i>et al.</i> , 1999]; Pankreas-karzinom [Mahon <i>et al.</i> , 2007]; Prostatakarzinom [Saleem <i>et al.</i> , 2006]	
S100A8/A9	Mammakarzinom [Cross <i>et al.</i> , 2005]; Prostatakarzinom [Hermani <i>et al.</i> , 2005]		Mammakarzinom [Moon <i>et al.</i> , 2008]	

Die mRNA-Expression von S100P konnte in allen untersuchten Bronchialkarzinom-Zelllinien, der Pankreaskarzinom-Zelllinie und in den Gewebeproben des Bronchialkarzinoms und der Lunge gezeigt werden. Zusätzlich zu den Gewebeproben wurden auch Blutpräparate auf die mRNA-Expression der S100-Proteine untersucht, da eine Kontamination der Gewebe mit Blutzellen methodisch nicht ausgeschlossen werden kann und somit die Expressionsdaten beeinflussen kann. Die mRNA-Expression von S100P in den untersuchten Blutpräparaten war jedoch nur schwach bzw. gar nicht nachweisbar. Trotzdem ist der Unterschied der S100P-Expression im Bronchialkarzinom im Vergleich zur Normallunge hier nur gering ausgeprägt. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die mRNA-Expression an zufällig ausgewählten Bronchialkarzinomgeweben verschiedener Stadien untersucht wurde. Da die Expression von S100P vor allem im Frühstadium erhöht und in späteren Stadien wieder normalisiert ist [Bartling *et al.*, 2007], können mögliche Effekte, die zu Beginn der Tumorerkrankung auftraten, in dieser Untersuchung nicht gezeigt werden.

Ähnlich wie für S100P konnte auch für S100A1 und für die potentiellen Onkogene S100A4 und S100A9 die mRNA-Expression in verschiedenen humanen Bronchialkarzinom-Zelllinien und der untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinie sowie in Gewebeproben des Bronchialkarzinoms und der Lunge gezeigt werden. Während eine erhöhte Expression von S100A4 [Hsieh *et al.*, 2003; Takenaga *et al.*, 1997] und S100A9 [Cross *et al.*, 2005; Hermani *et al.*, 2005] für verschiedene Tumorerkrankungen bekannt ist, wurde S100A1, ein potentieller Interaktionspartner von S100P, bisher kaum im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen beschrieben. Die Expressionsanalysen zeigten jedoch für die Bronchialkarzinom-Zelllinie H358 und für das Bronchialkarzinom-Gewebe die mRNA-Expression von S100A1. Demzufolge wäre eine Heterodimerbildung von S100P und S100A1 im Bronchialkarzinom grundsätzlich möglich. In Zellen des Mammakarzinoms konnte z. B. gezeigt werden, dass die Interaktion von S100A1 mit S100A4 die prometastatische Funktion von S100A4 inhibiert [Wang *et al.*, 2004]. Ob eine potentielle Interaktion von S100A1 mit S100P einen Einfluss auf dessen tumorigene Eigenschaften ausübt, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht beurteilt werden.

Ein weiterer potentieller Interaktionspartner von S100P ist S100Z, dessen Expression in Prostata-Zellen gefunden wurde [Gribenko *et al.*, 2001]. Gribenko *et al.* zeigten anhand von *in vitro*-Bindungsstudien eine Bildung von Heterokomplexen zwischen S100P und S100Z. Allerdings konnten sie anhand von Expressionsstudien in verschiedenen Karzinomen keinen Zusammenhang von S100Z mit Tumorerkrankungen herstellen [Gribenko *et al.*, 2001]. Auch in den von uns untersuchten Karzinom-Zelllinien und -Geweben konnte für S100Z nur eine sehr schwache bis gar keine Expression auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, so dass S100Z als Heterodimerbildner mit S100P im Bronchialkarzinom weniger in Frage kommt.

Zusätzlich zu den intrazellulären S100-Bindungspartnern von S100P beschreibt Arumugam in seinen Arbeiten am Pankreaskarzinom eine extrazellulär vermittelte Funktion von S100P durch die Interaktion mit RAGE [Arumugam *et al.*, 2004; Arumugam *et al.*, 2005]. Auch für andere extrazelluläre S100-Proteine wurde eine Signaltransduktion durch die Bindung an den Multiligandenrezeptor RAGE beschrieben [Hermani *et al.*, 2006; Hsieh *et al.*, 2004]. Aus diesem Grund wurde auch in der vorliegenden Arbeit die mRNA-Expression von RAGE untersucht. Die RAGE-mRNA ist vor allem in der H322-Zelllinie und den Gewebeproben nachweisbar. Frühere Studien haben gezeigt, dass RAGE im NSCLC gegenüber dem normalen Lungengewebe vermindert exprimiert wird [Bartling *et al.*, 2005]. Da RAGE auch in den Blutpräparationen nachweisbar war, könnte die Kontamination der Gewebe mit Blutzellen eine Erklärung für die relativ hohe Expression des Rezeptors in dem Bronchialkarzinom-Gewebe sein. Da die mRNA-Expression von RAGE in der H358-Zelllinie nur schwach war, bleibt zu klären, welchen Einfluss der Verlust von RAGE in Zusammenhang mit der Expression von S100P auf die Tumorigenität der Zellen hat.

In den von uns untersuchten Bronchialkarzinom-Zelllinien und -Geweben konnte außerdem die mRNA-Expression von S100A8 und S100A9 gezeigt werden. Eine erhöhte Expression

dieser S100-Proteine wurde mittels Immunhistochemie auch im Mammakarzinom und dem Prostatakarzinom gezeigt [Cross *et al.*, 2005; Hermani *et al.*, 2005]. Durch die Behandlung von Mammakarzinom-Zellen mit siRNA gegen S100A8 und S100A9 konnte die Invasion und die Migration der Zellen inhibiert werden. Es wird deshalb vermutet, dass diese S100-Proteine zum metastatischen Potential der Zellen beitragen [Moon *et al.*, 2008]. Obwohl S100A8 und S100A9 in den meisten untersuchten Studien als Heterodimere agieren [Ghavami *et al.*, 2004; Hermani *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2008], wurde die mRNA von S100A9 in allen von uns untersuchten Karzinomzelllinien nachgewiesen, wohingegen die mRNA von S100A8 nur in der H322-Zelllinie detektiert wurde. Dies lässt vermuten, dass S100A9 auch als Homodimer oder in Verbindung mit anderen S100-Proteinen aktiv ist. Darüber hinaus war die mRNA-Expression von S100A8 und S100A9 im Vergleich zu den anderen S100-Proteinen in den Blutpräparaten sehr hoch. Dies entspricht Literaturdaten, die S100A8/A9 als Phagozyten-spezifische S100-Proteine beschreiben, die hauptsächlich extrazellulär an Entzündungsreaktionen beteiligt sind [Foell *et al.*, 2006; Roth *et al.*, 2003; Ryckman *et al.*, 2003]. Deshalb könnte auch hier die Infiltration der Gewebeproben mit Immunzellen eine Ursache für die verhältnismäßig hohe mRNA-Expression von S100A8 und S100A9 in den Gewebeproben sein. Da die Expression von S100A8 bzw. S100A9 in der vorliegenden Arbeit auch in den Bronchialkarzinom-Zelllinien gezeigt wurde, könnte dies aber auch auf eine Funktion im Bronchialkarzinom hinweisen.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen S100-Proteinen sind die Literaturdaten bezüglich der Rolle von S100A2 in Tumorerkrankungen sehr widersprüchlich. Aufgrund der verminderten Expression von S100A2 in einigen epithelialen Tumoren der Brust, der Prostata und in Melanomen wird diesem S100-Protein eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben, der vor allem die Migration der Tumorzellen inhibiert [Nagy *et al.*, 2001; Rehman *et al.*, 2005]. In Oralkarzinom-Zellen führte eine Überexpression von S100A2 des Weiteren zu einer Inhibierung der Proliferation, Migration und Invasion *in vitro* sowie zu einem verminderten Tumorstadium *in vivo* [Tsai *et al.*, 2006]. Neuere Studien zeigen allerdings, dass S100A2 im Bronchialkarzinom erhöht exprimiert wird und mit einer schlechten Prognose für den Krankheitsverlauf in Verbindung steht [Bartling *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005a]. Dies bestätigt sich auch in der erhöhten mRNA-Expression von S100A2 in den von uns untersuchten Bronchialkarzinom-Geweben, sowie in der H358-Zelllinie und der Panc-1-Zelllinie.

Anhand der Expressionsanalysen und der in der Literatur beschriebenen Studien ist zu erkennen, dass keine allgemeine Schlussfolgerung bezüglich der Expression einzelner S100-Proteine auf die Gesamtheit von Tumorerkrankungen getroffen werden kann. Die S100-Proteine sind abhängig vom Tumortyp und ebenso vom Stadium der jeweiligen Tumorerkrankung unterschiedlich exprimiert und sollten demzufolge für jede Tumorerkrankung separat betrachtet und untersucht werden. Es bleibt deshalb zu klären, welchen Einfluss die erhöhte Expression von S100P im bronchialen Adenokarzinom hat.

4.1.2. Die Regulierung der mRNA-Expression von S100P

Die veränderte Expression der S100-Proteine im Verlauf von Tumorerkrankungen kann unter anderem auf die Lokalisierung der meisten *S100*-Gene in der Chromosomen-Region 1q21 zurückgeführt werden, da diese in Tumorzellen oft umgestaltet ist [Marenholz *et al.*, 2004]. S100P ist in der Chromosomen-Region 4p16 lokalisiert [Schafer *et al.*, 1995], deshalb kann diese Regulierung für S100P nicht in Betracht gezogen werden. Eine der wichtigsten epigenetischen Veränderungen während der Tumorigenese ist jedoch der veränderte Methylierungsstatus der DNA. Die Hypomethylierung der DNA tritt ubiquitär im gesamten Genom auf und führt meist zur Aktivierung von Onkogenen [Ehrlich, 2002]. Die Hypermethylierung der DNA während der Tumorigenese tritt hingegen meist an Promotor CpG-Inseln auf und führt zur Stilllegung putativer Tumorsuppressorgene [Jones & Baylin, 2002]. Durch die Verwendung von 5-Aza-2'-Deoxycytidin (AzDe), das die Methylierung der Cytidine verhindert, wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob die Expression von S100P vom Methylierungsstatus der DNA abhängig ist. In der Bronchialkarzinom-Zelllinie H358 konnte durch die Behandlung mit AzDe eine erhöhte mRNA-Expression von S100P im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erzielt werden. Eine fundierte Aussage darüber, ob die erhöhte mRNA-Expression von S100P infolge der Behandlung von H358-Zellen mit AzDe auf die Hypomethylierung oder auf eine Aufhebung der Hypermethylierung der Promotorregion von *S100P* zurückzuführen ist, kann in unserem Versuchsansatz nicht getroffen werden. Allerdings ist eine Abhängigkeit der mRNA-Expression von S100P vom Methylierungsstatus der DNA in Bronchialkarzinomzellen deutlich. In diesem Zusammenhang konnte für das Pankreaskarzinom und das Prostatakarzinom gezeigt werden, dass *S100P* zu den in den Tumorgeweben überexprimierten Genen gehörte, deren DNA hypomethyliert war. Des Weiteren konnte durch die Hypomethylierung der 5'untranslatierten Region mittels AzDe die *S100P*-Expression in den entsprechenden Epithelzellen *in vitro* induziert werden [Sato *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007]. Auch für S100A4 konnte ein Zusammenhang zwischen der Hypomethylierung von Genabschnitten und der Überexpression im Pankreaskarzinom nachgewiesen werden [Rosty *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2003]. Darüber hinaus konnte die Expression von S100A4 in Pankreaskarzinom-Zelllinien, die diese Hypomethylierung nicht zeigten, durch die Behandlung mit AzDe induziert werden [Sato *et al.*, 2003]. Es deutet also vieles darauf hin, dass auch die Expression von S100P im Frühstadium des Bronchialkarzinoms durch die Hypomethylierung von Genabschnitten erhöht ist. Im Gegensatz zu S100P und S100A4 wird für S100A2 eine verminderte Expression infolge der Hypermethylierung von Promotorbereichen des *S100A2*-Gens angenommen [Rehman *et al.*, 2005; Wicki *et al.*, 1997]. Die verminderte Expression von S100A2 kann jedoch nicht vollständig durch den Methylierungsstatus der DNA erklärt werden, da trotz der Hypermethylierung von Promotorbereichen von S100A2 in normalem Epithelgewebe der Prostata eine Expression von S100A2 in diesen Gewebeschnitten gezeigt wurde [Rehman *et al.*, 2005].

Ein veränderter Methylierungsstatus der DNA im Verlauf der Tumorerkrankung kann demzufolge eine Erklärung für die stadienabhängige veränderte Expression von S100P im Bronchialkarzinom sein. Darüber hinaus können jedoch noch weitere Regulationsmechanismen die Expression von S100P beeinflussen. So deutet z. B. die verminderte endogene mRNA-Expression von S100P infolge der S100P-Überexpression in den H358-Zellen auf einen negativen *Feedback*-Mechanismus hin. Dieser kann ebenfalls, infolge der erhöhten S100P-Expression im Frühstadium des Bronchialkarzinoms, ein Grund für die normalisierte Expression von S100P in späteren Stadien des Bronchialkarzinoms sein.

4.1.3. Die veränderte Expression von S100P und weiterer S100-Proteine unter dem Einfluss der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass außer S100P auch die in der Literatur als tumorrelevant beschriebenen S100-Proteine S100A2, S100A4 und S100A9 im Bronchialkarzinom-Gewebe und in Bronchialkarzinom-Zelllinien exprimiert werden. Darüber hinaus wurde eine veränderte Expression der S100-Proteine auch in Zusammenhang mit Chemotherapie-resistenten Tumorzellen gezeigt [Bertram *et al.*, 1998; Mahon *et al.*, 2007]. Inwieweit die S100-Proteine auch im bronchialen Adenokarzinom infolge der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien verändert exprimiert sind und ob ein Zusammenhang mit der Zelltod-Induktion nachweisbar ist, wurde anhand von Zelltodstudien und der Expressionsanalyse von S100P, S100A2, S100A4 und S100A9 in H358-Zellen nach der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien untersucht (Tab. 11).

Tab. 11: Schematische Zusammenfassung der S100-Expression und Aktivierung der MAP-Kinasen infolge der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien

H358- Behandlung	Zelltod		mRNA-Expression von				MAP-Kinasen		
	Apoptose	Nekrose	S100P	S100A2	S100A4	S100A9	P-p38	P-JNK	P-ERK1/2
CGP 74514A	++(+)	++(+)	→	↑	↑	↑	nicht untersucht		
Cisplatin	++(+)	++(+)	↓	→	→	↑	↑	↑	↑↑↑
Etoposid	+	+	↑	↑	→	↑	↑	↑	↑↑
MG-132	+++	++	↑	→	↓	→	↑↑	↑↑	↑↑
Paclitaxel	+++	+	→	→	→	↑	nicht untersucht		

+ - gering; ++ - mittel; +++ - hoch

→ - nicht verändert; ↑ - erhöht; ↑↑ - stark erhöht; ↑↑↑ - sehr stark erhöht; ↓ - vermindert im Vergleich zur Kontrolle

Die mRNA-Expression von S100P war vor allem durch die Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 und dem DNA-interagierenden Chemotherapeutikum Etoposid erhöht. Parallel zur erhöhten mRNA-Expression war auch die Proteinexpression von S100P durch die Behandlung mit MG-132 erhöht. Ein Grund für die erhöhte Expression kann die Induktion von IL-6 durch die Proteasom-Inhibierung mittels MG-132 darstellen [Shibata *et*

al., 2002]. Dieses Zytokin, welches eine wichtige Rolle in Entzündungsreaktionen einnimmt, induziert außerdem die Expression von S100P [Hammacher *et al.*, 2005]. Im Gegensatz zu MG-132 hatte die Behandlung mit Etoposid trotz der erhöhten mRNA-Expression keinen Einfluss auf die Proteinexpression von S100P. Es kann deshalb spekuliert werden, dass die unterschiedlichen Expressionslevel auf mRNA- und Proteinebene auf die Dauer der Behandlung zurückzuführen sind. Sowohl die mRNA-Expression als auch die Proteinexpression wurden nach 24-stündiger Behandlung mit den zytotoxischen Agenzien untersucht. So wäre es möglich, dass durch die Behandlung mit Etoposid die mRNA-Expression erst relativ spät erhöht würde und nach 24 h auf Proteinebene noch nicht nachweisbar wäre. Durch die Behandlung mit Cisplatin hingegen könnte es durch die Komplexbildung mit der DNA und der daraus resultierenden Inhibierung der Replikation zu einem schnellen Anstieg der mRNA-Expression kommen, der sich nach 24 h in der erhöhten Protein-Expression widerspiegelt, aber auf mRNA-Ebene nicht mehr nachweisbar wäre. Darüber hinaus könnten auch post-transkriptionelle Regulationsmechanismen zu der unterschiedlichen Expression von S100P auf mRNA- bzw. Proteinebene führen.

Unabhängig davon konnte gezeigt werden, dass die Expression von S100P durch die Behandlung mit unterschiedlichen zytotoxischen Agenzien gegensätzlich exprimiert war. Trotzdem konnte kein allgemeiner Zusammenhang der veränderten Expression von S100P mit der Zelltodinduktion in H358-Zellen festgestellt werden. Auch andere Studien zeigen kein eindeutiges Bild über den Einfluss von S100P auf die Ausbildung von Chemotherapie-Resistenzen. Einerseits wurden Doxorubicin-resistente Zellen durch eine erhöhte mRNA-Expression von S100P charakterisiert [Bertram *et al.*, 1998]. Ein ähnlicher Mechanismus scheint auch durch die Behandlung mit Etoposid vorzuliegen. So konnte in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte mRNA-Expression von S100P durch die Behandlung mit Etoposid gezeigt werden, die in einem relativ geringen Zelltod resultierte. Andererseits zeigen neuere Studien, dass in Tumorerkrankungen, wie dem Ovarial-Karzinom, eine erhöhte Expression von S100P die Tumorzellen gegenüber der Behandlung mit Paclitaxel sensibilisiert [Gao *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008]. Obwohl in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen der erhöhten Zelltodinduktion in den H358-Zellen durch die Behandlung mit Paclitaxel und der mRNA-Expression von S100P nachgewiesen werden konnte, zeigte in unseren Untersuchungen die Behandlung mit MG-132 einen relativ hohen Zelltod und eine gleichzeitig erhöhte mRNA-Expression von S100P. Es kann deshalb vermutet werden, dass ein potentieller Einfluss von S100P auf die Ausbildung von Chemotherapie-Resistenzen im Bronchialkarzinom von dem verwendeten Chemotherapeutikum abhängig ist.

Das Expressionsmuster der S100P-mRNA, infolge der Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika, ist jedoch mit keinem der anderen untersuchten S100-Proteine zu vergleichen. Die mRNA-Expression von S100A2 war durch die Behandlung mit Etoposid oder CGP 74514A erhöht. Obwohl Tan *et al.* die Transaktivierung des *S100A2*-Promotors durch p53 infolge der Etoposid-Behandlung zeigten [Tan *et al.*, 1999], kann diese Regulation

für die p53-negativen H358-Zellen ausgeschlossen werden. Beide Chemotherapeutika gehörten zu der Gruppe, die in den Zelltodstudien einen moderaten Zelltod verursachten. Da eine hohe Expression von S100A2 bei NSCLC-Patienten mit einer schlechten Prognose der Erkrankung korrelierte [Wang *et al.*, 2005a], könnte eine durch S100A2 verursachte Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber der Chemotherapie-Behandlung die Behandlung dieses Subtypen des Bronchialkarzinoms unterstützen.

Auch für S100A4 konnte eine erhöhte mRNA-Expression durch die Behandlung mit CGP 74514A gezeigt werden. Obwohl S100A4 hauptsächlich für seinen positiven Einfluss auf das Tumorwachstum und die Metastasierung von Tumorzellen bekannt ist [Davies *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 2006], konnte mittlerweile in Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden, dass S100A4 zusätzlich die Chemotherapie-Resistenz erhöht und die Apoptose inhibiert [Mahon *et al.*, 2007]. Da die mRNA-Expression von S100A4 durch die von uns untersuchten zytotoxischen Agenzien kaum verändert war, könnte vermutet werden, dass die Ausbildung von Chemotherapie-Resistenzen durch S100A4 von der Wirkung des eingesetzten Chemotherapeutikums abhängt.

Im Gegensatz zu S100A4 war die mRNA-Expression des proinflammatorischen S100-Proteins S100A9 unabhängig von dem eingesetzten Chemotherapeutikum generell induziert. S100A9 wird von sterbenden Zellen passiv freigesetzt oder aktiv sekretiert [Roth *et al.*, 2003]. Extrazelluläres S100A9 induziert, wie für Kolonkarzinomzellen gezeigt, die Apoptose der Zellen [Ghavami *et al.*, 2004] und führt zu einer verstärkten Migration von Leukozyten *in vitro* [Roth *et al.*, 2003]. Man könnte deshalb annehmen, dass die mRNA-Expression von S100A9 durch verschiedene Apoptose-Mechanismen induziert wird, um die Immunantwort *in vivo* zu stimulieren.

Die Aktivierung von S100P und der anderen S100-Proteine erfolgt Ca^{2+} -abhängig. Der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt reguliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse. So wird auch während der Apoptose der Ca^{2+} -Gehalt der Zelle durch die Freisetzung aus dem endoplasmatischen Reticulum und den Einstrom durch Ca^{2+} -Kanäle der Plasmamembran erhöht [Mattson & Chan, 2003]. Die intrazelluläre Bindung von aktivierten S100-Proteinen an potentielle Interaktionspartner und deren Regulation ist in diesem Zusammenhang jedoch noch weitestgehend unerforscht. Andererseits sind verschiedene Signalwege bekannt, die durch extrazellulär aktive S100-Proteine induziert werden. Hierzu gehört vor allem die Aktivierung von MAP Kinasen und NF κ B durch die Interaktion mit RAGE [Hsieh *et al.*, 2004] und anderen, bislang unbekanntem Oberflächenrezeptoren [Hermani *et al.*, 2006].

4.1.4. Der Einfluss von MAP Kinasen auf die mRNA-Expression von S100P

Die MAP Kinase-Signalwege werden durch extrazelluläre Signale aktiviert und führen letztendlich zu einer veränderten Gen-Expression. Durch Wachstumsfaktoren aktivierte MAP Kinasen können zur Proliferation und Differenzierung von Zellen beitragen [Fang &

Richardson, 2005]. Im Gegensatz dazu wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen auch gezeigt, dass durch Chemotherapie aktivierte MAP Kinasen die Apoptose von Zellen fördern [Cobb, 1999; Mansouri *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2000]. Die MAP Kinase-Signalwege können durch extrazelluläre S100-Proteine [Hermani *et al.*, 2006; Yammani *et al.*, 2006], aber auch durch andere extrazelluläre Signale aktiviert werden. Welchen Einfluss die Aktivierung der MAP Kinasen p38 MAPK, ERK1/2 und JNK durch die Behandlung mit den zytotoxischen Agenzien auf die Expression von S100P hat, ist bislang jedoch nicht untersucht worden.

Zunächst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass vor allem die ERK1/2 durch die Behandlung von H358-Zellen mit Cisplatin, Etoposid und MG-132 aktiviert wurde. Die Aktivierung der p38 MAPK und der JNK erfolgte hauptsächlich durch MG-132 (Tab. 11). Da durch die Behandlung der H358-Zellen mit MG-132 sehr hohe Zelltodraten erzielt wurden, liegt die Vermutung nahe, dass die Aktivierung der verschiedenen MAP Kinase-Signalwege die Apoptose der Zelle fördert. Für Cisplatin wurde für verschiedene Karzinomzellen gezeigt, dass der induzierte Zelltod von der Aktivierung der ERK1/2, der JNK und der p38 MAP Kinase abhängig ist [Mansouri *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2000]. In Magenkarzinomzellen führte die Aktivierung der ERK1/2 durch die Behandlung mit Etoposid jedoch zu einer verminderten Apoptoserate der Zellen [Liu *et al.*, 2006]. Dies würde wiederum den geringen Zelltod durch die Behandlung der H358-Zellen mit Etoposid erklären. Inwieweit diese Signalkaskaden wiederum die Expression von S100-Proteinen beeinflussen, wurde bislang nicht beschrieben. Durch die Verwendung spezieller Inhibitoren konnten die Signalwege verschiedener MAP Kinasen spezifisch unterbrochen werden, um somit den Einfluss auf *downstream* gelegene Zielproteine zu untersuchen. Auf die veränderte mRNA-Expression von S100P durch die Behandlung mit Cisplatin, Etoposid oder MG-132 hatte die Inhibierung der MAP Kinasen jedoch keinen Einfluss. Im Gegensatz dazu führte die Inhibierung der ERK1/2 und der p38 MAP Kinase in den unbehandelten H358-Zellen zu einer leicht verminderten mRNA-Expression von S100P. Die MAP Kinase-Signalwege sind oft schon infolge der Tumorerkrankung verändert aktiviert [Beeram *et al.*, 2005; Fang & Richardson, 2005]. Es kann deshalb vermutet werden, dass die Expression einzelner Gene durch die veränderte MAP Kinase-Aktivierung in den Tumorzellen basal verändert ist und somit durch die Inhibierung der MAP Kinase-Signalwege eine veränderte mRNA-Expression der Zielgene, ohne zusätzlichen Stimulus, gezeigt werden kann. Am Beispiel von S100P spricht hierfür auch die Tatsache, dass in der 5' Region des *S100P*-Promotors eine STAT/CREB-Bindestelle lokalisiert ist, die an der Regulation der mRNA-Expression von S100P beteiligt ist [Gibadulinova *et al.*, 2008]. Zusätzlich konnte eine positive Korrelation zwischen dem aktivierten ERK1/2-Signalweg und der STAT-Aktivität gezeigt werden [Park *et al.*, 2003; So *et al.*, 2007], die die verminderte *S100P*-Expression infolge der Inhibierung des ERK1/2-Signalweges erklären würde.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen im Vergleich zu den Literaturdaten, dass die S100-Proteine abhängig vom Karzinomtyp unterschiedlich exprimiert und reguliert sind. Die

Regulation der S100P-mRNA-Expression findet dabei zum Teil über den Methylierungsstatus der DNA statt. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die mRNA-Expression von S100P durch die Aktivierung des ERK1/2-Signalweges reguliert werden kann. Im Vergleich zu den anderen untersuchten S100-Proteinen war die S100P-Expression nach der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien gegensätzlich reguliert. Ein direkter Einfluss der MAP Kinasen auf die veränderte mRNA-Expression von S100P infolge der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien konnte dabei jedoch nicht gezeigt werden.

4.1.5. S100P beeinflusst die Sensitivität von H358-Zellen gegenüber zytotoxischer Agenzien

Die Expression von S100P war durch die Behandlung mit zytotoxischen Agenzien in der Bronchialkarzinom-Zelllinie H358 verändert. Eine Korrelation der Zelltodinduktion und der veränderten S100P-Expression war aufgrund der Kurzzeit-Behandlung jedoch kaum erkennbar. Aus diesem Grund wurde mittels Überexpression von S100P in den H358-Zellen der Einfluss von S100P auf die Induktion der Apoptose und der Nekrose infolge der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die Apoptose der H358-Zellen durch die Überexpression von S100P kaum beeinflusst war. Demgegenüber war durch die Behandlung mit Etoposid oder MG-132 der nekrotische Zelltod in den S100P-überexprimierenden H358-Zellen leicht, aber signifikant erhöht. Obwohl die meisten zytotoxischen Agenzien auf der Ebene des Zellzyklus wirken, konnte die erhöhte Zelltodinduktion nicht auf einen veränderten Zellzyklus durch S100P zurückgeführt werden. Durch die Behandlung mit Etoposid wird die Topoisomerase II inhibiert. Dies führte dazu, dass sich der überwiegende Anteil der Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus befand. Die Veränderung der Zellzyklusphasen erfolgte jedoch unabhängig von der S100P-Überexpression. Da mit Etoposid hauptsächlich der nekrotische Zelltod untersucht wurde, wurden ebenfalls Paclitaxel-behandelte Zellen analysiert. Bei diesen wurde überwiegend der apoptotische Zelltod induziert. Jedoch hatte die Überexpression von S100P auch unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf den Zellzyklus.

Die Nekrose von Zellen führt zu einer Permeabilisierung der Zellmembran und der Freisetzung von Proteinen aus dem Zellkern, dem Zellplasma und anderen Zellorganellen [Van Cruchten & Van Den Broeck, 2002]. Da unter diesen Voraussetzungen auch S100P in großen Mengen in das Zellkulturmedium der S100P-überexprimierenden Zellen freigesetzt wurde und RAGE als potentieller Rezeptor für extrazelluläres S100P vermutet wird [Arumugam *et al.*, 2004; Fuentes *et al.*, 2007], wurde zusätzlich der Einfluss der Koexpression von S100P mit RAGE oder $\Delta cytoRAGE$ auf den Zelltod der H358-Zellen untersucht. Es konnte eine deutliche Steigerung des nekrotischen Zelltodes durch die Koexpression von S100P mit RAGE oder $\Delta cytoRAGE$ nach der Behandlung mit Cisplatin, Etoposid oder MG-132 nachgewiesen werden. Da die Expression von RAGE oder

Δ cytoRAGE allein, im Vergleich zu den Kontrollzellen, nicht zu einem veränderten Zellsterben führte, ist anzunehmen, dass die Interaktion von S100P mit RAGE zur Sensibilisierung der H358-Zellen gegenüber den untersuchten zytotoxischen Agenzien beiträgt. Obwohl infolge der Ligand-RAGE-Interaktion meist ein positiver Effekt auf die Zellen beschrieben wurde [Gebhardt *et al.*, 2008; Logsdon *et al.*, 2007], konnte auch gezeigt werden, dass dies von der Konzentration der Liganden abhängt. So wurde das Wachstum von Nervenzellen durch niedrige Konzentrationen von S100B infolge der Interaktion mit RAGE über den Ras-ERK1/2-NF κ B-Signalweg induziert. Im Gegensatz dazu führte eine hohe Konzentration von S100B in Abhängigkeit von RAGE zum Zelltod [Huttunen *et al.*, 2000], wodurch sich auch die erhöhten Zelltodraten durch die Überexpression von S100P erklären ließen. Andererseits wurden erhöhte Zelltodraten auch durch die Koexpression von S100P mit Δ cytoRAGE gezeigt. Durch die Deletion der intrazellulären Domäne des Rezeptors wird eine direkte Signal-Weiterleitung verhindert. Es wird jedoch vermutet, dass RAGE mit anderen Rezeptoren dimerisiert und nur über diese Interaktion eine Signalkaskade ausgelöst werden kann [Bierhaus *et al.*, 2005]. Dies würde bedeuten, dass die intrazelluläre Domäne von RAGE in diesem Fall für die Weiterleitung extrazellulärer Stimuli nicht erforderlich ist.

4.1.6. Die Phagozytose apoptotischer Zellen wird durch S100P kaum beeinflusst

In vivo werden apoptotisch sterbende Zellen von Makrophagen erkannt und phagozytiert. Da sterbende Zellen eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren in den extrazellulären Raum freisetzen, ist eine schnelle Erkennung und Entfernung der Zellen eine wichtige Voraussetzung, um Entzündungsreaktionen zu verhindern [Van Cruchten & Van Den Broeck, 2002]. Die Aktivierung von Leukozyten erfolgt *in vivo* über die Bindung von β 1-Integrinen und β 2-Integrinen auf deren Zelloberfläche an spezifische Liganden wie z. B. ICAM-1 oder VCAM-1 [Chavakis *et al.*, 2003]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Expression von RAGE auf Endothelzellen die Anlockung von Leukozyten durch die Bindung an das β 2-Integrin Mac-1 auf der Leukozytenoberfläche unterstützt, und dass diese Interaktion durch den RAGE-Liganden S100B noch verstärkt wurde [Chavakis *et al.*, 2003]. Darüber hinaus wurde auch die Aktivierung von Mac-1 durch S100A9 gezeigt [Newton & Hogg, 1998]. In einem Phagozytose-Assay sollte in der vorliegenden Arbeit deshalb *in vitro* überprüft werden, welche Auswirkung die Expression von S100P und RAGE auf die Erkennung von apoptotischen Zellen durch Makrophagen hat.

Die Erkennung von apoptotischen Zellen durch Makrophagen erfolgt hauptsächlich über die Präsentation von Phosphatidylserinen (PS) auf der Zelloberfläche apoptotischer Zellen [Fadok *et al.*, 2001]. Aus diesem Grund wurden die H358-Zellen für den Phagozytose-Assay mit höheren Konzentrationen von Etoposid behandelt. Dies führte zu einem hohen Prozentsatz apoptotischer Zellen, die Phosphatidylserine auf ihrer Zelloberfläche präsentierten. Infolge der hohen Zelltodrate wird *in vitro* passiv S100P freigesetzt und könnte

somit im extrazellulären Raum die Erkennung der Zellen durch die Phagozyten beeinflussen. Obwohl RAGE und S100-Proteine *in vivo* die Immunantwort über die Erkennung durch Leukozyten stimulieren [Chavakis *et al.*, 2003], wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass weder die Expression von RAGE oder Δ cytoRAGE, noch von S100P *in vitro* einen Einfluss auf die Phagozytose apoptotisch sterbender Zellen ausüben. Man kann deshalb vermuten, dass die Expression von RAGE und seiner Liganden *in vivo* zu einer verstärkten Anlockung von Leukozyten führt und die Immunantwort verstärkt, dass dies die Phagozytose apoptotischer Zellen jedoch nicht direkt beeinflusst.

4.2. Einfluss der S100P-Überexpression auf die Malignität der humanen Bronchialkarzinom-Zelllinie H358

Durch Mikroarray-Analysen wurde S100P als potentieller Tumormarker im frühen Stadium des bronchialen Adenokarzinoms identifiziert [Bartling *et al.*, 2007]. Auch im Prostatakarzinom oder dem Pankreaskarzinom wurde eine erhöhte Expression von *S100P* als potentieller diagnostischer Marker für die Tumorerkrankung gefunden [Basu *et al.*, 2008; Crnogorac-Jurcevic *et al.*, 2003]. Wie zuvor beschrieben, gibt es verschiedene Ansatzpunkte, die die differentielle Expression von *S100P* erklären. Abhängig vom Karzinomtyp gibt es jedoch unterschiedliche Ergebnisse über den Einfluss von S100P auf die Malignität von Tumorzellen. In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, welchen Einfluss die Überexpression von S100P auf die Malignität humaner Bronchialkarzinomzellen hat.

Hierfür wurde das GFP-S100P-Fusionsprotein in der bronchialen Karzinom-Zelllinie H358 überexprimiert. In dem verwendeten humanen Expressionsvektor pEGFP-C1 ist das *green fluorescent protein* (GFP) N-terminal an S100P gekoppelt. Somit ist eine intrazelluläre oder extrazelluläre Lokalisierung von S100P unabhängig von der Detektion durch Antikörper möglich. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass an GFP gekoppelte S100-Proteine, darunter auch S100P, nach Ca^{2+} -Stimulation Dimere bilden, die intrazelluläre Lokalisierung verändern und an Ziel-Proteine binden [Davey *et al.*, 2000; Koltzsch *et al.*, 2003]. Sowohl die Reprimierung von endogenem S100P infolge der GFP-S100P-Überexpression in H358-Zellen, als auch die größtenteils kernständige Lokalisierung von GFP-S100P und dessen veränderte Lokalisierung aufgrund der Ca^{2+} -Stimulation in unseren Analysen belegen ebenfalls die Funktionalität des Fusionsproteins.

Für einige der extrazellulären S100-Proteine wird angenommen, dass sie an den Zelloberflächenrezeptor RAGE binden und auf diesem Weg intrazelluläre Signalwege durch die Aktivierung von MAP Kinasen auslösen [Hofmann *et al.*, 1999]. Die Aktivierung von Immunzellen durch das extrazelluläre Heterodimer S100A8/S100A9 erfolgt jedoch beispielsweise unabhängig von RAGE [Foell *et al.*, 2006]. Deshalb wurden zusätzlich H358-Zellen, die RAGE bzw. Δ cytoRAGE exprimierten mit pEGFP::S100P transfiziert, um eine

potentielle Abhängigkeit der S100P-Wirkung von RAGE auf die Migration und das Tumorstadium *in vitro* zu untersuchen.

4.2.1. Der Einfluss von S100P auf die Migration von Zellen ist abhängig vom Zelltyp

In zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen konnte in der vorliegenden Arbeit *in vitro* gezeigt werden, dass S100P die Migration von H358-Zellen inhibiert. Auch die Koexpression von S100P mit RAGE führte zu einer verminderten Migration der H358-Zellen. Diese Daten widersprechen allerdings Ergebnissen, die sowohl für das Bronchialkarzinom [Diederichs *et al.*, 2004] als auch für andere Tumorerkrankungen [Arumugam *et al.*, 2005; Fuentes *et al.*, 2007] eine gesteigerte Migration der Zellen durch S100P zeigen. Die Überexpression von S100P führte z. B. in Pankreaskarzinomzellen zu einer verstärkten Migration der Zellen durch die Membran eines Transwells. Dieser Effekt scheint in den Pankreaskarzinomzellen zudem durch die Expression von RAGE gefördert zu werden [Arumugam *et al.*, 2005]. Eine Interaktion mit RAGE setzt *in vivo* jedoch die Sekretion von S100P in den extrazellulären Raum voraus. Arumugam *et al.* zeigen *in vitro* eine Freisetzung von S100P in das umgebende Medium durch S100P-überexprimierende Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen [Arumugam *et al.*, 2004]. In konditioniertem Medium von GFP-S100P-exprimierenden H358-Zellen konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine erhöhte Freisetzung von GFP-S100P gegenüber H358 Wildtyp-Zellen anhand der Fluoreszenzintensität gezeigt werden. Im Vergleich der konditionierten Medien von GFP-S100P- zu GFP-Kontroll-Zellen wurde jedoch kein Unterschied der Fluoreszenzintensität festgestellt. Verschiedene Studien zeigten die Sekretion von Proteinen, wie z. B. MMPs [Sbai *et al.*, 2008] und therapeutischen Proteinen [Flinterman *et al.*, 2009], mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen. Außerdem wurde die Fusion von GFP als Marker genutzt, um klassische und nicht-klassische Sekretionswege nachzuvollziehen [He *et al.*, 2008; Lang *et al.*, 1997]. Daher kann eine Inhibierung der Sekretion von S100P durch GFP weitestgehend ausgeschlossen werden. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse lassen deshalb vermuten, dass es durch die Überexpression von GFP-S100P nur zu einer passiven Freisetzung von S100P kommt, und dass eine Freisetzung von S100P *in vivo* wahrscheinlich nur durch sterbende Zellen erfolgt. Solange eine aktive Sekretion von S100P nicht gezeigt werden kann, scheint es also fraglich, ob *in vitro* gezeigte extrazellulär vermittelte Effekte von S100P *in vivo* relevant sind.

Unabhängig von RAGE konnte im Gegensatz zu den H358-Zellen jedoch gezeigt werden, dass die Überexpression von S100P die Migration von Pankreaskarzinomzellen (Panc-1) und von anderen Bronchialkarzinomzellen (H322) fördert. Beide Zelltypen gehören im Gegensatz zu den H358-Zellen zu den gut migrierenden Zelllinien. Aus diesem Grund wurden die Transwell-Assays mit den H322- und den Panc-1-Zellen auch nach einer kürzeren Zeitspanne ausgewertet. Das unterschiedliche Migrationsverhalten der Tumorzellen ist nicht

überraschend, da schon in früheren Studien festgestellt wurde, dass nur wenige Tumorzellen des Primärtumors dazu befähigt sind, zu migrieren [Wang *et al.*, 2005b]. Demzufolge ist anzunehmen, dass S100P abhängig von vorhandenen zellulären Faktoren die Migration der Zellen positiv oder negativ beeinflussen kann.

Die Fähigkeit von Tumorzellen zur Migration ist eine entscheidende Eigenschaft, die zur Metastasierung von Primärtumoren und der Bildung von Sekundärtumoren beiträgt. Deshalb ist es ein wichtiges Anliegen, die zellulären Voraussetzungen für die Migration von Zellen zu erforschen. Die Migration von Zellen ist ein komplexer Prozess, der vor allem auf Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts und der daraus folgenden Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien sowie auf der Adhäsion der Zelloberfläche an die extrazelluläre Matrix basiert [Lauffenburger & Horwitz, 1996; Zamir & Geiger, 2001]. Diese Prozesse werden außerdem durch verschiedene extrazelluläre Signale beeinflusst. So sind die Aktivierung der Rho GTPase durch Wachstumsfaktoren [Ridley & Hall, 1992] und die Stimulation der *Focal Adhesion Kinase* (FAK) [Parsons *et al.*, 2000] wichtige Voraussetzungen für die Migration von Zellen. In Bezug auf die verminderte Migration von H358-Zellen konnte gezeigt werden, dass dies unter anderem auf die verminderte Adhäsion der Zellen an die extrazelluläre Matrix zurückzuführen ist [Bartling *et al.*, 2009]. Darüber, ob S100P in diese Signalwege involviert ist und die Migration über die Regulation der Adhäsion beeinflusst, kann jedoch nur spekuliert werden. Whiteman *et al.* zeigten z. B., dass in Pankreaszellen die Überexpression von S100P zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und zu einer erhöhten Expression von Cathepsin D führte. Dieses wird von den Zellen sekretiert, degradiert die extrazelluläre Matrix und fördert somit in Abhängigkeit von S100P die Migration der Zellen [Johnson *et al.*, 1993; Whiteman *et al.*, 2007]. Im Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinom korreliert eine hohe Expression von Cathepsin B und K, welche ebenfalls das invasive Wachstum und die Metastasierung von Tumorzellen fördern [Jedezsko & Sloane, 2004; Joyce *et al.*, 2004; Joyce & Hanahan, 2004], mit einer schlechten Prognose der Tumorerkrankung [Cordes *et al.*, 2009]. Es konnte allerdings keine Abhängigkeit der Cathepsin-Expression von der S100P-Expression in den mittels DNA-Mikroarray untersuchten Bronchialkarzinom-Geweben und -Zellen gefunden werden.

Eine andere Arbeitsgruppe postuliert, dass die Ca^{2+} -abhängige Bindung von S100P an das Membran/F-Aktin bindende Protein Ezrin dieses aktiviert und somit die Migration von Tumorzellen fördert [Austermann *et al.*, 2008b; Koltzsch *et al.*, 2003]. Ezrin stellt eine Verbindung zwischen der Plasmamembran und dem Zytoskelett her, die in verschiedenen Tumorerkrankungen (z. B. dem Mammakarzinom) das metastatische Verhalten von Tumorzellen positiv beeinflusst [Li *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2008]. Durch die Erhöhung des Ca^{2+} -Gehalts in den H358-Zellen konnte auch in dieser Arbeit eine veränderte intrazelluläre Lokalisierung von S100P und von Ezrin gezeigt werden. Infolge dessen konnte eine Kolokalisierung der beiden Proteine in Aktin-Stress-Fiber-ähnlichen Strukturen beobachtet werden. Trotzdem konnte eine verbesserte Migration durch die S100P-Überexpression in den

H358-Zellen nicht festgestellt werden. Aus diesem Grund müssen weitere Faktoren zur Migration beitragen, die in den gut migrierenden Karzinom-Zelllinien durch die Interaktion mit S100P beeinflusst werden.

Für weiterführende Versuche wäre es außerdem von Vorteil, die Tumorzellen durch eine Schicht aus Endothelzellen migrieren zu lassen, um Faktoren des umgebenden Tumormilieus *in vitro* in die Untersuchung der Migration mit einbeziehen zu können. Darüber hinaus zeigte auch eine Kokultivierung von Brustkarzinom-Zellen und Makrophagen eine verstärkte Migration der Tumorzellen *in vitro* [Goswami *et al.*, 2005; Hagemann *et al.*, 2004]. Dies spricht dafür, dass die Migration von Tumorzellen nicht isoliert betrachtet werden sollte.

4.2.2. Die Aktivität von MMPs korreliert mit der Tumorzell-Migration

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Migrations-Assays zeigen ein unterschiedliches Migrationsverhalten der H358- und der Panc-1-Zellen. Auch die Überexpression von S100P wirkte sich gegensätzlich auf die Migration dieser Zellen aus. Wie im vorherigen Abschnitt diskutiert, sind verschiedene Prozesse an der Migration von Tumorzellen beteiligt. Darüber hinaus tragen auch die MMPs zur Invasion und folglich zur Migration von Tumorzellen *in vivo* bei. Die Degradierung der umgebenden extrazellulären Matrix durch die MMPs und die Migration der Zellen durch diese umgestalteten Matrix-Bereiche sind wichtige Voraussetzungen für die Invasion von Tumorzellen *in vivo* [Yano *et al.*, 2003]. Aus diesem Grund wurde auch in dieser Arbeit der Einfluss von S100P auf die Freisetzung der MMPs *in vitro* untersucht. In diesem Zusammenhang konnte vor kurzem nachgewiesen werden, dass die Migration von Ovarialkarzinomzellen und von Panc-1-Zellen durch die Aktivierung und Freisetzung von MMP-2 gefördert wird [Binker *et al.*, 2009; Kenny *et al.*, 2008]. Des Weiteren tragen die MMPs zur Zellproliferation, Differenzierung und Neo-Angiogenese des Tumors bei [Chang & Werb, 2001]. So konnte in Abhängigkeit der S100A4-Expression die Aktivierung von MMP-2 und MMP-9 induziert werden, in deren Folge die Tumorzellen eine erhöhte Tumorigenität und Invasivität zeigten [Bjornland *et al.*, 1999; Pazzaglia *et al.*, 2004; Saleem *et al.*, 2006]. Während für die H358-Zellen in dieser Arbeit nur eine sehr geringe Aktivität von MMP-2 und MMP-9 in der Zymographie gezeigt werden konnte, setzten die Panc-1-Zellen eine große Menge MMP-2 ins Medium frei. Die Überexpression von S100P in den H358-Zellen und den Panc-1-Zellen zeigte in der vorliegenden Arbeit jedoch keinen direkten Einfluss auf die Aktivierung der MMPs.

Die MMPs werden allerdings auch von den umgebenden Stromazellen (Fibroblasten, Endothelzellen u. a.) freigesetzt [Bonomi, 2002], so dass diese zusätzlich zur Invasion und Migration von Tumorzellen beitragen. Des Weiteren ist die große histologische Heterogenität charakteristisch für das Bronchialkarzinom, so dass unabhängig von den Ergebnissen der H358-Zellen auch für das Nicht-Kleinzellige Bronchialkarzinom gezeigt wurde, dass eine

hohe Expression von MMP-2 und MMP-9 im Tumorgewebe mit einer schlechten Prognose der Tumorerkrankung korrelierte [Brown *et al.*, 1993; Passlick *et al.*, 2000].

Abhängig von ihrem Substrat werden MMPs in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die von uns untersuchten MMP-2 und MMP-9 gehören zu der Gruppe der Gelatinasen [Yano *et al.*, 2003]. Die Ergebnisse unserer *in vitro* Migrations-Versuche können allerdings nicht mit der Aktivität von MMPs in Zusammenhang gesetzt werden, da in unseren Ansätzen die Migration der Tumorzellen unabhängig vom Verdau der extrazellulären Matrix untersucht wurde. Aufgrund der Zymographie-Ergebnisse kann man jedoch vermuten, dass die Pankreaskarzinomzellen auch *in vivo* eine höhere Invasivität zeigen als die H358-Zellen und somit auch die erhöhte Migration durch S100P fördern.

4.2.3. S100P fördert die Tumorbildung, aber inhibiert das weitere Tumorwachstum

Neben der Migration von Tumorzellen tragen die uneingeschränkte Proliferation der Zellen und das dreidimensionale Wachstum solider Tumore zur Entwicklung der Tumorerkrankung bei [Hanahan & Weinberg, 2000]. In Pankreaskarzinomzellen und Prostatakarzinomzellen führte die Überexpression von S100P zu einer gesteigerten Proliferation der Zellen [Arumugam *et al.*, 2005; Basu *et al.*, 2008]. In der vorliegenden Arbeit resultierte die Überexpression von S100P in den H358-Zellen hingegen in einer verminderten Proliferation der Zellen. In Abhängigkeit von einer hohen Zelldichte wurde die Proliferation der H358-Zellen durch S100P inhibiert. Auch in dem *tumor-colony-forming-Assay*, dem dreidimensionalen Modell der Tumorkolonie-Bildung *in vitro*, wurde einerseits die Bildung von Tumorkolonien aus Einzelzellen durch die S100P-Überexpression gefördert, andererseits zeigte sich, dass das Wachstum der Tumorkolonien ab einer Größe von 30 μm durch die S100P-Überexpression inhibiert wurde. Anhand dieser Daten kann vermutet werden, dass eine hohe Expression von S100P zum einen die Tumorinitiation fördert. Dies wird auch durch *in vivo* Studien bestätigt, die infolge der S100P-Überexpression eine vermehrte Tumorbildung in immundefizienten Mäusen zeigten [Gibadulinova *et al.*, 2005]. Zum anderen scheint die Überexpression von S100P jedoch die weitere Tumorentwicklung zu inhibieren. Aus diesem Grund könnte die verminderte Expression von S100P in späteren Stadien des Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinoms eine wichtige Voraussetzung für das Fortschreiten der Tumorerkrankung darstellen. Diese These würde auch Studien unterstützen, die zeigten, dass die Expression von S100P vor allem an der Initiierung der Tumorerkrankung beteiligt ist. Sowohl für das Mammakarzinom [Guerreiro Da Silva *et al.*, 2000] als auch für das Pankreaskarzinom [Ohuchida *et al.*, 2006] und das Bronchialkarzinom [Bartling *et al.*, 2007] konnten erhöhte Expressionslevel von S100P vor allem in den frühen Stadien der Erkrankung gezeigt werden.

Durch die Koexpression von S100P mit RAGE konnte keine verminderte Proliferation der H358-Zellen im Vergleich zu den RAGE-exprimierenden H358-Zellen beobachtet werden. Man kann vermuten, dass durch die Aktivierung von RAGE möglicherweise Signalwege induziert werden, die die Interaktion von S100P mit intrazellulären Zielproteinen inhibiert und somit die Wirkung von S100P ausgleicht. Die Relevanz einer solchen Wechselwirkung ist jedoch fraglich, da in dem dreidimensionalen *in vitro* Modell des Tumorwachstums die Koexpression von S100P mit RAGE keinen weiteren Einfluss auf die Bildung oder die Größe der Tumorkolonien zeigte. Außerdem kann anhand der Ergebnisse die Beeinflussung der Proliferation von H358-Zellen durch S100P und/oder RAGE als Folge eines veränderten Zellzyklus ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus konnte in unseren Versuchsansätzen weder im Proliferationsassay noch im *tumor-colony-forming*-Assay ein Einfluss von S100P auf die Proliferation bzw. die Bildung von Tumorzellkolonien aus Einzelzellen der Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden. Auch in diesem Beispiel deutet vieles darauf hin, dass der Einfluss der S100P-Expression stark vom Ursprung und den molekularen Voraussetzungen der verschiedenen Zellen abhängt. Dies wurde anhand der Wachstumskurven deutlich, die ein primär unterschiedliches Proliferationsverhalten der Pankreaskarzinomzellen im Vergleich zu den H358-Zellen zeigen. Während bei den H358-Zellen ab einer bestimmten Zelldichte die Proliferationskurve in eine Plateauphase übergeht, kann man für die Panc-1-Zellen ein solches Proliferationsverhalten in dem von uns untersuchten Zeitraum nicht feststellen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung der S100P-Expression stark von den molekularen Voraussetzungen der untersuchten Tumorzellen abhängt. In Bezug auf die Malignität der H358-Zellen kann man jedoch zusammenfassend sagen, dass durch die Überexpression von S100P die Proliferation, das Wachstum von Tumorzellkolonien, die Migration und die Resistenz der Tumorzellen vermindert waren. Dennoch konnten wir in dem *tumor-colony-forming*-Assay zeigen, dass die Initiation der Bildung von Tumorzellkolonien durch S100P induziert wurde. In Bezug auf die humane Bronchialkarzinom-Zelllinie H358 fördert die Expression von S100P die Bildung von Tumorzellkolonien, inhibiert in Folge aber deren weitere Entwicklung. Dieser Einfluss von S100P auf die Malignität der Karzinomzellen, würde erklären, warum S100P hauptsächlich im Frühstadium des Bronchialkarzinoms erhöht exprimiert ist (Abb. 39).

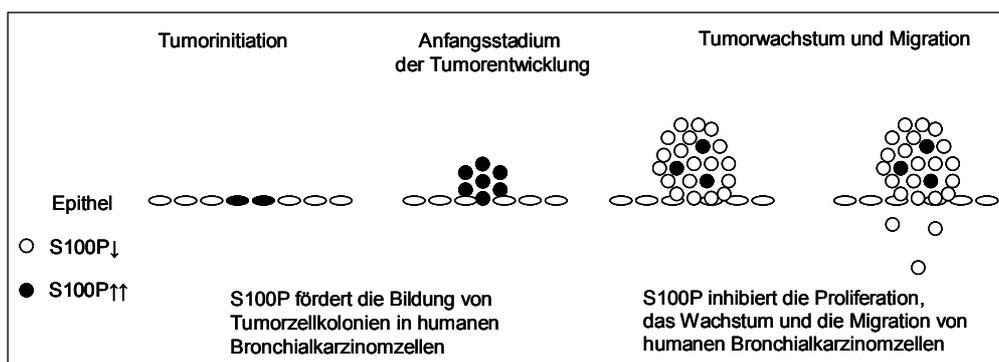


Abb. 39 Schematische Darstellung des Einflusses von S100P auf die Entwicklung des Bronchialkarzinoms

4.3. Identifizierung putativer intrazellulärer Wechselwirkungen von S100P

Für die S100-Proteine sind sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Funktionen bekannt. Wie schon erwähnt, scheint extrazelluläres S100P keinen Einfluss auf die H358-Zellen zu haben. Des Weiteren konnte in den S100P-überexprimierenden H358-Zellen eine überwiegend kernständige Lokalisierung von S100P beobachtet werden, die für eine intrazelluläre Funktion des Proteins in diesen Zellen spricht. Die Lokalisierung von S100P im Zellkern konnte in Schnitten von humanen Bronchialkarzinom-Sektionen bestätigt werden. Dies wird außerdem durch die Identifizierung des S100P-bindenden-Proteins (S100PBPR) unterstützt [Downen *et al.*, 2005]. Sowohl S100P als auch S100PBPR wurden im Zellkern von Zervixkarzinomzellen nachgewiesen und zusammen immunopräzipitiert. Des Weiteren konnten ähnliche mRNA-Expressionsmuster für die beiden Proteine im Pankreaskarzinom detektiert werden. Allerdings kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche Funktion eine solche Interaktion im Zellkern ausübt [Downen *et al.*, 2005] (Abb. 40).

Neben der Lokalisierung im Zellkern konnte S100P auch im Zytoplasma der H358-Zellen nachgewiesen werden. Wie oben diskutiert, interagiert S100P im Zytoplasma von Pankreaskarzinomzellen mit dem Aktin-Zytoskelett und fördert die Motilität der Zellen zusätzlich durch die erhöhte Expression von Cathepsin D [Whiteman *et al.*, 2007]. Auch die Interaktion von S100P mit Ezrin wurde in den vorherigen Abschnitten schon diskutiert [Koltzschner *et al.*, 2003]. Darüber hinaus beeinflusst aktiviertes Ezrin auch die Wechselwirkung von E-Cadherin und β -Catenin negativ, wodurch die Fähigkeit von Karzinomzellen zur Metastasierung ebenfalls gefördert wird [Li *et al.*, 2008]. E-Cadherin ist ein Adhäsionsmolekül, das in der Zellmembran lokalisiert ist und Zell-Zell-Kontakte herstellt. Zytoplasmatisch sind die Cadherine durch die Interaktion mit α - und β -Cateninen mit dem Zytoskelett verbunden. Der Verlust des E-Cadherin/Catenin-Komplexes führt zum Verlust des epithelialen Phänotyps und fördert die Invasivität und Metastasierung von Tumoren [Al Moustafa *et al.*, 2002]. Im humanen Bronchialkarzinom korreliert z. B. eine verminderte Expression von E-Cadherin und eine gleichzeitig erhöhte Expression von S100A4 mit einer schlechten Prognose für den Krankheitsverlauf [Miyazaki *et al.*, 2006]. Abgesehen von der verringerten Expression von E-Cadherin führt auch die Phosphorylierung der Catenine zur Aufhebung des E-Cadherin/Catenin-Komplexes und somit zum Verlust der Zell-Zell-Kontakte [Brembeck *et al.*, 2006]. Zytoplasmatisches β -Catenin wird phosphoryliert und somit für die Ubiquitylierung markiert. Dies führt letztendlich zur Degradierung von β -Catenin [Gavert & Ben-Ze'ev, 2007]. Ezrin inhibiert die Expression von E-Cadherin und fördert die Phosphorylierung von β -Catenin. Somit wird die Metastasierung von Karzinomzellen durch die Überexpression von Ezrin gefördert [Li *et al.*, 2008]. Durch die Interaktion von S100P mit Ezrin ist es dementsprechend möglich, dass auch S100P auf diesem Weg die Motilität von Tumorzellen beeinflusst (Abb. 40).

Neben Ezrin ist auch CacyBP/SIP, ein weiterer S100P-Bindungspartner, an der Regulation von β -Catenin beteiligt. CacyBP/SIP ist in der Lage S100-Proteine (S100A1, S100A6, S100P

u. a.) zu binden [Filipek *et al.*, 2002]. Außerdem ist es an der Ubiquitylierung von unphosphorylierten β -Catenin beteiligt [Matsuzawa & Reed, 2001]. Es verhindert somit die Translokation von freiem zytoplasmatischem β -Catenin in den Zellkern, welches dort im Komplex mit anderen Transkriptionsfaktoren die Transkription von Zielgenen (Onkogene) induziert [Akiyama, 2000] (Abb. 40). Es wird vermutet, dass die Interaktion von S100-Proteinen mit CacyBP/SIP den Zusammenbau des Ubiquitylierungskomplexes reguliert [Filipek *et al.*, 2002; Filipek, 2006]. Sowohl für das Magenkarzinom als auch für das Nierenzellkarzinom konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von CacyBP/SIP und die damit verbundene Reprimierung von freiem β -Catenin die Proliferation, die Tumorigenität und die Invasion der Tumorzellen inhibiert [Ning *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007]. Bestätigt sich die Annahme, dass die Interaktion von S100P und CacyBP/SIP, welches auch in H358-Zellen exprimiert wird, die Stabilität von β -Catenin in der Zelle inhibiert, kann dies eine Erklärung für die verminderte Tumorigenität der S100P-überexprimierenden H358-Zellen darstellen.

Aufgrund der Zellkern-Lokalisierung von S100P kann außerdem ein Einfluss von S100P auf die Expression anderer Gene vermutet werden. Aus diesem Grund wurde die Korrelation der Genexpression im Vergleich zur S100P-Expression in Bronchialkarzinom-Geweben mittels DNA-Mikroarray untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte eine positive Korrelation der Expression von S100P mit Porcupine und NET-7 und eine negative Korrelation mit SMURF2 festgestellt werden. Durch weiterführende Studien konnten die positive Korrelation von S100P mit Porcupine und mit NET-7 mittels Real-Time-PCR an weiteren Bronchialkarzinom-Geweben bestätigt werden. Auch in den stabil S100P-überexprimierenden H358-Zellen konnte im DNA-Mikroarray und mittels Real-Time-PCR eine erhöhte Expression von Porcupine und NET-7 sowie eine verminderte Expression von SMURF2 im Vergleich zu Kontrollzellen gezeigt werden. Diese Abhängigkeit der mRNA-Expression von der S100P-Expression konnte an transient S100P-überexprimierenden Bronchialkarzinomzellen jedoch nicht bestätigt werden. Dies könnte auf einen Langzeit-Effekt der erhöhten S100P-Expression hindeuten, oder durch eine von S100P unabhängige Regulation der Expression erklärt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass unter anderem eine Korrelation zwischen der Expression von S100P und Porcupine besteht. Aus diesem Grund wurde zunächst überprüft, ob Porcupine ähnlich wie S100P durch die Demethylierung der DNA reguliert wird. Durch die Behandlung mit AzDe konnte jedoch kein Einfluss auf die mRNA-Expression von Porcupine gezeigt werden. Auch die verminderte Expression von S100P durch die Transfektion mit siRNA gegen S100P hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Porcupine. Jedoch wurde infolge der Reprimierung von Porcupine mittels siRNA gegen Porcupine eine verminderte mRNA-Expression von S100P in den Bronchialkarzinomzellen H322 und H358 festgestellt. In den schnell proliferierenden Bronchialkarzinomzellen A549 konnte eine entsprechende Abhängigkeit nicht gezeigt werden. Dies lässt sich möglicherweise durch einen schnelleren Grundumsatz der Zellen

erklären, da auch die Reprimierung der mRNA-Expression durch die entsprechende siRNA nicht so ausgeprägt war. Die Ergebnisse der H322-Zellen und der H358-Zellen deuten jedoch auf eine Regulation von S100P durch Porcupine hin. Porcupine ist in der Membran des endoplasmatischen Reticulums lokalisiert und ist an der Sekretion von Wnt beteiligt [Chen *et al.*, 2008]. Das Wnt-Signalprotein bindet extrazellulär an den Rezeptor Frizzled und löst intrazellulär eine Signalkaskade aus, die unter anderem zur Stabilisierung von freiem β -Catenin im Zytoplasma beiträgt. Dieses kann dann in den Zellkern translozieren und dort die Transkription von Onkogenen fördern [Akiyama, 2000]. Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg trägt damit zum Überleben der Zellen bei und ist in Verbindung mit verschiedenen Tumorerkrankungen dereguliert [Moon *et al.*, 2004].

Durch die Inhibierung von Porcupine wurde die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges aufgrund der fehlenden Modifizierung der Wnt-Signalmoleküle vermindert [Chen *et al.*, 2008]. Auch in der vorliegenden Arbeit führte die verminderte Expression von Porcupine in den H358-Zellen zu einer verminderten Protein-Expression von β -Catenin. Da durch die verminderte Expression von Porcupine auch S100P vermindert exprimiert wird, könnten potentielle Wechselwirkungen des Wnt-Signalweges mit der S100P-Expression diskutiert werden. Unabhängig davon, wie die Regulation der S100P-Expression durch die veränderte Expression von Porcupine stattfindet, bleibt die Frage, welche Auswirkung eine veränderte Expression von S100P auf die Expression von β -Catenin hat. Eine verminderte Expression von Porcupine bei einer gleichzeitig erhöhten Expression von S100P verstärkte in den H358-Zellen die Inhibierung der β -Catenin-Protein-Expression. Man kann vermuten, dass durch die verminderte Prozessierung von Wnt-Signalen durch Porcupine die Stabilisierung von β -Catenin im Zytoplasma nicht mehr gewährleistet ist [Brembeck *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008]. Zusätzlich kann durch die S100P-Überexpression in Zusammenhang mit CacyBP/SIP eine verstärkte Ubiquitylierung von β -Catenin unabhängig vom Phosphorylierungsstatus stattfinden, was ebenfalls zu dessen Degradierung führt [Filipek *et al.*, 2002; Filipek, 2006]. Obwohl eine Interaktion von S100P und CacyBP/SIP in den H358-Zellen noch nicht bewiesen ist, scheint es einen Zusammenhang mit der verminderten Expression von β -Catenin und der Überexpression von S100P zu geben, der letztendlich auch die verminderte Proliferation und die verschlechterte Migration der Zellen erklären würde [Ning *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007]. In Abb. 40 sind einige der hier diskutierten intrazellulären Wechselwirkungen von S100P schematisch zusammengefasst.

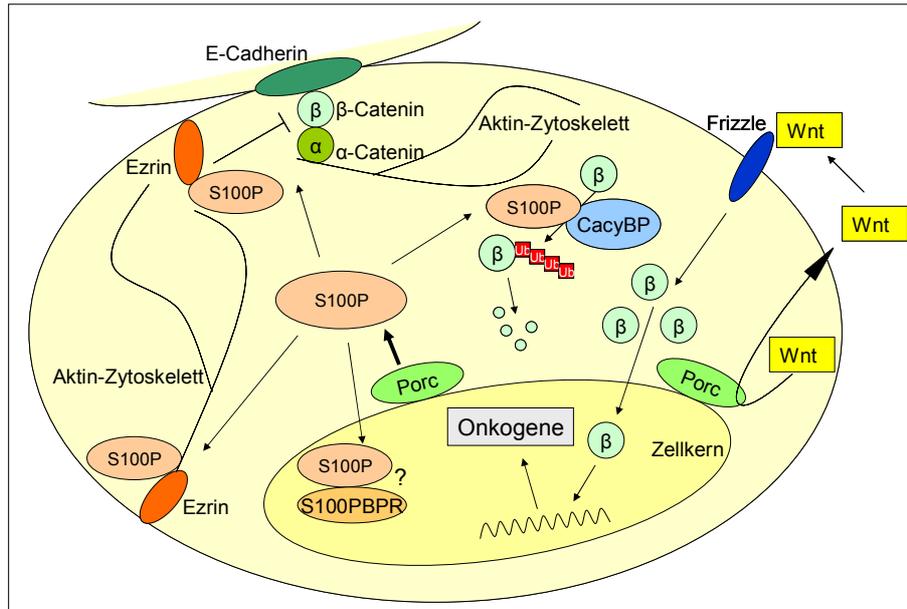


Abb. 40 Schematische Darstellung der potentiellen intrazellulären Wechselwirkungen von S100P

Der Einfluss der verminderten Expression von Porcupine und der gleichzeitig erhöhten Expression von S100P war in den H322-Zellen weniger ausgeprägt. Zum einen war β -Catenin in diesen Zellen im Vergleich zu den H358-Zellen im Allgemeinen wesentlich höher exprimiert, zum anderen wurde in den H322-Zellen durch die Überexpression von S100P die Migration stimuliert. Auch hier scheinen die verschiedenen molekularen Voraussetzungen der einzelnen Zelltypen eine entscheidende Rolle zu spielen.

Ähnlich wie Porcupine korrelierte auch die Expression von NET-7 mit der S100P-Expression in Bronchialkarzinom-Geweben. NET-7 gehört zu den Proteinen der Tetraspan-Familie, einer Familie integraler transmembraner Moleküle, die an der Zelloberfläche große molekulare Komplexe bilden [Serru *et al.*, 2000]. Sie besitzen vier transmembrane Domänen, drei zytoplasmatische Domänen und zwei extrazelluläre Schleifen [Massin *et al.*, 2004]. Die Proteine der Tetraspan-Familie können verschiedene Oberflächenrezeptoren und damit verschiedene zelluläre Funktionen miteinander verbinden [Serru *et al.*, 2000]. Sie beeinflussen unter anderem die Zelladhäsion, die Migration, die Proliferation und die Differenzierung von Zellen und sind aus diesem Grund auch in verschiedenen Tumorerkrankungen von Bedeutung [Massin *et al.*, 2004]. Ein Zusammenhang zwischen Proteinen der Tetraspan-Familie und der S100-Proteine ist bislang nicht bekannt. Durch die Komplexbildung mit anderen Oberflächenrezeptoren (evtl. RAGE) könnten sie allerdings eine wichtige Rolle in der Weiterleitung extrazellulärer Signale einnehmen.

Im Gegensatz zu NET-7 korrelierte die Expression von SMURF2 negativ mit der S100P-Expression in Bronchialkarzinom-Geweben. Die E3 Ubiquitin Ligase SMURF2 inhibiert, unabhängig von der Ubiquitin Ligase-Aktivität, die Proliferation und das Tumorstadium von Tumorzellen *in vitro*. Diese Aktivität von SMURF2 ist von einem intaktem p53- oder pRB-Signalweg abhängig [Zhang *et al.*, 2008]. Allerdings wurden von Zhang *et al.* auch Zelllinien gezeigt, die trotz intaktem p53- und pRB-Signalweg dem von SMURF2

induziertem Proliferationsstopp entgingen. Es wird also auch hier deutlich, dass einzelne Tumorzelllinien unterschiedliche genetische Voraussetzungen mitbringen und aus diesem Grund differenziert auf genetische Manipulation reagieren. Welchen Einfluss eine verminderte SMURF2-Expression bzw. eine erhöhte NET-7-Expression in Zusammenhang mit einer erhöhten S100P-Expression auf die H358-Zellen ausübt, wurde jedoch nicht näher analysiert.

Mit dem Hintergrund dieser Untersuchungen und anhand von Literaturdaten können für S100P verschiedene intrazelluläre Interaktionspartner postuliert werden. Die Interaktion von S100P und Ezrin wurde schon früher gezeigt [Koltzsch *et al.*, 2003], allerdings führt diese Interaktion in den H358-Zellen nicht zu einer Induktion der Migration. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die H358-Zellen im Allgemeinen schlecht migrieren. Des Weiteren konnte von uns eine verminderte β -Catenin-Expression durch die Überexpression von S100P in Zusammenhang mit der Reprimierung von Porcupine gezeigt werden. Da CacyBP in den H358-Zellen exprimiert wird, kann vermutet werden, dass die verminderte β -Catenin-Expression durch die Interaktion von S100P mit CacyBP zurückzuführen ist. Zum einen ist CacyBP als Interaktionspartner von S100P bekannt [Filipek *et al.*, 2002] und zum anderen induziert CacyBP die Ubiquitinylierung und damit die Degradierung von β -Catenin [Ning *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007]. Des Weiteren konnte die mRNA-Expression von CacyBP in den H358-Zellen gezeigt werden. Zusätzlich zu den bekannten Wechselwirkungen von S100P konnte eine Abhängigkeit der S100P-Expression von Porcupine gezeigt werden. Es kann vermutet werden, dass die Expression von S100P in den Bronchialkarzinom-Zellen durch Porcupine reguliert wird. Eine Aussage darüber, inwieweit diese Wechselwirkung das tumorigene Verhalten der Zellen beeinflusst, kann noch nicht getroffen werden. Anhand der Daten spricht vieles dafür, dass eine Deregulation zugunsten der S100P-Expression die Tumorigenität der H358-Zellen vermindert. Der Einfluss der S100P-Überexpression ist allerdings stark vom Karzinomzelltyp und den damit verbundenen genetischen Voraussetzungen abhängig.

Um die Funktion von S100P in verschiedenen Zelltypen und Karzinomen besser charakterisieren zu können, sollten deshalb zunächst weitere Interaktionspartner und potentielle Signalwege für S100P identifiziert werden. Darüber hinaus bleibt zu überprüfen, inwieweit S100P auch *in vivo* die Initiation und Progression des bronchialen Adenokarzinoms beeinflusst.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Initiation und Progression von Tumoren sind auf genetische und epigenetische Veränderungen in der Zelle zurückzuführen, die letztendlich zu einer veränderten Zellfunktion führen. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde für das bronchiale Adenokarzinom eine erhöhte Expression von S100P im Frühstadium der Erkrankung gezeigt, welche in späteren Stadien wieder normalisiert war. Gleichzeitig war die Expression des potentiellen S100P-Rezeptors RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) im humanen Bronchialkarzinom stadienunabhängig vermindert. Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von S100P auf die Chemotherapie-Resistenz und auf Parameter der Tumorentwicklung sowie die Wechselwirkung zwischen S100P und RAGE im humanen Bronchialkarzinom *in vitro* zu analysieren.

Mittels RT-PCR wurde die Expression von S100P in Bronchialkarzinom-Geweben und den Bronchialkarzinomzellen H358, H322 und A549 gezeigt. Die H358-Zellen wurden daraufhin mit den zytotoxischen Agenzien CGP 74514A, Cisplatin, Etoposid, MG-132 und Paclitaxel behandelt und der nekrotische Zelltod durch die Analyse der Membranintegrität bzw. der apoptotische Zelltod anhand der Chromatinkondensation bestimmt. Zusätzlich wurde mittels RT-PCR die Expression von S100P analysiert. Obwohl die Expression von S100P durch Etoposid und MG-132 erhöht war, konnte kein Zusammenhang zwischen der S100P-Expression und der Induktion des Zelltodes infolge der Behandlung mit den zytotoxischen Agenzien nachgewiesen werden.

Für S100P konnte durch die Überexpression des GFP-S100P-Fusionsproteins in den H358-Zellen eine Lokalisierung im Zellkern und im Zytoplasma gezeigt werden. Im Zytoplasma war die Kolokalisierung von S100P mit dem S100P-Bindungspartner Ezrin nachweisbar. Im Gegensatz zu den Literaturdaten kam es aber zu keiner vermehrten Freisetzung von GFP-S100P in das umgebende Medium.

Die Zelltodanalysen der S100P-überexprimierenden H358-Zellen zeigten nur einen geringen Einfluss von S100P auf die Zelltodinduktion durch zytotoxische Agenzien. Demgegenüber führte die Koexpression von S100P mit RAGE bzw. Δ cytoRAGE in den H358-Zellen zu einer Sensibilisierung gegenüber Etoposid und MG-132. Die *in vitro*-Analysen zur Tumorinitiation und Tumorprogression im *tumor-colony-forming*-Assay zeigten darüber hinaus, dass die Überexpression von S100P in den H358-Zellen die primäre Bildung von Tumorzellkolonien fördert. Dagegen war das weitere Wachstum dieser Tumorzellkolonien durch S100P vermindert. Gleichzeitig war auch die Proliferation der S100P-überexprimierenden Zellen *in vitro* vermindert. Die Überexpression von S100P führte im Wundheilungs-Test und im Transwell-Test außerdem zu einer verminderten Migration der Zellen *in vitro*. Im Gegensatz zu den H358-Zellen resultierte die S100P-Überexpression in den besser migrierenden H322-Bronchialkarzinomzellen in einer vermehrten Migration der Zellen im Transwell-Test.

In dieser Arbeit wurden zusätzlich potentielle Regulationsmechanismen der S100P-Expression untersucht. Dabei wurde der Einfluss der DNA-Methylierung, welcher ein wichtiger Regulationsmechanismus der Genexpression in Tumoren ist, durch die Behandlung mit dem Cytosin-Analogon 5-Aza-2'-deoxy-Cytidin untersucht. Die Behandlung mit diesem Methylierungsinhibitor führte in den H358-Zellen zu einer erhöhten mRNA-Expression von S100P. Des Weiteren resultierte die Überexpression von exogenem S100P durch einen unbekanntem negativen *feedback*-Mechanismus in einer reduzierten endogenen S100P-Expression. Die basale Expression von S100P war außerdem durch die Inhibierung der ERK 1/2 MAP Kinase vermindert. Zusätzlich führte auch die Inhibierung von Porcupine, welches Wnt-Signalproteine in der Zelle prozessiert und an deren Sekretion beteiligt ist, zu einer reduzierten S100P-Expression.

In dieser Arbeit wurde anhand von *in vitro*-Analysen an H358-Bronchialkarzinomzellen die Stimulation der Tumorinitiation durch S100P gezeigt. Gleichzeitig war die Tumorprogression (Proliferation, Migration) durch S100P jedoch gehemmt. Deshalb kann vermutet werden, dass S100P insbesondere zur Entstehung früher Stadien des bronchialen Adenokarzinoms beiträgt. Andererseits scheinen die Effekte von S100P sehr zelltypspezifisch zu sein. So stimulierte S100P im Gegensatz zu den H358-Zellen in den H322-Zellen die Migration der Zellen.

Die Identifikation intrazellulärer Interaktionspartner von S100P und deren Einfluss auf die Zellfunktion könnte deshalb zukünftig wichtige Aufschlüsse für die Charakterisierung und die Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen geben. Die Ergebnisse der hier erfolgten *in vitro*-Analysen sollten jedoch zunächst auch *in vivo* im Mausmodell bestätigt werden.

6. Literaturverzeichnis

- S. Adhikary , M. Eilers.** (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(8): 635-45
- T. Akiyama.** (2000). Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**(4): 273-82
- A. E. Al Moustafa, L. Yen, N. Benlimame , M. A. Alaoui-Jamali.** (2002). Regulation of E-cadherin/catenin complex patterns by epidermal growth factor receptor modulation in human lung cancer cells. *Lung Cancer* **37**(1): 49-56
- P. Allavena, A. Sica, G. Solinas, C. Porta , A. Mantovani.** (2008). The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* **66**(1): 1-9
- T. Arumugam, D. M. Simeone, A. M. Schmidt , C. D. Logsdon.** (2004). S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation end products (RAGE). *J Biol Chem* **279**(7): 5059-65
- T. Arumugam, D. M. Simeone, K. Van Golen , C. D. Logsdon.** (2005). S100P promotes pancreatic cancer growth, survival, and invasion. *Clin Cancer Res* **11**(15): 5356-64
- J. Austermann, A. R. Nazmi, A. Heil, G. Fritz, M. Kolinski, S. Filipek , V. Gerke.** (2008a). Generation and characterization of a novel, permanently active S100P mutant. *Biochim Biophys Acta*
- J. Austermann, A. R. Nazmi, C. Muller-Tidow , V. Gerke.** (2008b). Characterization of the Ca²⁺-regulated ezrin-S100P interaction and its role in tumor cell migration. *J Biol Chem* **283**(43): 29331-40
- R. Barraclough.** (1998). Calcium-binding protein S100A4 in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1448**(2): 190-9
- B. Bartling, H. S. Hofmann, B. Weigle, R. E. Silber , A. Simm.** (2005). Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis* **26**(2): 293-301
- B. Bartling, G. Rehbein, W. D. Schmitt, H. S. Hofmann, R. E. Silber , A. Simm.** (2007). S100A2-S100P expression profile and diagnosis of non-small cell lung carcinoma: Impairment by advanced tumour stages and neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer*
- B. Bartling, M. Desole, S. Rohrbach, R. E. Silber , A. Simm.** (2009). Age-associated changes of extracellular matrix collagen impair lung cancer cell migration. *Faseb J* **23**(5): 1510-20
- G. D. Basu, D. O. Azorsa, J. A. Kiefer, A. M. Rojas, S. Tuzmen, M. T. Barrett, J. M. Trent, O. Kallioniemi , S. Mousses.** (2008). Functional evidence implicating S100P in prostate cancer progression. *Int J Cancer* **123**(2): 330-9

- T. Becker, V. Gerke, E. Kube, K. Weber.** (1992). S100P, a novel Ca(2+)-binding protein from human placenta. cDNA cloning, recombinant protein expression and Ca²⁺ binding properties. *Eur J Biochem* **207**(2): 541-7
- M. Beeram, A. Patnaik, E. K. Rowinsky.** (2005). Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer. *J Clin Oncol* **23**(27): 6771-90
- B. L. Bennett, D. T. Sasaki, B. W. Murray, E. C. O'Leary, S. T. Sakata, W. Xu, J. C. Leisten, A. Motiwala, S. Pierce, Y. Satoh, S. S. Bhagwat, A. M. Manning, D. W. Anderson.** (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 13681-6
- J. Bertram, K. Palfner, W. Hiddemann, M. Kneba.** (1998). Elevated expression of S100P, CAPL and MAGE 3 in doxorubicin-resistant cell lines: comparison of mRNA differential display reverse transcription-polymerase chain reaction and subtractive suppressive hybridization for the analysis of differential gene expression. *Anticancer Drugs* **9**(4): 311-7
- J. S. Bertram.** (2000). The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* **21**(6): 167-223
- A. Bierhaus, P. M. Humpert, M. Morcos, T. Wendt, T. Chavakis, B. Arnold, D. M. Stern, P. P. Nawroth.** (2005). Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med* **83**(11): 876-86
- M. G. Binker, A. A. Binker-Cosen, D. Richards, B. Oliver, L. I. Cosen-Binker.** (2009). EGF promotes invasion by PANC-1 cells through Rac1/ROS-dependent secretion and activation of MMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* **379**(2): 445-50
- K. Bjornland, J. O. Winberg, O. T. Odegaard, E. Hovig, T. Loennechen, A. O. Aasen, O. Fodstad, G. M. Maelandsmo.** (1999). S100A4 involvement in metastasis: deregulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in osteosarcoma cells transfected with an anti-S100A4 ribozyme. *Cancer Res* **59**(18): 4702-8
- P. Bonomi.** (2002). Matrix metalloproteinases and matrix metalloproteinase inhibitors in lung cancer. *Semin Oncol* **29**(1 Suppl 4): 78-86
- C. Brantley-Finley, C. S. Lyle, L. Du, M. E. Goodwin, T. Hall, D. Szvedo, G. P. Kaushal, T. C. Chambers.** (2003). The JNK, ERK and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by the antitumor agents vinblastine, doxorubicin, and etoposide. *Biochem Pharmacol* **66**(3): 459-69
- F. H. Brembeck, M. Rosario, W. Birchmeier.** (2006). Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* **16**(1): 51-9
- A. J. Brenner, A. Paladugu, H. Wang, O. I. Olopade, M. H. Dreyling, C. M. Aldaz.** (1996). Preferential loss of expression of p16(INK4a) rather than p19(ARF) in breast cancer. *Clin Cancer Res* **2**(12): 1993-8

- J. Brett, A. M. Schmidt, S. D. Yan, Y. S. Zou, E. Weidman, D. Pinsky, R. Nowygrod, M. Neeper, C. Przysiecki, A. Shaw , et al.** (1993). Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* **143**(6): 1699-712
- R. H. Breuer, P. E. Postmus , E. F. Smit.** (2005). Molecular pathology of non-small-cell lung cancer. *Respiration* **72**(3): 313-30
- P. D. Brown, R. E. Bloxidge, N. S. Stuart, K. C. Gatter , J. Carmichael.** (1993). Association between expression of activated 72-kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **85**(7): 574-8
- E. Bulk, A. Hascher, R. Liersch, R. M. Mesters, S. Diederichs, B. Sargin, V. Gerke, M. Hotfilder, J. Vormoor, W. E. Berdel, H. Serve , C. Muller-Tidow.** (2008). Adjuvant therapy with small hairpin RNA interference prevents non-small cell lung cancer metastasis development in mice. *Cancer Res* **68**(6): 1896-904
- E. Bulk, B. Sargin, U. Krug, A. Hascher, Y. Jun, M. Knop, C. Kerkhoff, V. Gerke, R. Liersch, R. M. Mesters, M. Hotfilder, A. Marra, S. Koschmieder, M. Dugas, W. E. Berdel, H. Serve , C. Muller-Tidow.** (2009). S100A2 induces metastasis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **15**(1): 22-9
- L. Bullinger, K. Dohner, E. Bair, S. Frohling, R. F. Schlenk, R. Tibshirani, H. Dohner , J. R. Pollack.** (2004). Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **350**(16): 1605-16
- C. Chang , Z. Werb.** (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* **11**(11): S37-43
- T. Chavakis, A. Bierhaus, N. Al-Fakhri, D. Schneider, S. Witte, T. Linn, M. Nagashima, J. Morser, B. Arnold, K. T. Preissner , P. P. Nawroth.** (2003). The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med* **198**(10): 1507-15
- Z. Chen, J. Li, Q. S. Li, J. Q. Fan, X. M. Dong, J. P. Xu, X. M. Wang, G. W. Yang, P. Yan, G. Z. Wen, Y. T. Zhang, R. G. Niu, P. H. Nan, J. He , H. M. Zhou.** (2008). Suppression of PPN/MG61 attenuates Wnt/beta-catenin signaling pathway and induces apoptosis in human lung cancer. *Oncogene* **27**(24): 3483-8
- Y. G. Cho, S. W. Nam, T. Y. Kim, Y. S. Kim, C. J. Kim, J. Y. Park, J. H. Lee, H. S. Kim, J. W. Lee, C. H. Park, Y. H. Song, S. H. Lee, N. J. Yoo, J. Y. Lee , W. S. Park.** (2003). Overexpression of S100A4 is closely related to the aggressiveness of gastric cancer. *Apmis* **111**(5): 539-45
- C. K. Chung, R. Zaino, J. A. Stryker, M. O'Neill, Jr. , W. E. DeMuth, Jr.** (1982). Carcinoma of the lung: evaluation of histological grade and factors influencing prognosis. *Ann Thorac Surg* **33**(6): 599-604
- R. Clynes, B. Moser, S. F. Yan, R. Ramasamy, K. Herold , A. M. Schmidt.** (2007). Receptor for AGE (RAGE): weaving tangled webs within the inflammatory response. *Curr Mol Med* **7**(8): 743-51

- M. H. Cobb.** (1999). MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* **71**(3-4): 479-500
- C. Cordes, B. Bartling, A. Simm, D. Afar, C. Lautenschlager, G. Hansen, R. E. Silber, S. Burdach , H. S. Hofmann.** (2009). Simultaneous expression of Cathepsins B and K in pulmonary adenocarcinomas and squamous cell carcinomas predicts poor recurrence-free and overall survival. *Lung Cancer* **64**(1): 79-85
- T. Crnogorac-Jurcevic, E. Missiaglia, E. Blaveri, R. Gangeswaran, M. Jones, B. Terris, E. Costello, J. P. Neoptolemos , N. R. Lemoine.** (2003). Molecular alterations in pancreatic carcinoma: expression profiling shows that dysregulated expression of S100 genes is highly prevalent. *J Pathol* **201**(1): 63-74
- S. S. Cross, F. C. Hamdy, J. C. Deloulme , I. Rehman.** (2005). Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. *Histopathology* **46**(3): 256-69
- V. Cryns , J. Yuan.** (1998). Proteases to die for. *Genes Dev* **12**(11): 1551-70
- Y. Dai, P. Dent , S. Grant.** (2002). Induction of apoptosis in human leukemia cells by the CDK1 inhibitor CGP74514A. *Cell Cycle* **1**(2): 143-52
- J. E. Darnell, Jr.** (1997). STATs and gene regulation. *Science* **277**(5332): 1630-5
- G. E. Davey, P. Murmann, M. Hoehli, T. Tanaka , C. W. Heizmann.** (2000). Calcium-dependent translocation of S100A11 requires tubulin filaments. *Biochim Biophys Acta* **1498**(2-3): 220-32
- M. P. Davies, P. S. Rudland, L. Robertson, E. W. Parry, P. Jolicoeur , R. Barraclough.** (1996). Expression of the calcium-binding protein S100A4 (p9Ka) in MMTV-neu transgenic mice induces metastasis of mammary tumours. *Oncogene* **13**(8): 1631-7
- O. De Wever, P. Pauwels, B. De Craene, M. Sabbah, S. Emami, G. Redeuilh, C. Gespach, M. Bracke , G. Berx.** (2008). Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol* **130**(3): 481-94
- R. T. Dell'Orco, J. G. Mertens , P. F. Kruse, Jr.** (1973). Doubling potential, calendar time, and senescence of human diploid cells in culture. *Exp Cell Res* **77**(1): 356-60
- N. Demling, C. Ehrhardt, M. Kasper, M. Laue, L. Knels , E. P. Rieber.** (2006). Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell Tissue Res* **323**(3): 475-88
- S. Diederichs, E. Bulk, B. Steffen, P. Ji, L. Tickenbrock, K. Lang, K. S. Zanker, R. Metzger, P. M. Schneider, V. Gerke, M. Thomas, W. E. Berdel, H. Serve , C. Muller-Tidow.** (2004). S100 family members and trypsinogens are predictors of distant metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **64**(16): 5564-9

- R. Donato.** (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* **33**(7): 637-68
- R. Donato.** (2003). Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* **60**(6): 540-51
- R. Donato.** (2007). RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr Mol Med* **7**(8): 711-24
- S. E. Downen, T. Crnogorac-Jurcevic, R. Gangeswaran, M. Hansen, J. J. Eloranta, V. Bhakta, T. A. Brentnall, J. Luttges, G. Kloppel, N. R. Lemoine.** (2005). Expression of S100P and its novel binding partner S100PBPR in early pancreatic cancer. *Am J Pathol* **166**(1): 81-92
- R. L. Eckert, A. M. Broome, M. Ruse, N. Robinson, D. Ryan, K. Lee.** (2004). S100 proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol* **123**(1): 23-33
- M. Ehrlich.** (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* **21**(35): 5400-13
- W. El-Rifai, C. A. Moskaluk, M. K. Abdrabbo, J. Harper, C. Yoshida, G. J. Riggins, H. F. Frierson, Jr., S. M. Powell.** (2002). Gastric cancers overexpress S100A calcium-binding proteins. *Cancer Res* **62**(23): 6823-6
- V. A. Fadok, A. de Cathelineau, D. L. Daleke, P. M. Henson, D. L. Bratton.** (2001). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* **276**(2): 1071-7
- J. Y. Fang, B. C. Richardson.** (2005). The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* **6**(5): 322-7
- M. F. Favata, K. Y. Horiuchi, E. J. Manos, A. J. Daulerio, D. A. Stradley, W. S. Feeser, D. E. Van Dyk, W. J. Pitts, R. A. Earl, F. Hobbs, R. A. Copeland, R. L. Magolda, P. A. Scherle, J. M. Trzaskos.** (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* **273**(29): 18623-32
- A. Filipek, B. Jastrzebska, M. Nowotny, J. Kuznicki.** (2002). CacyBP/SIP, a calcyclin and Siah-1-interacting protein, binds EF-hand proteins of the S100 family. *J Biol Chem* **277**(32): 28848-52
- A. Filipek.** (2006). S100A6 and CacyBP/SIP - two proteins discovered in ehrlich ascites tumor cells that are potentially involved in the degradation of beta-catenin. *Chemotherapy* **52**(1): 32-4
- M. Flinterman, F. Farzaneh, N. Habib, F. Malik, J. Gaken, M. Tavassoli.** (2009). Delivery of therapeutic proteins as secretable TAT fusion products. *Mol Ther* **17**(2): 334-42

- D. Foell, H. Wittkowski, T. Vogl, J. Roth.** (2006). S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol*
- M. K. Fuentes, S. S. Nigavekar, T. Arumugam, C. D. Logsdon, A. M. Schmidt, J. C. Park, E. H. Huang.** (2007). RAGE Activation by S100P in Colon Cancer Stimulates Growth, Migration, and Cell Signaling Pathways. *Dis Colon Rectum*
- J. H. Gao, Z. J. He, Q. Wang, X. Li, Y. X. Li, M. Liu, J. H. Zheng, H. Tang.** (2008). Low expression of S100P associated with paclitaxel resistance in ovarian cancer cell line. *Chin Med J (Engl)* **121**(16): 1563-8
- N. Gavert, A. Ben-Ze'ev.** (2007). beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem* **102**(4): 820-8
- C. Gebhardt, A. Riehl, M. Durchdewald, J. Nemeth, G. Furstenberger, K. Muller-Decker, A. Enk, B. Arnold, A. Bierhaus, P. P. Nawroth, J. Hess, P. Angel.** (2008). RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development. *J Exp Med* **205**(2): 275-85
- S. Ghavami, C. Kerkhoff, M. Los, M. Hashemi, C. Sorg, F. Karami-Tehrani.** (2004). Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. *J Leukoc Biol* **76**(1): 169-75
- A. Gibadulinova, M. Barathova, J. Kopacek, A. Hulikova, S. Pastorekova, R. Kettmann, J. Pastorek.** (2005). Expression of S100P protein correlates with and contributes to the tumorigenic capacity of HeLa cervical carcinoma cells. *Oncol Rep* **14**(2): 575-82
- A. Gibadulinova, I. Oveckova, S. Parkkila, S. Pastorekova, J. Pastorek.** (2008). Key promoter elements involved in transcriptional activation of the cancer-related gene coding for S100P calcium-binding protein. *Oncol Rep* **20**(2): 391-6
- M. Giuliano, A. D'Anneo, A. De Blasio, R. Vento, G. Tesoriere.** (2003). Apoptosis meets proteasome, an invaluable therapeutic target of anticancer drugs. *Ital J Biochem* **52**(2): 112-21
- S. Goswami, E. Sahai, J. B. Wyckoff, M. Cammer, D. Cox, F. J. Pixley, E. R. Stanley, J. E. Segall, J. S. Condeelis.** (2005). Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res* **65**(12): 5278-83
- A. V. Gribenko, J. E. Hopper, G. I. Makhatadze.** (2001). Molecular characterization and tissue distribution of a novel member of the S100 family of EF-hand proteins. *Biochemistry* **40**(51): 15538-48
- I. D. Guerreiro Da Silva, Y. F. Hu, I. H. Russo, X. Ao, A. M. Salicioni, X. Yang, J. Russo.** (2000). S100P calcium-binding protein overexpression is associated with immortalization of human breast epithelial cells in vitro and early stages of breast cancer development in vivo. *Int J Oncol* **16**(2): 231-40

- S. Gupta, T. Hussain, G. T. MacLennan, P. Fu, J. Patel, H. Mukhtar.** (2003). Differential expression of S100A2 and S100A4 during progression of human prostate adenocarcinoma. *J Clin Oncol* **21**(1): 106-12
- T. Hagemann, S. C. Robinson, M. Schulz, L. Trumper, F. R. Balkwill, C. Binder.** (2004). Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* **25**(8): 1543-9
- A. Hammacher, E. W. Thompson, E. D. Williams.** (2005). Interleukin-6 is a potent inducer of S100P, which is up-regulated in androgen-refractory and metastatic prostate cancer. *Int J Biochem Cell Biol* **37**(2): 442-50
- D. Hanahan, R. A. Weinberg.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70
- Z. He, X. Sun, G. Mei, S. Yu, N. Li.** (2008). Nonclassical secretion of human catalase on the surface of CHO cells is more efficient than classical secretion. *Cell Biol Int* **32**(4): 367-73
- A. Hermani, J. Hess, B. De Servi, S. Medunjanin, R. Grobholz, L. Trojan, P. Angel, D. Mayer.** (2005). Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* **11**(14): 5146-52
- A. Hermani, B. De Servi, S. Medunjanin, P. A. Tessier, D. Mayer.** (2006). S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. *Exp Cell Res* **312**(2): 184-97
- H. S. Hofmann, B. Bartling, A. Simm, R. Murray, N. Aziz, G. Hansen, R. E. Silber, S. Burdach.** (2006). Identification and classification of differentially expressed genes in non-small cell lung cancer by expression profiling on a global human 59.620-element oligonucleotide array. *Oncol Rep* **16**(3): 587-95
- M. A. Hofmann, S. Drury, C. Fu, W. Qu, A. Taguchi, Y. Lu, C. Avila, N. Kambham, A. Bierhaus, P. Nawroth, M. F. Neurath, T. Slattery, D. Beach, J. McClary, M. Nagashima, J. Morser, D. Stern, A. M. Schmidt.** (1999). RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* **97**(7): 889-901
- H. L. Hsieh, B. W. Schafer, N. Sasaki, C. W. Heizmann.** (2003). Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays. *Biochem Biophys Res Commun* **307**(2): 375-81
- H. L. Hsieh, B. W. Schafer, B. Weigle, C. W. Heizmann.** (2004). S100 protein translocation in response to extracellular S100 is mediated by receptor for advanced glycation endproducts in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **316**(3): 949-59
- H. J. Huttunen, J. Kuja-Panula, G. Sorci, A. L. Agneletti, R. Donato, H. Rauvala.** (2000). Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem* **275**(51): 40096-105

- H. J. Huttunen, C. Fages, J. Kuja-Panula, A. J. Ridley , H. Rauvala.** (2002). Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Res* **62**(16): 4805-11
- F. H. Igney , P. H. Krammer.** (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2**(4): 277-88
- E. C. Ilg, B. W. Schafer , C. W. Heizmann.** (1996). Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. *Int J Cancer* **68**(3): 325-32
- Y. Ishii, T. Kasukabe , Y. Honma.** (2005). Immediate up-regulation of the calcium-binding protein S100P and its involvement in the cytokinin-induced differentiation of human myeloid leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* **1745**(2): 156-65
- C. Jedeszko , B. F. Sloane.** (2004). Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol Chem* **385**(11): 1017-27
- J. Ji, L. Zhao, X. Wang, C. Zhou, F. Ding, L. Su, C. Zhang, X. Mao, M. Wu , Z. Liu.** (2004). Differential expression of S100 gene family in human esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **130**(8): 480-6
- G. Jin, S. Wang, X. Hu, Z. Jing, J. Chen, K. Ying, Y. Xie , Y. Mao.** (2003). Characterization of the tissue-specific expression of the s100P gene which encodes an EF-hand Ca²⁺-binding protein. *Mol Biol Rep* **30**(4): 243-8
- M. D. Johnson, J. A. Torri, M. E. Lippman , R. B. Dickson.** (1993). The role of cathepsin D in the invasiveness of human breast cancer cells. *Cancer Res* **53**(4): 873-7
- P. A. Jones , S. B. Baylin.** (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* **3**(6): 415-28
- M. A. Jordan , L. Wilson.** (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* **4**(4): 253-65
- B. Joseph, J. Ekedahl, R. Lewensohn, P. Marchetti, P. Formstecher , B. Zhivotovsky.** (2001). Defective caspase-3 relocalization in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* **20**(23): 2877-88
- J. A. Joyce, A. Baruch, K. Chehade, N. Meyer-Morse, E. Giraudo, F. Y. Tsai, D. C. Greenbaum, J. H. Hager, M. Bogyo , D. Hanahan.** (2004). Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell* **5**(5): 443-53
- J. A. Joyce , D. Hanahan.** (2004). Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. *Cell Cycle* **3**(12): 1516-619
- K. Junker, K. M. Muller, U. Bosse, F. Klinke, A. Heinecke , M. Thomas.** (2003). [Apoptosis and tumor regression in locally advanced non-small cell lung cancer with neoadjuvant therapy]. *Pathologie* **24**(3): 214-9

- Y. Kanai.** (2008). Alterations of DNA methylation and clinicopathological diversity of human cancers. *Pathol Int* **58**(9): 544-58
- L. Kask, L. A. Trouw, B. Dahlback , A. M. Blom.** (2004). The C4b-binding protein-protein S complex inhibits the phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem* **279**(23): 23869-73
- H. A. Kenny, S. Kaur, L. M. Coussens , E. Lengyel.** (2008). The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *J Clin Invest* **118**(4): 1367-79
- T. Y. Kim, H. S. Jong, S. H. Song, A. Dimtchev, S. J. Jeong, J. W. Lee, N. K. Kim, M. Jung , Y. J. Bang.** (2003). Transcriptional silencing of the DLC-1 tumor suppressor gene by epigenetic mechanism in gastric cancer cells. *Oncogene* **22**(25): 3943-51
- M. Koltzsch, C. Neumann, S. Konig , V. Gerke.** (2003). Ca²⁺-dependent binding and activation of dormant ezrin by dimeric S100P. *Mol Biol Cell* **14**(6): 2372-84
- R. Krishna , L. D. Mayer.** (2000). Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* **11**(4): 265-83
- U. K. Laemmli.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259): 680-5
- H. Lage.** (2008). An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cell Mol Life Sci* **65**(20): 3145-67
- T. Lang, I. Wacker, J. Steyer, C. Kaether, I. Wunderlich, T. Soldati, H. H. Gerdes , W. Almers.** (1997). Ca²⁺-triggered peptide secretion in single cells imaged with green fluorescent protein and evanescent-wave microscopy. *Neuron* **18**(6): 857-63
- D. A. Lauffenburger , A. F. Horwitz.** (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**(3): 359-69
- D. A. Lawrence, R. Pircher, C. Kryceve-Martinerie , P. Jullien.** (1984). Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form. *J Cell Physiol* **121**(1): 184-8
- J. K. Lee, M. J. Kim, S. P. Hong , S. D. Hong.** (2004). Inactivation patterns of p16/INK4A in oral squamous cell carcinomas. *Exp Mol Med* **36**(2): 165-71
- S. W. Lee, C. Tomasetto, K. Swisshelm, K. Keyomarsi , R. Sager.** (1992). Down-regulation of a member of the S100 gene family in mammary carcinoma cells and reexpression by azadeoxycytidine treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(6): 2504-8
- Q. Li, M. Wu, H. Wang, G. Xu, T. Zhu, Y. Zhang, P. Liu, A. Song, C. Gang, Z. Han, J. Zhou, L. Meng, Y. Lu, S. Wang , D. Ma.** (2008). Ezrin silencing by small hairpin RNA reverses metastatic behaviors of human breast cancer cells. *Cancer Lett* **261**(1): 55-63
- E. T. Liu.** (2008). Functional genomics of cancer. *Curr Opin Genet Dev*

- S. Q. Liu, J. P. Yu, H. G. Yu, P. Lv, H. L. Chen.** (2006). Activation of Akt and ERK signalling pathways induced by etoposide confer chemoresistance in gastric cancer cells. *Dig Liver Dis* **38**(5): 310-8
- C. D. Logsdon, M. K. Fuentes, E. H. Huang, T. Arumugam.** (2007). RAGE and RAGE ligands in cancer. *Curr Mol Med* **7**(8): 777-89
- G. M. Maelandsmo, V. A. Florenes, T. Mellingsaeter, E. Hovig, R. S. Kerbel, O. Fodstad.** (1997). Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma. *Int J Cancer* **74**(4): 464-9
- U. Mahlknecht, D. Hoelzer.** (2000). Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease. *Mol Med* **6**(8): 623-44
- P. C. Mahon, P. Baril, V. Bhakta, C. Chelala, K. Caulee, T. Harada, N. R. Lemoine.** (2007). S100A4 contributes to the suppression of BNIP3 expression, chemoresistance, and inhibition of apoptosis in pancreatic cancer. *Cancer Res* **67**(14): 6786-95
- M. Mandel, A. Higa.** (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**(1): 159-62
- A. Mansouri, L. D. Ridgway, A. L. Korapati, Q. Zhang, L. Tian, Y. Wang, Z. H. Siddik, G. B. Mills, F. X. Claret.** (2003). Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* **278**(21): 19245-56
- I. Marenholz, C. W. Heizmann, G. Fritz.** (2004). S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* **322**(4): 1111-22
- F. Massin, E. Rubinstein, G. C. Faure, Y. Martinet, C. Boucheix, M. C. Bene.** (2004). Tetraspan and beta-1 integrins expression pattern of the epithelial lung adenocarcinoma cell line A549 and its sensitivity to divalent cations. *Cytometry B Clin Cytom* **60**(1): 31-6
- D. Matsubara, T. Niki, S. Ishikawa, A. Goto, E. Ohara, T. Yokomizo, C. W. Heizmann, H. Aburatani, S. Moriyama, H. Moriyama, Y. Nishimura, N. Funata, M. Fukayama.** (2005). Differential expression of S100A2 and S100A4 in lung adenocarcinomas: clinicopathological significance, relationship to p53 and identification of their target genes. *Cancer Sci* **96**(12): 844-57
- S. I. Matsuzawa, J. C. Reed.** (2001). Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell* **7**(5): 915-26
- M. P. Mattson, S. L. Chan.** (2003). Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol* **5**(12): 1041-3
- N. Miyazaki, Y. Abe, Y. Oida, H. Suemizu, M. Nishi, H. Yamazaki, M. Iwasaki, H. Inoue, Y. Ueyama, M. Nakamura.** (2006). Poor outcome of patients with pulmonary adenocarcinoma showing decreased E-cadherin combined with increased S100A4 expression. *Int J Oncol* **28**(6): 1369-74

- J. R. Molina, P. Yang, S. D. Cassivi, S. E. Schild, A. A. Adjei.** (2008). Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* **83**(5): 584-94
- A. Moon, H. Y. Yong, J. I. Song, D. Cukovic, S. Salagrama, D. Kaplan, D. Putt, H. Kim, A. Dombkowski, H. R. Kim.** (2008). Global gene expression profiling unveils S100A8/A9 as candidate markers in H-ras-mediated human breast epithelial cell invasion. *Mol Cancer Res* **6**(10): 1544-53
- R. T. Moon, A. D. Kohn, G. V. De Ferrari, A. Kaykas.** (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* **5**(9): 691-701
- P. Morbini, C. Villa, I. Campo, M. Zorzetto, S. Inghilleri, M. Luisetti.** (2006). The receptor for advanced glycation end products and its ligands: a new inflammatory pathway in lung disease? *Mod Pathol* **19**(11): 1437-45
- N. Nagy, C. Brenner, N. Markadieu, C. Chaboteaux, I. Camby, B. W. Schafer, R. Pochet, C. W. Heizmann, I. Salmon, R. Kiss, C. Decaestecker.** (2001). S100A2, a putative tumor suppressor gene, regulates in vitro squamous cell carcinoma migration. *Lab Invest* **81**(4): 599-612
- M. Neeper, A. M. Schmidt, J. Brett, S. D. Yan, F. Wang, Y. C. Pan, K. Elliston, D. Stern, A. Shaw.** (1992). Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* **267**(21): 14998-5004
- R. A. Newton, N. Hogg.** (1998). The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils. *J Immunol* **160**(3): 1427-35
- D. X. Nguyen, J. Massague.** (2007). Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* **8**(5): 341-52
- X. Ning, S. Sun, L. Hong, J. Liang, L. Liu, S. Han, Z. Liu, Y. Shi, Y. Li, W. Gong, S. Zhang, Y. Chen, X. Guo, Y. Cheng, K. Wu, D. Fan.** (2007). Calcyclin-binding protein inhibits proliferation, tumorigenicity, and invasion of gastric cancer. *Mol Cancer Res* **5**(12): 1254-62
- J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan.** (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **267**(17): 5421-6
- N. Ohashi, T. Yamamoto, C. Uchida, A. Togawa, H. Fukasawa, Y. Fujigaki, S. Suzuki, K. Kitagawa, T. Hattori, T. Oda, H. Hayashi, A. Hishida, M. Kitagawa.** (2005). Transcriptional induction of Smurf2 ubiquitin ligase by TGF-beta. *FEBS Lett* **579**(12): 2557-63
- K. Ohuchida, K. Mizumoto, T. Egami, H. Yamaguchi, K. Fujii, H. Konomi, E. Nagai, K. Yamaguchi, M. Tsuneyoshi, M. Tanaka.** (2006). S100P is an early developmental marker of pancreatic carcinogenesis. *Clin Cancer Res* **12**(18): 5411-6

- J. I. Park, C. J. Strock, D. W. Ball , B. D. Nelkin.** (2003). The Ras/Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway induces autocrine-paracrine growth inhibition via the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway. *Mol Cell Biol* **23**(2): 543-54
- D. M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay , P. Pisani.** (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**(2): 74-108
- J. T. Parsons, K. H. Martin, J. K. Slack, J. M. Taylor , S. A. Weed.** (2000). Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* **19**(49): 5606-13
- B. Passlick, W. Sienel, R. Seen-Hibler, W. Wockel, O. Thetter, W. Mutschler , K. Pantel.** (2000). Overexpression of matrix metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early-stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **6**(10): 3944-8
- L. Pazzaglia, F. Ponticelli, G. Magagnoli, G. Gamberi, P. Ragazzini, A. Balladelli, P. Picci , M. Benassi.** (2004). Activation of metalloproteinases-2 and -9 by interleukin-1alpha in S100A4-positive liposarcoma cell line: correlation with cell invasiveness. *Anticancer Res* **24**(2B): 967-72
- A. Pierce, N. Barron, R. Linehan, E. Ryan, L. O'Driscoll, C. Daly , M. Clynes.** (2008). Identification of a novel, functional role for S100A13 in invasive lung cancer cell lines. *Eur J Cancer* **44**(1): 151-9
- J. W. Pollard.** (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* **4**(1): 71-8
- A. Rammes, J. Roth, M. Goebeler, M. Klempt, M. Hartmann , C. Sorg.** (1997). Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem* **272**(14): 9496-502
- I. Rehman, S. S. Cross, J. W. Catto, A. Leiblich, A. Mukherjee, A. R. Azzouzi, H. Y. Leung , F. C. Hamdy.** (2005). Promoter hyper-methylation of calcium binding proteins S100A6 and S100A2 in human prostate cancer. *Prostate* **65**(4): 322-30
- A. J. Ridley , A. Hall.** (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**(3): 389-99
- A. Risch , C. Plass.** (2008). Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer* **123**(1): 1-7
- J. Rosai , L. V. Ackerman.** (1979). The pathology of tumors, part III: grading, staging & classification. *CA Cancer J Clin* **29**(2): 66-77
- C. Rosty, T. Ueki, P. Argani, M. Jansen, C. J. Yeo, J. L. Cameron, R. H. Hruban , M. Goggins.** (2002). Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation. *Am J Pathol* **160**(1): 45-50
- J. Roth, T. Vogl, C. Sorg , C. Sunderkotter.** (2003). Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol* **24**(4): 155-8

- C. Ryckman, K. Vandal, P. Rouleau, M. Talbot , P. A. Tessier.** (2003). Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* **170**(6): 3233-42
- I. Salama, P. S. Malone, F. Mihaimeed , J. L. Jones.** (2007). A review of the S100 proteins in cancer. *Eur J Surg Oncol*
- M. Saleem, M. H. Kweon, J. J. Johnson, V. M. Adhami, I. Elcheva, N. Khan, B. Bin Hafeez, K. M. Bhat, S. Sarfaraz, S. Reagan-Shaw, V. S. Spiegelman, V. Setaluri , H. Mukhtar.** (2006). S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(40): 14825-30
- L. Santamaria-Kisiel, A. C. Rintala-Dempsey , G. S. Shaw.** (2006). Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J* **396**(2): 201-14
- M. Sato, D. S. Shames, A. F. Gazdar , J. D. Minna.** (2007). A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Oncol* **2**(4): 327-43
- N. Sato, A. Maitra, N. Fukushima, N. T. van Heek, H. Matsubayashi, C. A. Iacobuzio-Donahue, C. Rosty , M. Goggins.** (2003). Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* **63**(14): 4158-66
- N. Sato, N. Fukushima, H. Matsubayashi , M. Goggins.** (2004). Identification of maspin and S100P as novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling. *Oncogene* **23**(8): 1531-8
- O. Sbai, L. Ferhat, A. Bernard, Y. Gueye, A. Ould-Yahoui, S. Thiolloy, E. Charrat, G. Charton, E. Tremblay, J. J. Risso, J. P. Chauvin, J. P. Arsanto, S. Rivera , M. Khrestchatisky.** (2008). Vesicular trafficking and secretion of matrix metalloproteinases-2, -9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* **39**(4): 549-68
- B. W. Schafer, R. Wicki, D. Engelkamp, M. G. Mattei , C. W. Heizmann.** (1995). Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* **25**(3): 638-43
- J. H. Schiller.** (2001). Current standards of care in small-cell and non-small-cell lung cancer. *Oncology* **61 Suppl 1**(3-13)
- O. Schmalhofer, S. Brabletz , T. Brabletz.** (2009). E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* **28**(1-2): 151-66
- A. M. Schmidt, S. D. Yan, S. F. Yan , D. M. Stern.** (2000). The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta* **1498**(2-3): 99-111
- V. Serru, P. Dessen, C. Boucheix , E. Rubinstein.** (2000). Sequence and expression of seven new tetraspans. *Biochim Biophys Acta* **1478**(1): 159-63

- Y. Shi, M. Zou, K. Collison, E. Y. Baitei, Z. Al-Makhalafi, N. R. Farid , F. A. Al-Mohanna.** (2006). Ribonucleic acid interference targeting S100A4 (Mts1) suppresses tumor growth and metastasis of anaplastic thyroid carcinoma in a mouse model. *J Clin Endocrinol Metab* **91**(6): 2373-9
- T. Shibata, T. Imaizumi, W. Tamo, T. Matsumiya, M. Kumagai, X. F. Cui, H. Yoshida, S. Takaya, I. Fukuda , K. Satoh.** (2002). Proteasome inhibitor MG-132 enhances the expression of interleukin-6 in human umbilical vein endothelial cells: Involvement of MAP/ERK kinase. *Immunol Cell Biol* **80**(3): 226-30
- A. Sica , V. Bronte.** (2007). Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* **117**(5): 1155-66
- Z. H. Siddik.** (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**(47): 7265-79
- C. Simon, M. Simon , H. P. Zenner.** (2001). [Mechanisms of invasiveness of cancers of the head and neck region]. *Hno* **49**(11): 902-9
- E. Y. So, J. Oh, J. Y. Jang, J. H. Kim , C. E. Lee.** (2007). Ras/Erk pathway positively regulates Jak1/STAT6 activity and IL-4 gene expression in Jurkat T cells. *Mol Immunol* **44**(13): 3416-26
- L. Song, J. Turkson, J. G. Karras, R. Jove , E. B. Haura.** (2003). Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells. *Oncogene* **22**(27): 4150-65
- C. Sorg.** (1992). The calcium binding proteins MRP8 and MRP14 in acute and chronic inflammation. *Behring Inst Mitt* **91**: 126-37
- D. Stern, S. D. Yan, S. F. Yan , A. M. Schmidt.** (2002). Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Adv Drug Deliv Rev* **54**(12): 1615-25
- S. Sun, X. Ning, J. Liu, L. Liu, Y. Chen, S. Han, Y. Zhang, J. Liang, K. Wu , D. Fan.** (2007). Overexpressed CacyBP/SIP leads to the suppression of growth in renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* **356**(4): 864-71
- P. Surowiak, A. Maciejczyk, V. Materna, M. Drag-Zalesinska, A. Wojnar, M. Pudelko, W. Kedzia, M. Spaczynski, M. Dietel, M. Zabel , H. Lage.** (2007). Unfavourable prognostic significance of S100P expression in ovarian cancers. *Histopathology* **51**(1): 125-8
- A. Taguchi, D. C. Blood, G. del Toro, A. Canet, D. C. Lee, W. Qu, N. Tanji, Y. Lu, E. Lalla, C. Fu, M. A. Hofmann, T. Kislinger, M. Ingram, A. Lu, H. Tanaka, O. Hori, S. Ogawa, D. M. Stern , A. M. Schmidt.** (2000). Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* **405**(6784): 354-60
- F. Takahashi-Yanaga , T. Sasaguri.** (2007). The Wnt/beta-catenin signaling pathway as a target in drug discovery. *J Pharmacol Sci* **104**(4): 293-302

- K. Takenaga, H. Nakanishi, K. Wada, M. Suzuki, O. Matsuzaki, A. Matsuura, H. Endo.** (1997). Increased expression of S100A4, a metastasis-associated gene, in human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* **3**(12 Pt 1): 2309-16
- M. Tan, C. W. Heizmann, K. Guan, B. W. Schafer, Y. Sun.** (1999). Transcriptional activation of the human S100A2 promoter by wild-type p53. *FEBS Lett* **445**(2-3): 265-8
- T. Teratani, T. Watanabe, F. Kuwahara, H. Kumagai, S. Kobayashi, U. Aoki, A. Ishikawa, K. Arai, R. Nozawa.** (2002). Induced transcriptional expression of calcium-binding protein S100A1 and S100A10 genes in human renal cell carcinoma. *Cancer Lett* **175**(1): 71-7
- W. C. Tsai, S. T. Tsai, Y. T. Jin, L. W. Wu.** (2006). Cyclooxygenase-2 is involved in S100A2-mediated tumor suppression in squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Res* **4**(8): 539-47
- S. Van Cruchten, W. Van Den Broeck.** (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* **31**(4): 214-23
- K. H. Vousden.** (2002). Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta* **1602**(1): 47-59
- K. H. Vousden, X. Lu.** (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**(8): 594-604
- K. H. Vousden, D. P. Lane.** (2007). p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(4): 275-83
- G. Wang, S. Zhang, D. G. Fernig, D. Spiller, M. Martin-Fernandez, H. Zhang, Y. Ding, Z. Rao, P. S. Rudland, R. Barraclough.** (2004). Heterodimeric interaction and interfaces of S100A1 and S100P. *Biochem J* **382**(Pt 1): 375-83
- G. Wang, A. Platt-Higgins, J. Carroll, S. de Silva Rudland, J. Winstanley, R. Barraclough, P. S. Rudland.** (2006). Induction of metastasis by S100P in a rat mammary model and its association with poor survival of breast cancer patients. *Cancer Res* **66**(2): 1199-207
- H. Wang, Z. Zhang, R. Li, K. K. Ang, H. Zhang, N. P. Caraway, R. L. Katz, F. Jiang.** (2005a). Overexpression of S100A2 protein as a prognostic marker for patients with stage I non small cell lung cancer. *Int J Cancer* **116**(2): 285-90
- Q. Wang, M. Williamson, S. Bott, N. Brookman-Amisshah, A. Freeman, J. Nariculam, M. J. Hubank, A. Ahmed, J. R. Masters.** (2007). Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. *Oncogene*
- Q. Wang, Z. He, J. Gao, S. Hu, M. Huang, M. Liu, J. Zheng, H. Tang.** (2008). S100P sensitizes ovarian cancer cells to carboplatin and paclitaxel in vitro. *Cancer Lett* **272**(2): 277-84

- W. Wang, S. Goswami, E. Sahai, J. B. Wyckoff, J. E. Segall, J. S. Condeelis.** (2005b). Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. *Trends Cell Biol* **15**(3): 138-45
- X. Wang, J. L. Martindale, N. J. Holbrook.** (2000). Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* **275**(50): 39435-43
- Y. Watanabe.** (2003). TNM classification for lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* **9**(6): 343-50
- Q. Wei, Y. Zhao, Z. Q. Yang, Q. Z. Dong, X. J. Dong, Y. Han, C. Zhao, E. H. Wang.** (2008). Dishevelled family proteins are expressed in non-small cell lung cancer and function differentially on tumor progression. *Lung Cancer* **62**(2): 181-92
- H. J. Whiteman, M. E. Weeks, S. E. Downen, S. Barry, J. F. Timms, N. R. Lemoine, T. Crnogorac-Jurcevic.** (2007). The role of S100P in the invasion of pancreatic cancer cells is mediated through cytoskeletal changes and regulation of cathepsin D. *Cancer Res* **67**(18): 8633-42
- R. Wicki, C. Franz, F. A. Scholl, C. W. Heizmann, B. W. Schafer.** (1997). Repression of the candidate tumor suppressor gene S100A2 in breast cancer is mediated by site-specific hypermethylation. *Cell Calcium* **22**(4): 243-54
- T. Wiethege, K. Junker, G. Johnen, M. Krismann, K. M. Muller.** (2000). [Pathology and molecular biology of lung cancer]. *Pathologie* **21**(6): 404-23
- J. J. Xie, L. Y. Xu, Y. M. Xie, H. H. Zhang, W. J. Cai, F. Zhou, Z. Y. Shen, E. M. Li.** (2008). Roles of ezrin in the growth and invasiveness of esophageal squamous carcinoma cells. *Int J Cancer*
- R. R. Yammani, C. S. Carlson, A. R. Bresnick, R. F. Loeser.** (2006). Increase in production of matrix metalloproteinase 13 by human articular chondrocytes due to stimulation with S100A4: Role of the receptor for advanced glycation end products. *Arthritis Rheum* **54**(9): 2901-11
- S. Yano, H. Shinohara, R. S. Herbst, H. Kuniyasu, C. D. Bucana, L. M. Ellis, D. W. Davis, D. J. McConkey, I. J. Fidler.** (2000). Expression of vascular endothelial growth factor is necessary but not sufficient for production and growth of brain metastasis. *Cancer Res* **60**(17): 4959-67
- S. Yano, Y. Nishioka, H. Goto, S. Sone.** (2003). Molecular mechanisms of angiogenesis in non-small cell lung cancer, and therapeutics targeting related molecules. *Cancer Sci* **94**(6): 479-85
- S. Yano, Y. Matsumori, K. Ikuta, H. Ogino, T. Doljinsuren, S. Sone.** (2006). Current status and perspective of angiogenesis and antivascular therapeutic strategy: non-small cell lung cancer. *Int J Clin Oncol* **11**(2): 73-81

- P. R. Young, M. M. McLaughlin, S. Kumar, S. Kassis, M. L. Doyle, D. McNulty, T. F. Gallagher, S. Fisher, P. C. McDonnell, S. A. Carr, M. J. Huddleston, G. Seibel, T. G. Porter, G. P. Livi, J. L. Adams, J. C. Lee.** (1997). Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J Biol Chem* **272**(18): 12116-21
- B. Z. Yuan, A. M. Jefferson, K. T. Baldwin, S. S. Thorgeirsson, N. C. Popescu, S. H. Reynolds.** (2004). DLC-1 operates as a tumor suppressor gene in human non-small cell lung carcinomas. *Oncogene* **23**(7): 1405-11
- B. Z. Yuan, J. A. Chapman, S. H. Reynolds.** (2008). Proteasome Inhibitor MG132 Induces Apoptosis and Inhibits Invasion of Human Malignant Pleural Mesothelioma Cells. *Transl Oncol* **1**(3): 129-40
- E. Zamir, B. Geiger.** (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **114**(Pt 20): 3583-90
- H. Zhang, Y. Teng, Y. Kong, P. E. Kowalski, S. N. Cohen.** (2008). Suppression of human tumor cell proliferation by Smurf2-induced senescence. *J Cell Physiol* **215**(3): 613-20
- L. Zhong, J. Roybal, R. Chaerkady, W. Zhang, K. Choi, C. A. Alvarez, H. Tran, C. J. Creighton, S. Yan, R. M. Strieter, A. Pandey, J. M. Kurie.** (2008). Identification of secreted proteins that mediate cell-cell interactions in an in vitro model of the lung cancer microenvironment. *Cancer Res* **68**(17): 7237-45
- D. B. Zimmer, E. H. Cornwall, A. Landar, W. Song.** (1995). The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* **37**(4): 417-29

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Mit der vorliegenden Arbeit bewerbe ich mich erstmalig um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle, den 02.10.2009

.....
Grit Rehbein

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Simm danke ich im Besonderen für die Überlassung des interessanten Themas, für die wissenschaftliche Unterstützung, sowie für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Bei Frau Dr. Bartling möchte ich mich für die praktische Betreuung der Arbeit, für die ständig gewährte Diskussionsbereitschaft und für das Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken.

Frau Prof. Breunig möchte ich für die Bereitschaft und Unterstützung, meine Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät verteidigen zu können, danken.

Bei Herrn Dr. Schmitt vom Institut für Pathologie bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Immunhistochemie.

Für das erfrischende Arbeitsklima, die fachlichen Anregungen und die konstruktiven Vorschläge bedanke ich mich herzlich bei den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe. Besonders möchte ich mich bei Norbert dafür bedanken, immer eine Lösung für die kleineren oder größeren Technischen Probleme gehabt zu haben. Und bei Alex, vielen Dank für die Geduld beim Sortieren meiner grünen Zellen.

Den gesamten Mitarbeitern des HTC-Labors danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und den Zusammenhalt auch in schwierigen Situationen. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Steffi, Simone, Sabine, Corinna und Ireen, die immer ein offenes Ohr hatten und mit denen ich auch die zähen Phasen meiner Doktorarbeit überstanden habe.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meinen Freunden und meiner Familie, auf deren Unterstützung ich auch in den letzten Jahren immer zählen konnte. Vielen Dank für Eure Geduld und Euer Verständnis!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Rehbein, Grit
Geburtsdaten: 10.03.1980 in Zeitz

Schulbildung

08/1986 - 07/1991 Lenin-Oberschule (11. POS in Zeitz)
08/1991 - 07/1998 Otto-Baensch-Gymnasium in Zeitz
07/1998 Abitur (Note: 1,8)

Studium

10/1998 - 01/2004 Biologiestudium an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Studienschwerpunkte: Mikrobiologie, Genetik, Biochemie,
Immunologie
01/2004 Diplom (Note: 1,9)
Diplomthema: Charakterisierung neuer Transporter der RND-
Familie von *Ralstonia metallidurans* CH34
03/2004 - 03/2009 Promotionsarbeit im Forschungslabor der Herz-Thorax-
Chirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Promotionsthema: Einfluss von S100P auf die Initiation und
Progression des bronchialen Adenokarzinoms
seit 07/2009 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Forschungslabor der Klinik
für Innere Medizin 1

Publikationen

G. Rehbein, A. Simm, H. S. Hofmann, R. E. Silber, B. Bartling. (2008). Molecular regulation of S100P in human lung adenocarcinomas. *Int J Mol Med* **22**: 69-77

B. Bartling, **G. Rehbein**, W. D. Schmitt, H. S. Hofmann, R. E. Silber, A. Simm. (2007). S100A2-S100P expression profile and diagnosis of non-small cell lung carcinoma: Impairment by advanced tumour stages and neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer*

B. Bartling, **G. Rehbein**, R. E. Silber, A. Simm. (2006). Senescent fibroblasts induce moderate stress in lung epithelial cells in vitro. *Exp Gerontol* **41**: 532-539

D. H. Nies, **G. Rehbein**, T. Hoffmann, C. Baumann, C. Grosse. (2006). Paralogs of genes encoding metal resistance proteins in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *J Mol Microbiol Biotechnol* **11**: 82-93

Halle, den 02.10.2009

Grit Rehbein