

Aus dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln
Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Büttner

**Untersuchungen zur Expression von miRNA-200a in Abhängigkeit zur LSD1-
Expression im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom *in vitro* und *in vivo***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Rebecca Richter
aus Siegen

promoviert am
23.06.2022

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Professorin Dr. rer. nat. M. Odenthal

2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. R. Thomas

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials wurde ich von Iris Macheleidt, Institut für Pathologie der Universität zu Köln unterstützt.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 24/2011) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichtete mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, 06.12.2019

Unterschrift: 

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind mit Unterstützung von Iris Macheleidt und den technischen Assistentinnen Frau Hannah Eischeid und Frau Ulrike Koitzsch von mir selbst durchgeführt worden.

Die histopathologische Charakterisierung der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome wurde von Herrn PD Dr. Stephan Schäfer durchgeführt.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Margarete Odenthal aus dem Institut für Pathologie der Universität zu Köln für die Ermöglichung und Förderung meiner Promotion. Für ihre hervorragende Betreuung während meiner Arbeiten am Institut, ihre wertvolle Kritik und ihre stetige Hilfsbereitschaft bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich sehr herzlich bei ihr bedanken.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Iris Macheleidt, Institut für Pathologie der Universität zu Köln für ihre engagierte Betreuung meiner Experimente und der Arbeiten an meiner Dissertation bedanken. Sie war für mich stets eine kompetente und hilfsbereite Ansprechpartnerin und stand mir bei allen Hürden, die es zu überwinden galt, tatkräftig zur Seite.

Ein besonderer Dank gilt auch den technischen Assistentinnen Hannah Eischeid und Ulrike Koitzsch sowie der gesamten „AG Odenthal“, die mich sehr herzlich in ihr Team aufgenommen haben und mir bei allen aufkommenden Fragen während meiner Arbeiten im Labor stets eine große Hilfe waren.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mir während meiner gesamten Ausbildungszeit durch ihre stetige Unterstützung viel Kraft und Zuversicht gegeben haben, meinen Freundinnen Christiane Eilinghoff und Henrike Middendorf sowie meinen Freunden Conny Keil und Christoph Stommel für ihre grenzenlose Freundschaft und ihr uneingeschränktes Verständnis. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen sehr herzlich bedanken, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation beigetragen haben und nicht namentlich erwähnt wurden.

Inhaltsverzeichnis

Köln, 06.12.2019 Unterschrift:	- 2 -
Abkürzungsverzeichnis.....	- 8 -
1. Einleitung.....	- 12 -
1.1 Das Lungenkarzinom	- 12 -
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	- 12 -
1.1.2 Klinik und Diagnostik	- 13 -
1.1.2.1 Klinik:	- 13 -
1.1.2.2 Diagnostik:	- 14 -
1.1.3 Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms.....	- 15 -
1.2 Die Bedeutung der posttranskriptionellen Regulierung im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom	- 17 -
1.2.1 Die lysin-spezifische Demethylase 1	- 17 -
1.2.2 Die Rolle von Mikro-RNA im NSCLC.....	- 18 -
1.3 Zielsetzung	- 22 -
2. Material und Methoden	- 23 -
2.1 Material.....	- 23 -
2.1.1 Software	- 23 -
2.1.2 Geräte	- 24 -
2.1.3 Kits und Assays.....	- 25 -
2.1.4 Oligonukleotide	- 26 -
2.1.5 Antikörper	- 28 -
2.1.6 Chemikalien und Reagenzien	- 28 -
2.1.7 Puffer und Lösungen	- 30 -
2.1.7.1 Puffer und Lösungen für die Extraktion von Gesamt-RNA aus FFPE-Gewebe.....	- 30 -
2.1.8 Weitere Materialien.....	- 30 -

2.1.9 Zelllinien, Versuchstiere und Patientenmaterial.....	- 31 -
2.1.9.1 Zelllinien.....	- 31 -
3.1.9.2 Versuchstiere	- 32 -
2.1.9.3 Patientenmaterial.....	- 33 -
2.2 Methoden.....	- 34 -
2.2.1 RNA-Extraktion	- 34 -
2.2.1.1 RNA-Extraktion aus Zellkultur	- 34 -
2.2.1.2 RNA-Extraktion aus Mausmodellen	- 34 -
2.2.1.3 RNA-Extraktion aus formalinfixiertem, paraffineingebettetem Patientenmaterial.....	- 34 -
Gesamt-RNA-Extraktion mit miRNA:	- 35 -
2.2.2 Quantifizierung von mRNA und miRNA	- 36 -
2.2.2.1 Polyadenylierung und reverse Transkription von Gesamt-RNA	- 36 -
2.2.2.2 Synthese und Quantifizierung von mRNA und miRNA mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR).....	- 37 -
2.2.3 Färbungen	- 38 -
2.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	- 38 -
2.2.3.2 Immunhistochemie (IHC) und Farbanalyse	- 39 -
3. Ergebnisse.....	- 40 -
3.1 Der Einfluss von LSD1 auf die Expression ausgewählter miRNA in NSCLC-Zelllinien.....	- 40 -
3.2 Der Einfluss von LSD1 auf die miRNA-Expression in einem murinen Lungenkarzinom-Modell	- 42 -
3.3 Der Einfluss der LSD1-Expression auf die Expression von miRNA-200a in menschlichen NSCLC-Proben	- 45 -
3.3.1 Zusammenstellung eines Patientenkollektivs zur Untersuchung von miRNA	- 45 -
3.3.2 LSD1 wird in menschlichen NSCLC-Proben überexprimiert.....	- 48 -

3.3.3 Die Expression von miRNA-200a und CDH1 in Abhängigkeit von der LSD1-Expression im NSCLC.....	- 53 -
4. Diskussion	- 56 -
4.1 Die LSD1-Expression wird in humanen NSCLC hochreguliert.....	- 56 -
4.2 LSD1 und sein Einfluss auf die EMT im NSCLC	- 57 -
5. Zusammenfassung.....	- 63 -
6. Abbildungsverzeichnis	- 65 -
7. Tabellenverzeichnis.....	- 66 -
8. Literaturverzeichnis	- 67 -

Abkürzungsverzeichnis

18S	Housekeeping-Gen
Abb.	Abbildung
AC	Adenokarzinom
ALK1	anaplastische Lymphomkinase 1
ANOVA	analysis of variance
AOD	Aminoxidase-Domäne
APUD	Amine Precursor Uptake and Decarboxylation
BRAF	Proto-Onkogen; kodiert B-Raf, Serin-/Threoninkinase
bzw.	beziehungsweise
Δ Ct	Messmethode
$\Delta\Delta$ Ct	Messmethode
CA	Kanada
CDH1	E-Cadherin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CoREST	corepressor for RE1-silencing transcription factor
Cre-Adtyp 5	Adenovirus 5 - Cre-Recombinase
CT	Computertomografie
Ct	Anzahl der Zellzyklen während der PCR bis zum Beginn des exponentiellen Wachstums
DE	Deutschland
DGCR8	Di George Syndrome Critical Region Gene 8
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
EML4-ALK	Fusionsgen; echinoderm microtubule associated protein like 4, anaplastic lymphoma kinase
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
et al.	et alii (und andere)
F	forward

FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FC	Fold Change
FDG	Fluorodesoxyglukose
FFPE	formalin-fixed paraffin embedded
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
H ₂ O	Wasser
H3K4me1	monomethyliertes Lysin 4 von Histon 3
H3K4me2	dimethyliertes Lysin 4 von Histon 3
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IHC	Immunhistochemie
Kb	Kilobasen
KD	Knockdown
Ki-67	Kiel 67; Markerprotein für sich teilende Zellen
KRAS	Proto-Onkogen; kodiert K-Ras Protein, Kirsten RAt Sarcoma virus, GTPase
LC	großzelliges Karzinom (large cell carcinoma)
log	Logarithmus
LSD1	lysin-spezifische Demethylase 1
Lys4	Lysin 4
Lys9	Lysin 9
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
M	Mol
MET	Proto-Onkogen; kodiert c-MET, Rezeptor-Tyrosinkinase
MET	mesenchymale-epitheliale Transition
ml	Milliliter

mM	Millimolar
mRNA	Messenger-RNA
miRNA	Mikro-RNA
miRISC	miRNA-induced silencing complex
MRT	Magnetresonanztomografie
n	Ziffer
ng	Nanogramm
NL	Niederlande
nm	Nanometer
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
NT	tumorfremie Proben
p	Signifikanzniveau
p40	platteneitheliales Markerprotein
p63	platteneitheliales Markerprotein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-1	Rezeptor für PD-L1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PET	Positronenemissionstomographie
pH	Säuregrad
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
px	Pixel
pre-miRNA	Precursor Mikro-RNA
pri-miRNA	Primary Mikro-RNA
PSA	prostataspezifisches Antigen
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
R	reverse
r ²	Korrelationskoeffizient
RB1	kodiert Retinoblastomprotein

RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RNU6	Housekeepinggen
ROS1	ROS Proto-Onkogen 1, Rezeptor-Tyrosinkinase
RU	relative unit (relative Einheit)
s.	siehe
SCLC	kleinzelliges Lungenkarzinom
SDS	Sodiumdodecylsulfat
shGFP	small hairpin RNA gegen GFP
shLSD1	small hairpin RNA gegen LSD1
Snai1	Transkriptionsfaktor 1
SqCC	Plattenepithelkarzinom (squamous cell carcinoma)
SWIRM	Swi3p/Rsc8p/Moira, LSD1-Domäne
T	Tumorproben
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta; Wachstumsfaktor
TP53	kodiert p53, einen Transkriptionsfaktor, der den Zellzyklus reguliert
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
TTF1	thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
u. a.	unter anderem
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
US	United States
WHO	World Health Organization
ZEB1	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
ZEB2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2

1. Einleitung

1.1 Das Lungenkarzinom

Das Lungenkarzinom wird histologisch in zwei Hauptklassen eingeteilt. Das kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC) ist ein hochmaligner Tumor, der von neuroendokrinen Zellen ausgeht und ist verantwortlich für etwa 15% der Lungenkarzinome [1]. Das Adenokarzinom, das Plattenepithelkarzinom, das entdifferenzierte großzellige Karzinom und andere Subtypen werden als nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC) zusammengefasst und machen etwa 85% der Lungenkarzinome aus, wobei das Adenokarzinom mit einem Anteil von etwa 55% gefolgt vom Plattenepithelkarzinom den häufigsten Subtyp darstellt (Abb. 1) [1].

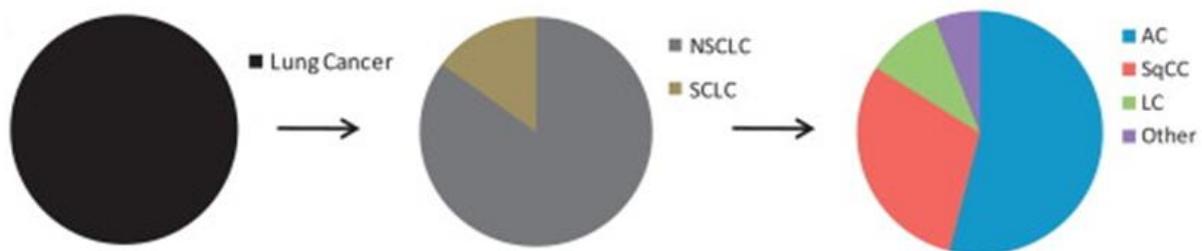


Abbildung 1: Histologische Subtypen des Lungenkarzinoms

Das Lungenkarzinom wird in zwei Hauptklassen unterteilt: SCLC und NSCLC. Das NSCLC steht für eine heterogene Gruppe von verschiedenen nichtkleinzelligen Subtypen. AC: Adenokarzinom, SqCC: Plattenepithelkarzinom, LC: großzelliges Karzinom (modifiziert nach Pikor et al. [1]).

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Lungenkarzinom weist unter den malignen Tumorerkrankungen die zweithöchste Anzahl an Neuerkrankungen auf und ist die häufigste Krebstodesursache weltweit [2]. In Deutschland stellt es mit über 45000 Todesfällen pro Jahr die vierthäufigste Todesursache und mit einem Anteil von 19,3% die häufigste Krebstodesursache dar [3, 4].

Das Lungenkarzinom ist mit verschiedenen Risikofaktoren assoziiert. Der bedeutendste Risikofaktor ist das Tabakrauchen, wobei die Neuerkrankungs- und die Sterberate deutlich von der Entwicklung des Tabakkonsums in der Bevölkerung beeinflusst werden [5]. Weitere Risikofaktoren sind das Passivrauchen [6], die umweltbedingte Belastung beispielsweise mit Radon und seinen Zerfallsprodukten [7], Dieselabgasen [8] und anderen Feinstäuben [9] sowie Belastungen durch Karzinogene

wie Arsen, Chrom, Nickel [10] oder Asbest [11]. Auch eine familiäre Disposition [12], bestimmte Ernährungsgewohnheiten, so zum Beispiel ein hoher Konsum von gebratenem, rotem Fleisch [13] oder Alkohol [14], das Vorliegen von Lungennarben durch Lungentuberkulose [15] oder humane Papillomviren [16] stellen weitere Risikofaktoren dar. Trotz verbesserter Diagnostik und neuer Therapieverfahren liegt die relative 5-Jahresüberlebensrate bei nur 18% [17].

1.1.2 Klinik und Diagnostik

Etwa 90% der Patientinnen und Patienten mit Lungenkarzinom weisen bei der Diagnosestellung Symptome auf [18]. Diese treten oft erst spät in Erscheinung, weshalb das Lungenkarzinom häufig in bereits fortgeschrittenen Tumorstadien diagnostiziert wird [19]. In 22% der Fälle ist das Lungenkarzinom bei der Diagnosestellung regional metastasiert und in 57% der Fälle fernmetastasiert [17]. Die erste Vorstellung der Betroffenen in der Hausarztpraxis und auch die Überweisung in die Facharztpraxen erfolgen erst spät, sodass die Diagnosestellung häufig erst nach mehrmonatiger Verzögerung erfolgt [20].

1.1.2.1 Klinik:

Die Symptomatik des Lungenkarzinoms ist vielfältig. Initial zeigen sich besonders häufig chronischer Husten und Atembeschwerden [21]. Brust- und Schulterschmerzen sowie das Aushusten von blutigem Bronchialsekret werden ebenfalls häufig beobachtet [21]. Weiterhin können verdrängungsbedingte Beschwerden wie eine obere Einflusstauung, Schluckstörungen oder Atemnebengeräusche auftreten [22]. Je nach Ausbreitung des Tumors können Heiserkeit als Zeichen einer Infiltration des Nervus laryngeus recurrens, das Horner-Syndrom bei Befall des Ganglion stellatum sowie eine Läsion des Plexus brachialis auftreten [23]. Desweiteren können Lungenkarzinome von paraneoplastischen Syndromen begleitet sein. Diese können u.a. endokriner, hämatologischer, neurologischer und dermatologischer Natur sein [24]. Bei chronischem Sauerstoffmangel können sich Uhrglasnägel und Trommelschlägelfinger entwickeln [23]. Vor allem bei Fernmetastasierung treten systemische Symptome wie Gewichtsverlust bis hin zur generalisierten Auszehrung mit Funktionsverlust von Organen, Fieber und Abgeschlagenheit in Erscheinung [25]. Bei Knochenbefall können Knochenschmerzen und Frakturen vorkommen [23].

Das Lungenkarzinom metastasiert besonders häufig in Respirationstrakt, Lymphknoten, Nervensystem und Skelett sowie Leber, Nebennieren und Haut [26, 27].

1.1.2.2 Diagnostik:

Der initiale Verdacht auf ein Lungenkarzinom ergibt sich aus dem entsprechenden klinischen Erscheinungsbild und einem auffälligen Befund in der röntgenologischen Thoraxübersichtaufnahme in zwei Ebenen [28]. Zur weiterführenden Diagnostik und zum Staging stehen als bildgebende Verfahren die kontrastmittelverstärkte Computertomografie (CT) von Thorax und Abdomen sowie die Magnetresonanztomografie (MRT) und die Sonografie zur Verfügung [28]. Als nuklearmedizinisches Verfahren bietet sich die Positronenemissionstomographie (PET) mit Fluor-18-Fluorodesoxyglukose (FDG) an [28]. Die Sicherung der Diagnose erfolgt bioptisch, wobei die Bronchoskopie das wichtigste Verfahren der Biopsiegewinnung darstellt [28].

Das Staging dient der Einschätzung der Prognose, der Erstellung eines individuellen Behandlungsplans sowie der Evaluation des Behandlungserfolgs und stellt somit einen wichtigen Schritt in der Tumordiagnostik dar [29]. Hierfür wird die TNM-Klassifikation verwendet, wobei Kategorie T die Größe des Primärtumors beschreibt, N den Befall regionärer Lymphknoten und M das Vorliegen von Fernmetastasen. Durch das Beifügen von Ziffern wird die Ausbreitung des Tumors angezeigt [29]. Die so ermittelte Kombination aus T, N und M wird dann in die entsprechenden Tumorstadien übertragen [30].

Zudem existiert ein Gradingssystem für Adenokarzinome, welches den Tumor nach fünf histologischen Subtypen in drei Klassen einteilt, die ebenfalls mit der Prognose korrelieren [31]. Demnach werden prädominant lepidische (nichtmuzinöse) Adenokarzinome (G1) mit einer guten, prädominant azinäre und papilläre Adenokarzinome (G2) mit einer mittleren und prädominant solide oder mikropapilläre Adenokarzinome (G3) mit einer schlechten Prognose assoziiert [31]. Ebenso können Plattenepithelkarzinome in einem dreistufigen Gradingssystem klassifiziert werden [31]. Bei anderen Lungenkarzinomen wird kein gesondertes Grading angegeben, da sich der Differenzierungsgrad direkt aus der histologischen Typisierung ergibt [31]. Die histopathologische Diagnostik erfolgt entsprechend der WHO-Klassifikation in differenzierte und undifferenzierte Karzinome [28, 32]. Die Subtypen des NSCLC sind vielfältig, sodass hier zur Identifikation und Differenzierung immunhistochemische

Untersuchungen notwendig werden können. Bei der Diagnostik von Adenokarzinomen können die Marker TTF1 oder Napsin-A verwendet werden [32]. P40, Zytokeratin 5/6 und P63 sind spezifische Markerproteine für Plattenepithelkarzinome [32].

Lungenkarzinome entstehen auf der Basis genetischer Aberrationen, die wichtige zelluläre Signalwege verändern und mittels Next-Generation-Sequencing detektiert werden können. Das SCLC weist besonders häufig Veränderungen der Tumorsuppressorgene RB1 und TP53 auf [33-35]. Im Lungenadenokarzinom finden sich besonders häufig Mutationen im KRAS-Gen und im Plattenepithelkarzinom MET-Amplifikationen [36]. Weitere von Mutationen betroffene Gene im NSCLC sind vor allem EGFR, BRAF und PIK3CA [36]. Weiterhin findet man im NSCLC eine EML4-ALK-Fusion [37].

Obwohl Klinik und Bildgebung bereits Rückschlüsse auf die Art des Lungenkarzinoms zulassen können, ist die histologische Untersuchung einer Tumorgewebeprobe für die Diagnostik, die Prognose und eine individuelle Therapieplanung unabdingbar. Dabei ist die Unterscheidung zwischen SCLC und NSCLC von besonderer Bedeutung, da sie sich hinsichtlich ihrer Therapie maßgeblich voneinander unterscheiden.

1.1.3 Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms

Die Therapie des NSCLC ist vielfältig und richtet sich in erster Linie nach der Stadieneinteilung und der Lokalisation des zu behandelnden Tumors. Außerdem fließen weitere Kriterien wie Komorbiditäten, körperliche Leistungsfähigkeit, Alter, kardiopulmonale Reserve und der sich daraus ergebende Allgemeinzustand des Patienten in die Therapieentscheidung mit ein [28, 29].

Die Tumorresektion bei offener Thorakotomie oder videoassistierter Thorakoskopie stellt die Therapie der Wahl bei einem kurativen Therapieansatz dar. So kann der Tumor je nach Größe mittels Keilresektion, Lobektomie, Manschettenresektion oder Pneumektomie entfernt werden. Standardmäßig erfolgt dabei die systematische Resektion aller interlobären, hilären und mediastinalen Lymphknoten [28].

Die Kombinationschemotherapie ist ab dem Stadium II eine mögliche Therapieoption und wird neoadjuvant zur präoperativen Tumorreduktion, adjuvant zur Therapie von Mikrometastasen und zur Senkung der Rezidivrate oder definitiv als kombinierte Radiochemotherapie ab dem Stadium IIIA₃ bzw. bei funktioneller oder technischer Inoperabilität durchgeführt [28, 29]. Die alleinige Strahlentherapie steht ab UICC-

Stadium III als Therapieoption in inoperablen Stadien und adjuvant nach Operation oder Chemotherapie zur Verfügung [29].

Ab Stadium IV können bei Vorliegen von Treibermutationen sogenannte *Targeted Therapies* eingesetzt werden [28]. Hierbei werden vor allem Medikamente verwendet, die EGFR- [38-40] und BRAF-Mutationen [41] oder ALK- [42] und ROS-Translokationen [41] inhibieren. Liegen keine therapierbaren Mutationen vor, stehen bei immunhistochemisch nachgewiesener PD-L1-Expression gegen PD-1 oder PD-L1 gerichtete monoklonale Antikörper zur Verfügung [43]. Obwohl diese Therapieoptionen initial gut wirksam sind, liegt die Dauer bis zur Entwicklung von Resistenzmechanismen, z.B. nach einer Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren bei EGFR-Mutationen, bei etwa einem Jahr [44].

Als nicht-heilbar gelten Lungenkarzinome im bereits metastasierendem Stadium oder inoperable Rezidive [28]. Liegen nicht-heilbare Tumorstadien vor, sollen frühzeitig palliativmedizinische Therapiekonzepte zur Verbesserung der Lebensqualität durch Vorbeugung und Linderung von körperlichen Beschwerden unter Berücksichtigung physischer, psychosozialer, und spiritueller Bedürfnisse angesetzt werden [28]. Zur Anwendung kommen dabei sowohl medikamentöse und interventionelle Therapien als auch die Gesprächsführung mit Patienten und Angehörigen [28].

Obwohl die spezifischen Therapiemöglichkeiten des NSCLC vielfältig sind, profitieren nicht alle Patienten von einer solchen personalisierten Therapie. In den meisten Fällen von NSCLC ist eine Treibermutation bekannt. Dennoch gibt es Treibermutationen wie KRAS, die bislang nicht spezifisch therapiert werden können [45]. Resistenzmechanismen führen zu Nichtansprechen oder zu verminderter Sensitivität gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren und es kommt zu Tumorprogress oder Rezidiven [45]. Andere Fälle zeigen in den gängigen Mutationsgenen den Wildtyp und die Treibermutation ist noch unbekannt. Häufig wird die Diagnose des NSCLC in späten, metastasierenden Stadien gestellt und so bleibt die Mortalität trotz verbesserter Diagnostik und neuer Therapieverfahren nach wie vor hoch und die Prognose schlecht [46]. Die Entwicklung neuer Therapiestrategien ist daher von großer Bedeutung und die posttranskriptionelle Regulierung bietet dafür mögliche Therapiansätze.

1.2 Die Bedeutung der posttranskriptionellen Regulierung im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom

Die Genexpression kann auf mehreren Ebenen reguliert werden. Durch verschiedene Mechanismen werden die Transkription eines Gens, die Prozessierung der Messenger-RNA (mRNA) und deren Translation beeinflusst. Zum Beispiel bewirkt die Demethylierung von mono- und dimethyliertem Lysin Lys4 und Lys9 an Histon 3 durch die lysin-spezifische Demethylase 1 (LSD1) eine Aktivierung oder eine Repression der Transkription seiner Zielgene [47, 48].

Auch kleine, nicht-kodierende RNA, sogenannte Mikro-RNA (miRNA), beeinflussen die Genexpression, indem sie gebunden in Komplexen an die Zielstrukturen ihrer mRNA binden [49].

1.2.1 Die lysin-spezifische Demethylase 1

Die lysin-spezifische Demethylase 1 (LSD1) ist eine flavinabhängige Lysindemethylase, die 2004 von Shi et al. erstmals beschrieben wurde [48]. Das chromatinassoziierte LSD1-Protein besteht aus 852 Aminosäuren, die sich zu drei Hauptdomänen zusammenschließen (Abb. 2A und B): Die SWIRM- und Aminoxidase-Domäne (AOD) bilden die Kernstruktur von LSD1, die das katalytische Zentrum enthält [50, 51]. In der AOD eingebettet liegt die Tower-Domäne, die über Bindungsstellen für mit LSD1 im Komplex interagierende Proteine verfügt [50]. Gebunden in einem Transkriptionskomplex mit beispielsweise dem Cofaktor CoREST bindet LSD1 an H3K4me1 und H3K4me2 und die Demethylierung bewirkt die Repression der Transkription des Zielgens [48]. Im Komplex mit beispielsweise dem Androgenrezeptor bindet LSD1 an H3K9me1 und H3K9me2 und die Demethylierung führt zur Aktivierung der Transkription [47].



Abbildung 2: Aufbau und Funktion von LSD1

(A) Schematischer Aufbau des LSD1-Proteins. (B) Funktionen der drei Domänen von LSD1. (modifiziert nach Ambrosio et al. [51]).

Neben Histonproteinen gelten noch andere Proteine als Zieldomänen der LSD1-medierten Demethylierung. Hier reguliert LSD1 über die Lysindemethylierung die Proteinstabilität oder die Protein-Protein-Interaktion und nimmt damit wichtigen Einfluss auf die Regulierung des Zellzyklus und der Signaltransduktion [52-55].

LSD1 wird in verschiedenen menschlichen Krebsarten, wie zum Beispiel im Neuroblastom [56], Prostata- [47, 57], Mamma- [58] und Blasenkarzinom [59] hochreguliert. Auch im NSCLC besteht eine Korrelation zwischen der Expression von LSD1 und der Proliferation, der Metastasierung und dem Überleben [60, 61]. Aus diesem Grund werden LSD1-Inhibitoren im NSCLC in präklinischen und klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit getestet [62, 63].

In Krebszellen kommt es zu Veränderungen der Histonmethylierung, wobei insbesondere der H3K4me2-Level prognostischen Wert bezüglich der Rezidivbildung und des Outcomes besitzt [64, 65]. Daneben konnte gezeigt werden, dass hohe LSD1-Level mit abweichenden Mustern der Histonmethylierung assoziiert sind [66].

1.2.2 Die Rolle von Mikro-RNA im NSCLC

Mikro-RNA (miRNA) sind kleine, aus etwa 22 Nukleotiden bestehende, nichtkodierende RNA, die auf posttranskriptioneller Ebene die Expression proteincodierender Gene regulieren [67]. Es sind über 2500 miRNA im menschlichen Genom beschrieben worden, die etwa 30% der Gene regulieren [67-69].

Die RNA-Polymerase II synthetisiert ein etwa 60-100 Nukleotide umfassendes Primärtranskript, die Primary-miRNA (pri-miRNA) [70]. Diese wird durch die nukleäre RNA-se III, die Endonuklease Drosha, im Komplex mit ihrem Cofaktor, dem Di George

Syndrome Critical Region Gene 8 (DGCR8), in die ca. 70-80 Nukleotide umfassende Precursor-miRNA (pre-miRNA) gespalten, welche anschließend ins Zytoplasma transportiert wird [70, 71]. Hier wird die pre-miRNA durch die RNase III Dicer in ein 21-24 Nukleotide umfassendes, doppelsträngiges Transkript gespalten, das aus der noch unreifen miRNA und ihrem Komplementärstrang miRNA* besteht [72]. Während der miRNA*-Strang abgebaut wird, wird die nun reife miRNA mithilfe des Argonautproteins unmittelbar in den miRNA-induced silencing complex (miRISC) eingebunden, mit dem sie nun an die Ziel-mRNA binden kann [49, 71]. Mit wenigen Ausnahmen ist die Bindungsstelle der mRNA für miRNA in mehreren Kopien an ihrem 3'-Ende lokalisiert [73]. Meist führt die Bindung der miRNA zur Hemmung der Translation der Ziel-mRNA und nicht zur kompletten Degradation der mRNA [73]. Auch LSD1 gilt als Ziel verschiedener miRNA, die über dessen Herunterregulation als Tumorsuppressoren wirken [74-77].

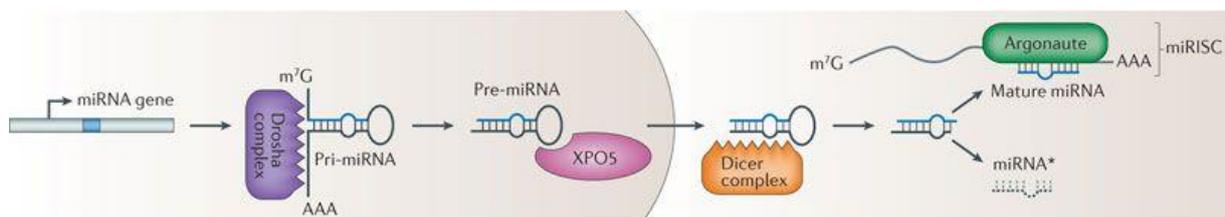


Abbildung 3: Mechanismus der miRNA-Biogenese

Bei der Transkription eines miRNA-Gens wird zunächst die pri-miRNA synthetisiert. Diese wird durch den Drosha-Komplex prozessiert und es entsteht die pre-miRNA, welche durch den Exportin-5-Komplex ins Zytoplasma geschleust wird. Durch den Dicer-Komplex wird die pre-miRNA in ein doppelsträngiges Transkript überführt, wobei ein Strang die miRNA repräsentiert und der andere ihren Komplementärstrang miRNA*. Die reife miRNA bildet mit einem Argonautprotein den miRISC [49].
Springer Nature Lizenz: 537364006216

Häufig zeigen miRNA in malignen Tumoren abweichende Expressionsmuster. Sowohl die Überexpression als auch die Herunterregulation bestimmter miRNA nehmen Einfluss auf die Proliferation, Invasion und Migration von Tumorzellen und sind assoziiert mit Tumorwachstum und Metastasierung [78-81].

miRNA-200a kommt dabei eine besondere Rolle zu. Als wichtiger Regulator bei der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) gilt sie als Tumorsuppressor und wird in Tumorzellen herunter reguliert [82-84]. Die EMT ist der initiale Schritt von Invasion und Metastasierung von Tumorzellen.

Die EMT ist ein reversibler Prozess, bei dem Epithelzellen ihre epithelialen Eigenschaften auf molekularer und morphologischer Ebene verlieren und

mesenchymale Merkmale entwickeln. Sie ist gekennzeichnet durch eine Verminderung der Expression epithelialer Marker wie beispielsweise E-Cadherin (CDH1), einem Protein, das an der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt ist [85]. Mesenchymale Marker wie zum Beispiel das Intermediärfilamentprotein Vimentin werden dagegen hochreguliert, was zu erhöhter Motilität und Invasion führt [85].

Mit der Entwicklung von mesenchymalen Eigenschaften erlangen Karzinomzellen die Fähigkeiten, sich von dem Primärtumor zu lösen, die Basalmembran zu durchwandern und über den Kreislauf in tumorferne Gewebe zu metastasieren [85]. Der umgekehrte Prozess, die mesenchymale-epitheliale Transition (MET), bei dem die Zellen ihre epithelialen Eigenschaften zurückerlangen, spielt anschließend bei der Manifestation der Metastase eine ebenso wichtige Rolle [85].

Die EMT wird durch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise ZEB1 bzw. ZEB2 und Snai1 gesteuert, die die epitheliale Genexpression unterdrücken und damit als EMT-Aktivatoren fungieren [86, 87]. So binden die Transkriptionsfaktoren ZEB1 und ZEB2 an die Promotorregion von CDH1 und verhindern dessen Transkription [86, 87].

CDH1 wird in epithelialen Zellen stark exprimiert [88]. Benachbarte CDH1-Moleküle bilden ein Netzwerk von Zell-Zell-Kontakten, den epithelialen-junktionalen Komplex, der für die Adhäsion und die Organisation des epithelialen Zytoskeletts verantwortlich ist [89, 90]. Die CDH1-Expression korreliert mit dem Erhalt des epithelialen Phänotyps und verhindert die Entwicklung invasiver Eigenschaften von Karzinomzellen [85]. CDH1 ist damit ein zentrales Protein des epithelialen Zellverbandes und unterdrückt Invasion und Metastasierung von Karzinomzellen [88].

Ebenso wie Proteine fungieren auch verschiedene miRNA als Aktivatoren oder Repressoren der EMT [91]. Die miRNA-200-Familie setzt sich aus den fünf Mitgliedern miRNA-141, miRNA-200a/b/c und miRNA-429 zusammen [84]. Alle Mitglieder der miRNA-200-Familie werden in epithelialen Zellen stark exprimiert. Die ZEB1-mRNA ist eine wichtige Ziel-mRNA, deren Translation gehemmt wird (Abb. 4) [82]. Dies führt zu einer vermehrten Expression von CDH1 und somit zur Stabilisierung des epithelialen Phänotyps [84]. Eine starke Expression von ZEB1, wie sie in mesenchymalen Zellen vorliegt, hemmt zum einen die Expression der miRNA-200-Familie und bewirkt zum anderen eine Herunterregulation von CDH1 und somit einen Verlust der Zell-Zell-Kontakte [68, 83].

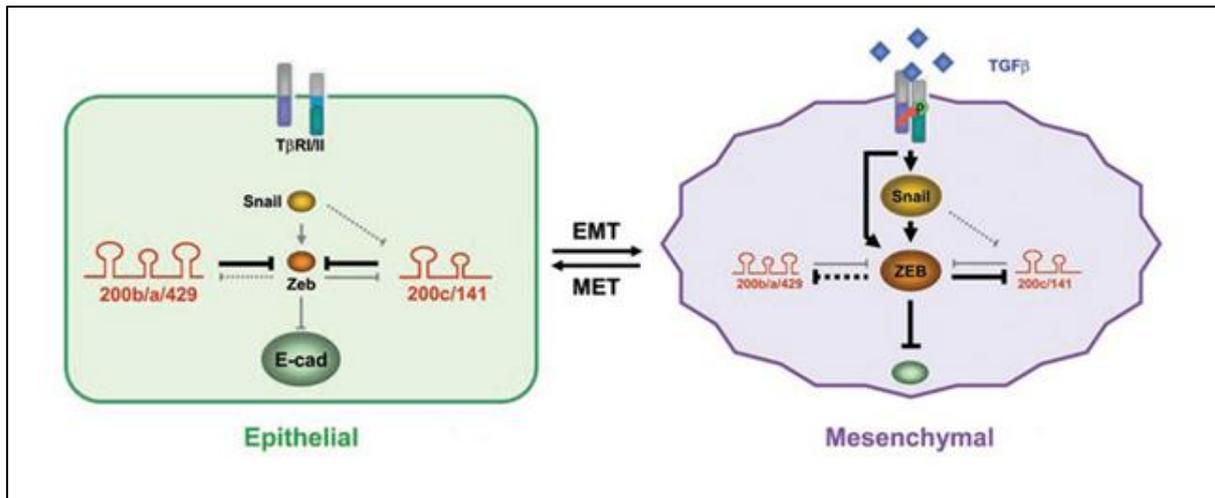


Abbildung 4: Der Einfluss von miRNA-200-Familie, ZEB1 und CDH1 auf die EMT

Die Mitglieder der miRNA-200-Familie unterdrücken in der epithelialen Zelle (grün) über die Regulation der ZEB-Faktoren die EMT. Unter Einfluss von TGF- β wird die Expression von Snai1 und ZEB1 gesteigert, wodurch es zur Inhibierung der CDH1-Expression und damit zur Entwicklung mesenchymaler Zelleigenschaften (violett) kommt. (modifiziert nach Korpál et al. [82])

Der Transkriptionsfaktor Snai1 rekrutiert verschiedene Co-Repressor-Komplexe, um seine inhibitorische Funktion während der EMT auszuführen. Die Interaktion von Snai1 mit dem LSD1-CoREST-Komplex führt zur Demethylierung von H3K4me2 am CDH1-Promotor, was die Expression von CDH1 inhibiert und somit die EMT unterdrückt [92]. Eine Therapie, die sich spezifisch gegen LSD1 richtet, könnte eine effiziente Strategie in der Behandlung von metastasierenden Tumorerkrankungen sein.

1.3 Zielsetzung

Das Lungenkarzinom ist die häufigste Krebstodesursache weltweit. Die Therapie des Lungenkarzinoms ist trotz neuer Strategien aufgrund von unbekanntem Treibermutationen, der Entwicklung von Resistenzen und einer oftmals späten Diagnosestellung nach wie vor eine Herausforderung.

LSD1 wird in verschiedenen Krebsarten, so auch im NSCLC überexprimiert. Es ist bekannt, dass die Expression von LSD1 unter dem Einfluss verschiedener miRNA reguliert wird. In unterschiedlichen malignen Tumorentitäten konnten veränderte Expressionsmuster von miRNA nachgewiesen werden, sodass miRNA als potenzielle Zieldomänen in Krebstherapien Gegenstand aktueller Forschung sind. Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von LSD1 auf die Expression ausgewählter miRNA im NSCLC zu untersuchen.

Dazu sollte zunächst ein Probenkollektiv mit unterschiedlicher LSD1-Expression zusammengestellt werden. Es sollten RNA-Proben von verschiedenen NSCLC-Zelllinien mit modifizierter, transgener LSD1-Expression verwendet und der Gehalt von miRNA-15b, miRNA-16_2, miRNA-143 und miRNA-200a darin ermittelt werden. Zusätzlich sollten murine Proben aus einem genetischen NSCLC-Mausmodell und humane NSCLC-Proben untersucht werden, von denen jeweils Material aus dem Tumoranteil sowie aus dem nicht tumorösen Anteil vorliegen sollte. Im Weiteren sollte die RNA aus den humanen Proben isoliert, die RNA-Güte evaluiert und Proben mit ausreichender RNA-Qualität durch qPCR auf die Expression von LSD1 und der ausgewählten miRNA analysiert werden.

2. Material und Methoden

In dieser Arbeit wurden die folgenden Materialien und Methoden verwendet.

2.1 Material

In dieser Arbeit wurden die folgenden Materialien verwendet.

2.1.1 Software

Die in dieser Arbeit genutzte Software ist in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 1: Software

Verwendungszweck	Name	Firma
Patientenmanagement	PathoPro	ifms GmbH, Saarbrücken, DE
Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	NanoDrop1000 3.7.1	Peqlab, Erlangen, DE
q-PCR	BioRad IQ5	BioRad, München, DE
	Lightcycler®480 SW 1.5	Roche, Mannheim, DE
	Stratagene MxPro 3000P V4.00	Stratagene, La Jolla, US
Imaging Software	Cell^P	Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, DE
	Diskus	Hilgers, Königswinter, DE
	Image J	Open Source
Datenanalyse	Excel 2016	Microsoft, Redmont, US
	GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, US

2.1.2 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Gerätschaften sind standardmäßiger Bestandteil der Laborausstattung am Institut für Pathologie der Universität zu Köln und sind nachfolgend in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt. Alle weiteren verwendeten Gerätschaften werden im jeweiligen Arbeitsschritt genannt.

Tabelle 2: Geräte

Name	Hersteller
Biomek FX ^P Beckman Coulter Roboter	Beckman Coulter, Krefeld, DE
BioRad C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad, Munich, DE
Centrifuge 5418 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Centrifuge 5430	Eppendorf, Hamburg, DE
Heraeus TM Pico TM Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US
Laborlux S	Leica, Wetzlar, DE
Leica DM5500 B	Leica, Wetzlar, DE
Leica CTR550	Leica, Wetzlar, DE
Millipore-Q Plus	Millipore, Molsheim, DE
NanoDrop TM 1000 Spectrometer	Thermo Scientific, Waltham, US
Precellys 24 Homogenisator	Peqlab, Erlangen, DE
Promega Maxwell [®] 16	Promega, Mannheim, DE
PTC 2000 Peltier Thermo Cycler	MJ Research, Quebec, CA
Roche Lightcycler 480	Roche, Mannheim, DE
Stratagene MxPro 3000P	Stratagene, La Jolla, US
Thermomixer Comfort [®]	Eppendorf, Hamburg, DE
Tissue-Tek Prisma	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, NL)

Vanox AH-2	Olympus, Hamburg, DE
Vortex Genie 2™	Scientific Industries Inc., New York, US

2.1.3 Kits und Assays

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits und deren Hersteller werden in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3: Kits und Assays

Verwendungszweck	Name	Hersteller
RNA-Extraktion	miRNEasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
	Maxwell® 16 miRNA Tissue Kit	Promega, Mannheim, DE
	Maxwell® 16 LEV RNA FFPE Kit	Promega, Mannheim, DE
	miScript II RT Kit	Qiagen, Hilden, DE
cDNA-Synthese		
qPCR	GoTaq® qPCR Master Mix Kit	Promega, Mannheim, DE

2.1.4 Oligonukleotide

Die für die qPCR in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, DE) und von der Firma Qiagen (Hilden, DE) bezogen und sind in den nachstehenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle 4: Primer, die für die qPCR aus den Zelllinien verwendet wurden

Oligonukleotid	Sequenz	Spezies
18S-F	AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG	human
18S-R	CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA	human
LSD1-F	CCC TTA AGC ACT GGG ATC AG	human
LSD1-R	ACA CGA GTA GCC ATT CCT TAC TG	human
ZEB1-F	TTA GAC ACA AGC GAG AGG ATC A	human
ZEB1-R	TGA ATC TGA ATT TGT TTC TAC CAC A	human

Tabelle 5: Primer, die für die qPCR aus Mauslunge verwendet wurden

Oligonukleotid	Sequenz	Spezies
18S-F	AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG	human
18S-R	CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA	human
LSD1-F	TGA GCA GAT TGA ACA TTG GAA	murin
LSD1-R	TTG CTG ATG GAG CTC TTT AAT TT	murin
CDH1-F	AGA AAC TGG CAT CCT CAC AGC	murin
CDH1-R	CTG CTG CTT GGC CTC AAA ATC	murin
ZEB1-F	AGG TGA TCC AGC CAA ACG	murin
ZEB1-R	GGT GGC GTG GAG TCA GAG	murin

Tabelle 6: Primer, die für die qPCR aus FFPE-Gewebe verwendet wurden

Oligonukleotid	Sequenz	Spezies
18S-F	AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG	human
18S-R	CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA	human
LSD1-F	GCT CTT CCT CTT CTG GAA CCT	human
LSD1-R	GCC AAC AAT CAC ATC GTC AC	human
CDH1-F	CCC GGG ACA ACG TTT ATT AC	human
CDH1-R	GCT GGC TCA AGT CAA AGT CC	human
ZEB1-F	AGG ATG ACC TGC CAA CAG AC	human
ZEB1-R	AGG ATT TCT TGC CCT TCC TT	human

Tabelle 7: miRNA-Primer, die für die qPCR aus Zellkultur, Mauslunge und FFPE-Gewebe verwendet wurden

Oligonukleotid	Katalognummer	Spezies
RNU6	MS 0001 4000	human
miRNA-15b	MS 0000 8792	human
miRNA-16_2	MS 0000 6517	human
miRNA-143	MS 0000 3514	human
miRNA-200a	MS 0000 3738	human
Universalprimer	218075	human

2.1.5 Antikörper

Die Antikörper, die bei der Immunhistochemie verwendet wurden, sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 8: Antikörper, die für die Immunhistochemie verwendet wurden

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
LSD1	Maus	1:800	Acris Antibodies GmbH, Herford, DE
CDH1	Maus	1:50	Dako Agilent, Santa Clara, US
Vimentin	Kaninchen	1:200	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

2.1.6 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten gebrauchsfertigen Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE), der Firma Sigma-Aldrich (Missouri, US) und der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, US) bezogen und sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 9: Chemikalien und Reagenzien

Verwendungszweck	Bezeichnung	Hersteller
RNA-Extraktion aus Zellkultur	Chloroform	
	Ethanol	
	Xylol	
RNA-Extraktion aus FFPE-Gewebe	Ethanol	
	Proteinase-K-Solution, 20 mg/μl	Invitrogen, Carlsbad, US
	Isopropanol	
	Glykogen, 20 mg/μl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
	Ribolock RNase-Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
	DNase I recombinant	Roche, Basel, CH
	Magnesium(II)-chlorid, 25mM	Fermentas, Waltham, US
	RNase-freies Wasser	Promega, Mannheim, DE

2.1.7 Puffer und Lösungen

Das bei der Herstellung von Puffern und Lösungen verwendete voll entsalztes Wasser wurde über eine Millipor-Q Plus-Filteranlage (Millipore, Molsheim, DE) demineralisiert und vor der Verwendung autoklaviert.

2.1.7.1 Puffer und Lösungen für die Extraktion von Gesamt-RNA aus FFPE-Gewebe

Proteinase-K-Puffer:

Tris-HCl, 1 M	1 ml
EDTA, 0,5 M	0,5 ml
SDS, 20 %	0,25 ml
H ₂ O	ad 50 ml

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohollösung:

Aqua-Roti-Phenol	250 ml
Chloroform	240 ml
Isoamylalkohol	10 ml

Natriumacetatlösung (3M, pH=5,2):

Natriumacetat	24,61 g
RNase-freies Wasser	ad 100 ml, pH 5,2

2.1.8 Weitere Materialien

Sofern nicht anders angegeben, wurden Einwegmaterialien wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Mikrotiterplatten von der Firma Biozym (Oldendorf, Deutschland), der Firma Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland), der Firma Greiner Bio-One International GmbH (Deutschland / Österreich) und der Firma Bio-Rad Laboratories, Inc. (Kalifornien, USA) bezogen. Die Materialien wurden steril verpackt von den Herstellern bereitgestellt oder vor der Verwendung bei 121°C und 1,2 Bar für 20 Minuten autoklaviert. Verwendete Glaswaren wurden vor Gebrauch im Backschrank über 5 Stunden bei 180°C sterilisiert.

2.1.9 Zelllinien, Versuchstiere und Patientenmaterial

In dieser Arbeit wurden Proben von humanen NSCLC-Zelllinien, natives Lungengewebe von Modellmäusen und FFPE-Material von Teilresektationen von Patientinnen und Patienten mit NSCLC verwendet.

2.1.9.1 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden humane NSCLC-Zelllinien verwendet, die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt sind. Die verwendeten Zelllysate wurden mir freundlicherweise von Iris Macheleidt und Soyoung Lim, Institut für Pathologie der Universität zu Köln zur Verfügung gestellt [61].

Tabelle 10: humane LUAD Zelllinien

Zelllinie	Treibermutation
A549 empty	KRAS G12S stabil transduziert mit einem leeren Kontrollvektor
A549 Flag-LSD1	KRAS G12S stabil transduziert mit einem FLAG-LSD1-Expressionsvektor
A549-GFP	KRAS G12S stabil transduziert mit einem shGFP-Plasmid
A549-KD15	KRAS G12S stabil transduziert mit shLSD1-Expressionsplasmid, Klon 15
PC9-GFP	EGFR del E745_A750; tp53 R248Q stabil transduziert mit einem shGFP-Plasmid
PC9-KD20	EGFR del E745_A750; tp53 R248Q stabil transduziert mit einem shLSD1-Expressionsplasmid, Klon 20
H460-GFP	KRAS Q61H, PIK3CA E545K stabil transduziert mit einem shGFP-Plasmid
H460-KD21	KRAS Q61H, PIK3CA E545K stabil transduziert mit einem shLSD1-Expressionsplasmid, Klon 21

H460-KD22	KRAS Q61H, PIK3CA E545K stabil transduziert mit einem shLSD1-Expressionsplasmid, Klon 22
H1975-GFP	EGFR L858R, T790M; tp53 R273H stabil transduziert mit einem shGFP-Plasmid
H1975-KD2	EGFR L858R, T790M; tp53 R273H stabil transduziert mit einem shLSD1-Expressionsplasmid, Klon 2

3.1.9.2 Versuchstiere

Für diese Arbeit wurde Probenmaterial von 15 transgenen Mäusen verwendet, welche ein humanes KRAS-Gen mit einer G12V-Mutation trugen. Die Transkription des KRAS-Gens wird ursprünglich durch eine Stop-Kassette verhindert. Durch die Inhalation eines Adenovirus-Typ-5-Vektors kommt es zur Applikation der Cre-Rekombinase in Lungenepithelzellen. Die Expression der Cre-Rekombinase verursacht die Exzision der Stop-Kassette und somit die Expression des mutierten KRAS-Gens. Es kommt zur Ausbildung von Adenokarzinomen in der Lunge (Abb. 5) [93].

Bei den verwendeten Proben handelt es sich um natives Lungengewebe, das mir freundlicherweise von Iris Macheleidt, Institut für Pathologie der Universität zu Köln zur Verfügung gestellt wurde [62]. Die Mausversuche wurden von Iris Macheleidt unter der Versuchsgenehmigung AZ: 84-02.04.2014.A235 durchgeführt. Von den verwendeten fünfzehn Mäusen, haben sieben Mäuse nach sechs Wochen Tumore entwickelt, während weitere acht Mäuse noch regelrechtes Lungengewebe aufwiesen. Alle Mäuse wurden auf ihre Luziferaseexpression hin untersucht, um auszuschließen, dass das nicht vorhandene Tumorstadium auf eine fehlende Virusinduktion zurückzuführen ist [62].

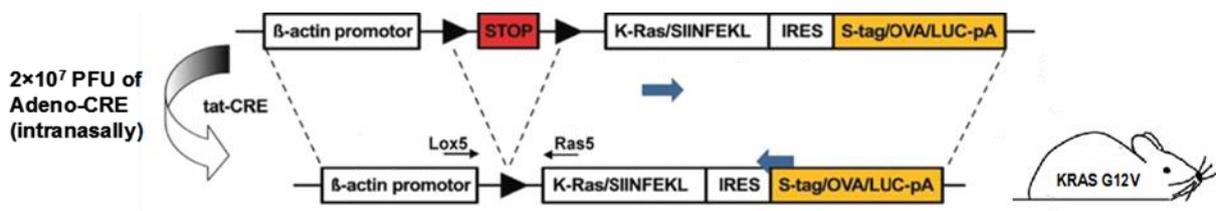


Abbildung 5: Eine transgene KRAS-Expression nach adenoviraler Cre-Applikation führt zur Induktion von Lungenkarzinomen

Nach Cre-Applikation durch Inhalieren von viralen Cre-Adtyp 5 Vektoren kommt es infolge der Cre-Expression in Lungenepithelzellen zur Exzision der Stop-Kassette. Die transgene Expression der KRAS-Mutante führt zur Entwicklung von Lungenadenokarzinomen (nach König et al [93]). Creative Common Lizenz: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

2.1.9.3 Patientenmaterial

Die verwendeten Gewebeproben stammen von Teilresektationen von Patientinnen und Patienten mit NSCLC, die im Rahmen der BioMaSOTA-Studie 13-091 am Institut für Pathologie der Universität zu Köln gesammelt wurden. Die Proben waren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE). Die Patientinnen und Patienten wurden weder prä- noch postoperativ einer weiteren Behandlung unterzogen. Die Tumoren wurden in Bezug auf „Grading“, Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen sowie KRAS- und EGFR-Mutationsstatus klassifiziert. Ausgewählt wurden jeweils Gewebeproben mit Tumoranteil und in bestimmten Fällen zusätzlich Gewebeproben aus einem tumorfreien Lungenabschnitt. Im Einverständnis mit den Patientinnen und Patienten wurden die Proben gesammelt (BioMaSOTA-Studie 13-091) und für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt. Das Forschungsvorhaben wurde von der lokalen Ethikkommission bewilligt (20-1260).

2.2 Methoden

In dieser Arbeit wurden die folgenden Methoden angewandt.

2.2.1 RNA-Extraktion

Es wurde aus humanen Zellkulturproben, nativem Lungengewebe von Mäusen, sowie von humanem FFPE-Material mittels verschiedener Methoden, die im Folgenden erklärt werden, RNA isoliert.

2.2.1.1 RNA-Extraktion aus Zellkultur

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus den Zelllinien erfolgte mithilfe des miRNEasy Mini Kits der Firma Qiagen (Hilden, DE) nach Angaben des Herstellers. Die RNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.1.2 RNA-Extraktion aus Mausmodellen

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus den Lungengewebeproben der Modellmäuse erfolgte mithilfe des Maxwell® 16 miRNA Tissue Kit der Firma Promega (Mannheim, DE) nach Angaben des Herstellers. Die Gewebeproben wurden zunächst bei -80°C und dann bis zur weiteren Prozessierung in flüssigem Stickstoff gelagert. Jede Gewebeprobe wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, mit drei Keramikkügelchen bestückt und homogenisiert. Die folgende RNA-Isolierung erfolgte mithilfe des automatisierten Systems Maxwell® 16 (Promega, Mannheim, DE) nach Angaben des Herstellers. Die RNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.1.3 RNA-Extraktion aus formalinfixiertem, paraffineingebettetem Patientenmaterial

Von dem FFPE-Material wurden freundlicherweise im Schnellschnittlabor des Johanneskrankenhauses in Bonn Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträger gebracht. Die Gewebeschnitte mit Tumoranteil (s. 2.1.9.3) wurden mit den jeweiligen HE-Präparaten verglichen, um die Tumorareale zu identifizieren. Bei der Makrodissektion dieser Präparate wurden ausschließlich die Tumoranteile aus den Schnitten entnommen und in Reaktionsgefäße überführt. Die Schnitte von den tumorfreien Gewebeproben wurden vollständig verwendet.

Gesamt-RNA-Extraktion mit miRNA:

Die Extraktion von Gesamt-RNA inklusive miRNA erfolgte auf Phenolbasis nach Chomczynski und Sacchi [94].

a) Entparaffinierung:

Vor Beginn der RNA-Extraktion müssen die Gewebeschnitte entparaffiniert werden. Zu diesem Zweck wurden die Proben zunächst 5 Minuten lang bei 65°C im Thermomixer Comfort® (Eppendorf, Hamburg, DE) inkubiert. Im folgenden Schritt wurden die Proben zum Lösen des Paraffins aus dem Probengewebe dreimal jeweils mit 500 µl Xylol versetzt, gemischt, erneut für 5 Minuten bei 65°C unter ständigem Schütteln inkubiert und anschließend für 2 Minuten bei 13000 x g in der Heraeus™ Pico™ Mikrozentrifuge (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US) zentrifugiert. Zum Herauswaschen des Xylols wurden die Proben im Anschluss dreimal mit 100%igem Ethanol versetzt, gemischt und nochmals für 2 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils abpipettiert. Zur Trocknung wurden die Proben geöffnet für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank gelagert.

b) Proteinase-K-Verdau:

In jede Probe wurden für den Proteinverdau 200 µl Proteinase-K-Mix mit 5 µl Proteinase-K-Solution (20 mg/µl) gegeben und über Nacht bei 65°C inkubiert. Die Proteinase-K-Aktivität wurde im Anschluss über 10 Minuten bei 95°C gestoppt.

c) RNA-Extraktion:

Zur Lysierung der Zellstrukturen wurde jede Probe mit 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohollösung versetzt. Die anschließende Natriumacetatfällung erfolgte durch die Zugabe von 20 µl 3M Natriumacetatlösung (pH=5,2). Der Ansatz wurde nach kurzem Schwenken für 20 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Der dabei entstandene wässrige Überstand und die darin enthaltene RNA wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit der Zugabe von jeweils 200 µl eiskaltem Isopropanol und 0,5 µl Glykogen (20 mg/µl) gefällt und für 2 Stunden bei -20°C gelagert. Im folgenden Schritt wurden die Proben für 20 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Die entstandenen RNA-Pellets wurden in drei aufeinander folgenden Waschschrritten jeweils mit 500 µl eiskaltem 70%igem Ethanol versetzt, gemischt und für 5 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Zum Trocknen wurden die Proben geöffnet bei 37°C im

Brutschrank gelagert. Im Anschluss wurden die RNA-Pellets einer jeden Probe in 20 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und mit 1 µl Ribolock (RNase-Inhibitor) versetzt.

d) DNase-Behandlung:

Zur Hydrolyse von DNA-Resten wurden jeder Probe 3 µl DNase I recombinant (Incubation buffer 10x) und 1 µl Magnesium(II)-chlorid (25 mM) beigefügt. Die Proben wurden dann für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Stoppen der DNase-Reaktion erfolgte für 3 Minuten bei 95°C. In einem letzten Schritt wurde jede Probe erneut mit 1 µl Ribolock versetzt. Die RNA-Proben wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

Gesamt RNA-Extraktion ohne kleine RNA:

Die Extraktion von RNA aus den FFPE-Proben erfolgte mithilfe des Maxwell® 16 LEV RNA FFPE Kit der Firma Promega (Mannheim, DE) nach Angaben des Herstellers. Die RNA-Aufreinigung erfolgte automatisiert mithilfe des Maxwell® 16 (Promega, Mannheim, DE). Die RNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2 Quantifizierung von mRNA und miRNA

Für die Quantifizierung von mRNA und miRNA musste die Gesamt-RNA zunächst in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert werden. Die Expressionen von mRNA und miRNA wurden im Anschluss mittels qPCR ermittelt.

2.2.2.1 Polyadenylierung und reverse Transkription von Gesamt-RNA

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration der RNA-Proben erfolgte mithilfe des Spektralphotometers NanoDrop™ 1000 Spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers. Polyadenylierung und reverse Transkription erfolgten mit dem miScript II RT Kit der Firma Qiagen (Hilden, DE) nach Anweisungen des Herstellers. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei 37°C mithilfe des PTC 2000 Peltier Thermo Cycler der Firma MJ Research (Quebec, CA). Die Inaktivierung des miScript Reverse Transcriptase Mixes erfolgte für 5 Minuten bei 95°C. Pro Reaktion wurden 500 ng RNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt. Die cDNA-Proben wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 Synthese und Quantifizierung von mRNA und miRNA mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR)

Die quantitative Erfassung der Nukleinsäureamplifikate erfolgte mittels fluoreszenzbasierter qPCR. Als Fluoreszenzfarbstoff diente dabei SYBR Green I. Dieser Farbstoff interkaliert an der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA und emittiert in Bindung mit der DNA bei einer Wellenlänge von $\lambda=521$ nm grünes Licht, welches am Ende eines jeden PCR-Zyklus gemessen wird. Die Zunahme der Fluoreszenz verhält sich proportional zur Anzahl der Amplifikate der Ziel-DNA. Die qPCR erfolgte in Triplikaten und mithilfe des GoTaq® qPCR Master Mix Kits der Firma Promega (Mannheim, DE) und wurde jeweils mit einem Gesamtvolumen von 15 μ l pro Ansatz durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermixes und des Gesamtvolumens erfolgte nach dem folgenden Schema:

Tabelle 11: Zusammensetzung des Mastermixes und das Gesamtvolumen einer qPCR (μ l)

Komponente	Volumen pro Ansatz [μl]
GoTaq® qPCR Master Mix	7,5
SYBR® Green	
Primer F bzw. miRNA-Primer	0,4
Primer R bzw. Universalprimer	0,4
nukleasefreies Wasser	5,7
Gesamtvolumen Mastermix	14
cDNA 1 ng/ μ l (miRNA) bzw. 10 ng/ μ l (mRNA)	1
Gesamtvolumen	15

Die qPCR erfolgte über mindestens 40 Zyklen mithilfe verschiedener Thermocycler (s. Tabelle 2). Zur Aktivierung der Polymerase erfolgte initial eine Inkubation für 2 Minuten bei 95°C. Darauf folgte der Zyklus bestehend aus Denaturierung, „Annealing“ und „Elongation“. Die Denaturierung der doppelsträngigen cDNA erfolgte bei 95°C. Die „Annealing“-Temperatur betrug primerspezifisch 60°C (mRNA) bzw. 55°C (miRNA). Die Elongation erfolgte bei 72°C. Aus den Ct-Werten der Triplikate wurden die Mittelwerte berechnet. Die Transkripte LSD1, CDH1 und ZEB1 wurden mithilfe der Expression eines sogenannten „Housekeeping-Gens“, von dem man erwartet, dass es keinen Stimulierungsveränderungen unterliegt und stabil exprimiert wird, verglichen. Hier wurde zur Normalisierung 18S-rRNA herangezogen. Die relative Expression von LSD1, CDH1 und ZEB1 wurde dann anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ermittelt [95]. Die Spezifität der Primer wurde vor der Durchführung der qPCR in einem Vortest getestet. Die Expressionen der miRNA wurde anhand einer Standardkurve bestimmt. Als Referenz diente hierbei die Expression von RNU6. Zur Erstellung der Standardkurve wurden aus den Mausproben, den Zellkulturproben und den FFPE-Proben jeweils ein Probenpool angesetzt und daraus eine Standardreihe mit Konzentrationen von 8,33-0,07 ng/ μl angesetzt. Die Konzentrationen der miRNA wurden entweder direkt anhand der Standardreihe abgelesen oder anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ermittelt.

2.2.3 Färbungen

2.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Lungenschnittpräparate wurden im Routinelabor des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik zu Köln entparaffiniert und im Anschluss mit Hämatoxylin und Eosin gemäß dem Standardverfahren gefärbt. Hämatoxylin ist ein natürlicher, basischer Farbstoff, der saure Zellbestandteile blau färbt. So erfolgt die Kernfärbung mit Hämatoxylin. Die Gegenfärbung erfolgt mit dem synthetischen, sauren Farbstoff Eosin, das basische Zellstrukturen wie das Zytoplasma rot färbt. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Übersichtsfärbung, die am Anfang jeder histopathologischen Klassifikation steht. Mit ihr können verschiedene Gewebestrukturen voneinander unterschieden werden.

2.2.3.2 Immunhistochemie (IHC) und Farbanalyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden an den Gewebeschnittpräparaten neben der Quantifizierung der EMT-Marker auf RNA-Basis mittels qPCR zusätzlich immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die FFPE-Proben wurden freundlicherweise im Routinelabor von Marion Müller, Institut für Pathologie der Universität zu Köln nach Standardverfahren entparaffiniert und gefärbt. Bei der IHC wurden spezifische Antikörper verwendet, die entweder mit Peroxidase oder alkalischer Phosphatase konjugiert waren. Indem die Enzymsubstrate hinzugefügt wurden, konnten die hier untersuchten Zielantigene LSD1, CDH1 und Vimentin bei Zustandekommen einer Antigen-Antikörper-Bindung anhand dieser Immunmarkierung detektiert werden. Die Primärantikörper sowie die eingesetzte Verdünnung sind in Tabelle 8 angegeben.

Die anschließende Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte erfolgte anhand einer Pixelanalyse. Dazu wurden zunächst lichtmikroskopisch (Vanox AH-2, Olympus, Hamburg, DE) und mit der entsprechenden Software (Cell[^]P, Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, DE) von jedem Schnitt jeweils zehn digitale Fotografien angefertigt. Die Fotodateien wurden in ein spezielles Bildverarbeitungsprogramm (Image-J, Open Source) eingefügt, welches die Pixel, die die im histologischen Gewebeschnitt angefärbten Areale repräsentieren, auszählt. Der Mittelwert der ausgezählten Pixel stellt die Expression der untersuchten Zielantigene dar. Die n-fache Expression der Zielantigene im Tumorgewebe im Vergleich zum normalen Lungengewebe wird durch den Fold Change repräsentiert.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von LSD1 auf die Expression ausgewählter miRNA in humanen NSCLC-Zelllinien, in murinem und in humanem Lungengewebe untersucht. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche werden im Folgenden beschrieben.

3.1 Der Einfluss von LSD1 auf die Expression ausgewählter miRNA in NSCLC-Zelllinien

In einem Sichtungungsverfahren an A549-Zellen konnte eine starke Herunterregulation von pre-miRNA-15b und pre-miRNA-16_2 in Abhängigkeit von LSD1 beobachtet werden. Mit miRNA-143 und miRNA-200a wurden neben miRNA-15b und miRNA-16_2 zwei weitere miRNA untersucht, die eine wichtige Rolle in der Tumorgenese bzw. in der EMT spielen. Der Einfluss von LSD1 auf die ausgewählten miRNA wurde an verschiedenen NSCLC-Zelllinien mittels qPCR untersucht. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellysate wurden mir freundlicherweise von Iris Macheleidt und Soyoung Lim, Institut für Pathologie der Universität zu Köln zur Verfügung gestellt.

Zur Analyse der Expression der miRNA in Abhängigkeit des LSD1-Gehalts wurde zunächst die NSCLC-Zelllinie A549 verwendet. Die Zelllinie wurde stabil transduziert, sodass unterschiedliche Zellklone einen unterschiedlichen LSD1-Gehalt aufwiesen. Die A549-Zellen wurden mit einem Flag-LSD1- bzw. mit dem korrespondierenden empty-Vektor oder mit einem shLSD1- bzw. dem korrespondierenden shGFP-Vektor transduziert. Die mit Flag-LSD1 transduzierten Zellen zeigten eine deutliche Überexpression der LSD1-mRNA. Als Kontrolle und Bezugsgröße wurden die Zellen A549 empty verwendet. Gegenüber den LSD1-Flag-Zellen zeigten die shLSD1-Zellen einen deutlich geringeren LSD1-mRNA-Spiegel (Abb. 6A).

Von den untersuchten miRNA zeigte nur miRNA-200a eine Regulation, die abhängig vom LSD1-Gehalt der Zelllinie war. Die Expression von miRNA-200a korrelierte positiv mit der Expression von LSD1. In den Flag-LSD1-Zellen war der miRNA200a-Gehalt signifikant erhöht, während er in den shLSD1-Zellen signifikant reduziert war (Abb. 6B).

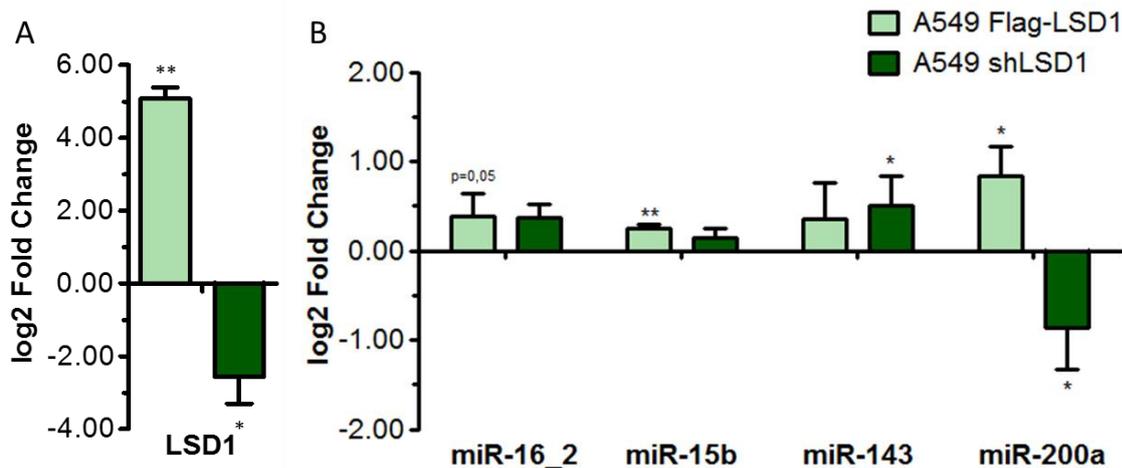


Abbildung 6: Der LSD1-Level beeinflusst die Expression von miRNA-200a in A549-Zellen

Die Expressionsmuster von LSD1 und der miRNA wurden mittels qPCR bestimmt. (A) Die mRNA-Expression von LSD1 wurde anhand der $\Delta\Delta Ct$ -Methode ermittelt. Für die Normalisierung wurden die LSD1-Werte auf die Spiegel von 18S-rRNA bezogen. (B) Die miRNA-Expression wurde mithilfe einer Standardkurve bestimmt. Als Housekeeping-Gen wurde RNU6 verwendet. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Balken die Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels Student's t-Test berechnet. * $p \geq 0,05$; ** $p \geq 0,01$; *** $p \geq 0,001$

Nachdem sich in den A549-Zellen Hinweise auf eine Abhängigkeit der Expression von miRNA-200a von LSD1 gezeigt haben, wurden die Expressionsmuster von LSD1 und miRNA-200a in weiteren NSCLC-Zelllinien untersucht, deren LSD1-Expression entweder mittels shLSD1 unterdrückt worden war oder nach stabiler Kontrolltransduktion mit shGFP unbeeinflusst war. Auch in diesen Zellsystemen wurde zunächst der LSD1-Gehalt ermittelt. In beiden shLSD1-Klonen der H460-Zellen sowie in den PC9-Zellen wurde LSD1 durch shLSD1 signifikant herunterreguliert, während in den H1975-Zellen nur ein leichter Trend der LSD1-Reduktion zu sehen war (Abb. 7). miRNA-200a wurde dagegen in den PC9-Zellen signifikant hochreguliert. Beide H460-Klone zeigten für miRNA-200a dagegen nur eine geringe Überexpression. Lediglich in den H1975-Zellen zeigte miRNA-200a ein vom LSD1-Gehalt abhängiges Expressionsmuster wie in den A549-Zellen (Abb. 7).

Da miRNA-200a eine entscheidende Rolle in der EMT spielt, wurde als EMT-Marker ZEB1 untersucht, das bei einer Hochregulation von miRNA-200a herunterreguliert wird [96]. ZEB1 wurde in beiden H460-Klonen leicht herunterreguliert und in den H1975-Zellen hochreguliert. In den PC9-Zellen war keine Abweichung der ZEB1-Regulation messbar (Abb. 7).

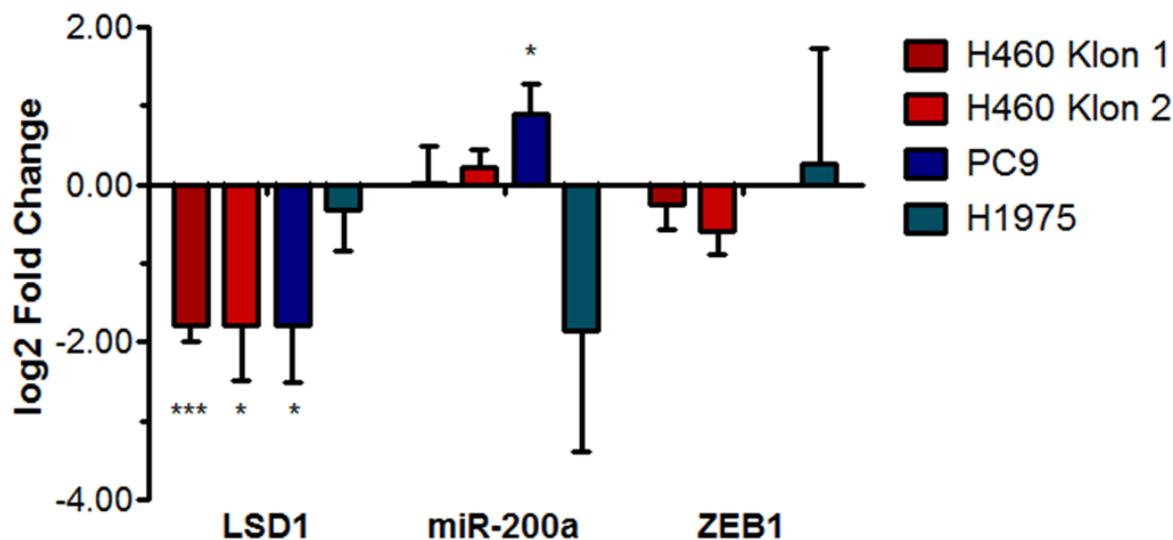


Abbildung 7: Der Einfluss des LSD1-Gehalts auf die Expression von miRNA200a und ZEB1 in verschiedenen NSCLC-Zelllinien

Die Expressionsmuster wurden mittels qPCR bestimmt. Für die Normalisierung der LSD1-mRNA-Spiegel wurden die Werte von 18S-rRNA und für die miRNA-Normalisierung die RNU6-Spiegel herangezogen. Die Expression wurde über die $\Delta\Delta Ct$ -Methode berechnet. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte der biologischen Replikate (n=3) und die Balken die Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mittels One-way ANOVA ermittelt. *p<0,05, ***p<0,001

3.2 Der Einfluss von LSD1 auf die miRNA-Expression in einem murinen Lungenkarzinom-Modell

Um den Einfluss von LSD1 auf die Expression von miRNA-200a und der EMT-Marker ZEB1 und E-Cadherin (CDH1) zu untersuchen, wurden native Lungengewebeproben von fünfzehn transgenen Mäusen verwendet, die nach inhalativer Cre-Applikation ein mutiertes KRAS-Gen exprimiert haben. Dies führte in sieben Mäusen zur Entwicklung von Adenokarzinomen in der Lunge, während acht Mäuse keine Tumore entwickelten [62]. Die verwendeten Proben wurden mir freundlicherweise von Iris Macheleidt, Institut für Pathologie der Universität zu Köln zur Verfügung gestellt.

Die LSD1-Expression im murinen Lungengewebe wurde zuvor von Iris Macheleidt, Institut für Pathologie der Universität zu Köln mittels IHC ermittelt [62]. Die Mäuse, die nach sechs Wochen Adenokarzinome in ihren Lungen entwickelten, zeigten eine signifikant höhere LSD1-Expression als die tumorfreen Mauslungengewebe (Abb. 8A) [62]. Aus allen Mauslungengeweben wurde RNA isoliert. Anschließend wurden die miRNA auf ihre Expression mittels qPCR untersucht. miRNA-16_2 und miRNA-143

zeigten im Mittel keine Änderung der Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum tumorfreien Gewebe. miRNA-15b und miRNA-200a zeigten dagegen einen leichten Trend, im Tumorgewebe reprimiert vorzuliegen. Während miRNA-200a in den Zelllinien A549 und H1975 in Abhängigkeit von LSD1 reguliert wurde, beobachtete man in den murinen Tumorproben gegenüber den genannten Zelllinien bei Hochregulation von LSD1 eine entgegengesetzte Regulation für miRNA-200a (Abb. 8B). ZEB1 und CDH1 wurden in den murinen Tumorproben im Mittel leicht hochreguliert (Abb. 8C). Eine Hochregulation von ZEB1 wurde in den Zelllinien nur in den H1975-Zellen nachgewiesen. Die Ergebnisse an den Mausproben erwiesen sich als nicht signifikant.

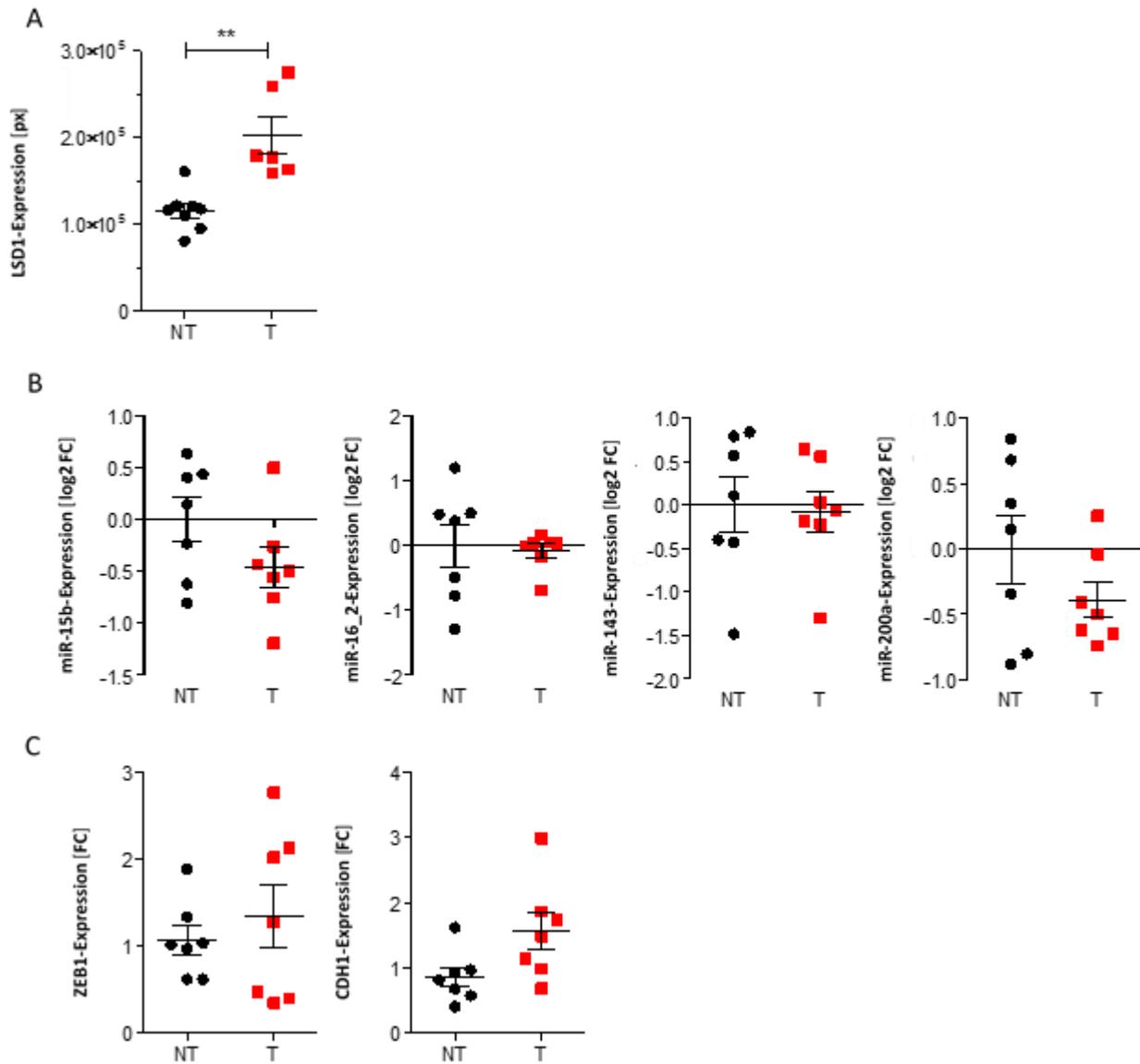


Abbildung 8: Expressionsmuster von LSD1, der miRNA und der EMT-Marker im murinen Lungenkarzinom-Modell

(A) LSD1-Expression in den murinen Lungengewebebeben. Die Expression wurde via IHC ermittelt [62]. (B) Expressionsmuster von miRNA-15b, miRNA-16_2, miRNA-143 und miRNA-200a. Die Expression wurde mittels qPCR und einer Standardkurve bestimmt. Als Housekeeping-Gen diente RNU6. (C) Expressionsmuster der EMT-Marker ZEB1 und CDH1. Die Expression wurde mittels qPCR und der $\Delta\Delta\text{Ct}$ - Methode ermittelt. Als Housekeeping-Gen diente dabei 18S-rRNA. Die Expressionslevel der tumorfreien Mäuse wurden als Referenz für die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Auswertung herangezogen. Jeder Punkt repräsentiert die Expression einer Maus. Die Balken markieren Mittelwert und Standardabweichung aller Mäuse. Die Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt.

** $p < 0,01$

Die mRNA-Expression von ZEB1 zeigte keine Korrelation mit der LSD1-Expression auf Proteinebene (Abb. 9A) aber eine signifikante, schwach positive Korrelation mit der mRNA-Expression von CDH1 (Abb. 9B). Eine Korrelation von ZEB1 mit der miRNA-200a-Expression konnte nicht nachgewiesen werden.

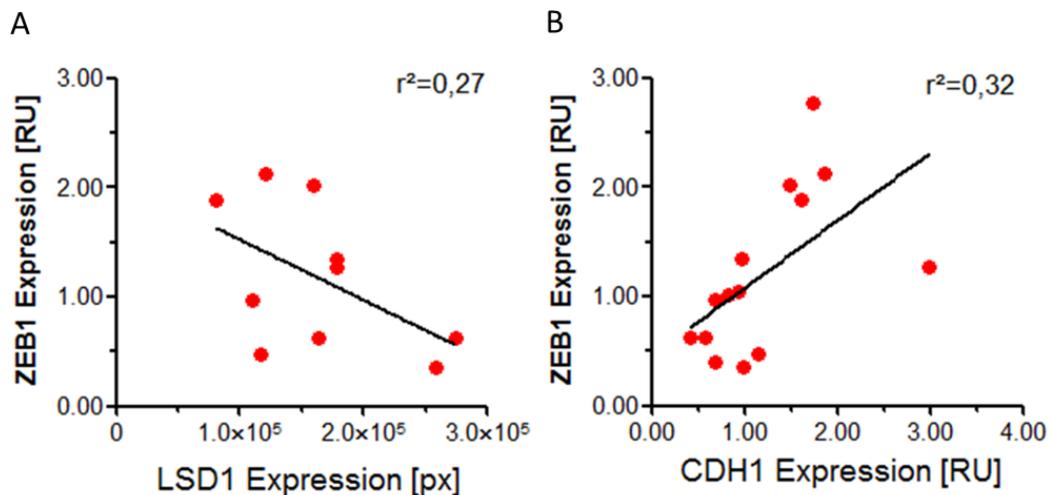


Abbildung 9: ZEB1-Expression in Abhängigkeit von LSD1- und CDH1-Expression

(A) Die mRNA-Expression von ZEB1 korrelierte nicht mit der LSD1-Expression auf Proteinebene. $p=0,12$, $r^2=0,27$ (B) Die mRNA-Expression von ZEB1 korrelierte signifikant mit der mRNA-Expression von CDH1. $p=0,03$, $r^2=0,32$. Die Punkte markieren den Mittelwert der biologischen Replikate. Zur Berechnung der Signifikanz wurde die Korrelation nach Pearson verwendet.

3.3 Der Einfluss der LSD1-Expression auf die Expression von miRNA-200a in menschlichen NSCLC-Proben

3.3.1 Zusammenstellung eines Patientenkollektivs zur Untersuchung von miRNA

Da die Formalinfixierung zu einer starken Fragmentierung der Nukleinsäuren führt, sollte von 62 Lungengewebeproben, die sich aus 46 NSCLC-Proben und 16 tumorfreien Proben zusammensetzten (vergl. 2.1.9.3), RNA isoliert und zunächst ermittelt werden, ob die RNA-Isolate für den quantitativen Nachweis der Expression von miRNA und mRNA geeignet sind. Bei dem Material handelte es sich um FFPE-Gewebeproben von Teilresektaten, die am Institut für Pathologie der Universität zu Köln gesammelt wurden.

Um die Qualität der RNA-Isolierung zu prüfen, wurde eine qPCR für die Housekeeping-Gene RNU6 und 18S-rRNA durchgeführt. Als Schwellenwert für eine gelungene RNA-Isolierung mit ausreichender RNA-Ausbeute wurde bei RNU6 ein Ct-Wert von 32 und

bei 18S-rRNA von 28 festgelegt (Abb. 10A). Die FFPE-Proben, deren Ct-Wert für RNU6 unterhalb des festgelegten Schwellenwertes lagen, wurden anschließend auf ihre Expression von miRNA-15b, -16_2, -143 und -200a untersucht.

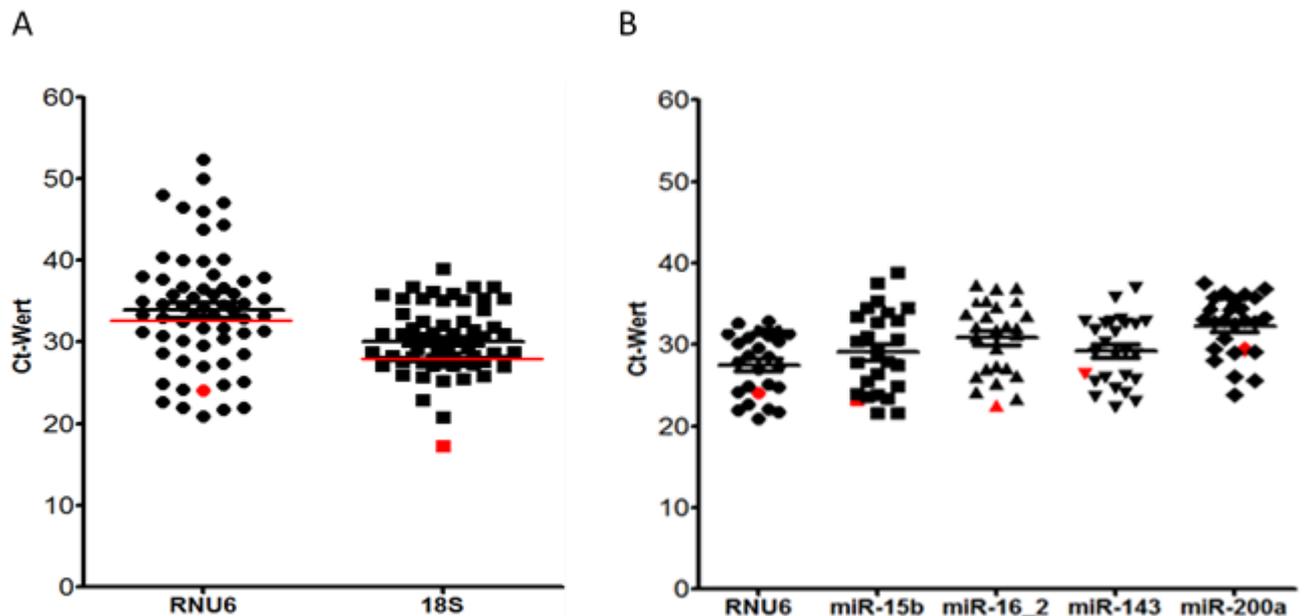


Abbildung 10: Ct-Werte von RNU6, 18S-rRNA und der miRNA nach qPCR aus FFPE-Proben eines vorläufigen Patientenkollektivs

(A) Ct-Werte der Housekeeping-Gene RNU6 und 18S-rRNA von allen 62 isolierten Patientenproben. Die rote Linie markiert die Schwellenwerte. (B) Die Proben, deren Ct-Werte von RNU6 unter dem Threshold lagen, wurden auf ihre Expression von miRNA-15b, -16_2, -143 und -200a untersucht. Jeder Punkt markiert den Mittelwert der biologischen Replikate. Die schwarzen Punkte markieren die Ct-Werte der FFPE-Proben. Die Querbalken repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung der FFPE-Proben. Die roten Punkte markieren die jeweiligen Ct-Werte der Zelllinie A549.

Die hohen Ct-Werte für die Housekeeping-Gene RNU6 und 18S-rRNA, die mittels qPCR von den RNA-Populationen der 62 Lungengewebebeben ermittelt worden waren, zeigten deutlich, dass aus der Mehrheit der Gewebeproben sehr wenig RNA oder RNA von schlechter Qualität isoliert worden war. Für die weiteren Untersuchungen wurden nur Proben eingesetzt, deren Ct-Werte von RNU6 und 18S-rRNA unterhalb der gesetzten Schwellenwerte lagen. Als endgültiges Probenkollektiv wurden 23 Proben ausgewählt.

Im Adenokarzinom der Lunge ist mit etwa 40% KRAS das Gen, das am häufigsten von Mutationen betroffen ist. Das Probenkollektiv setzte sich aus 11 Proben mit mutiertem KRAS-Gen und 12 Proben mit KRAS-Wildtyp zusammen. In jedem Fall wurden jeweils Gewebeproben aus dem tumorhaltigen Lungenabschnitt sowie von tumorfreiem

Lungengewebe ausgewählt, sodass sich insgesamt ein Kollektiv aus 46 FFPE-Proben ergab, aus deren Schnittpräparaten erneut Gesamt-RNA isoliert wurde. Die Charakteristika des endgültigen Patientenkollektivs sind in Tabelle 12 und Abbildung 11 dargestellt.

Tabelle 12: Demographische und klinisch-pathologische Charakteristika des endgültigen Patientenkollektivs

Merkmal	Anzahl
Geschlecht	
männlich	14
weiblich	9
Alter (Jahre)	
50-60	7
61-70	7
71-80	7
81-89	2
Mutation	
KRAS	11
Wildtyp	12
Grading	
G1	1
G2	12
G3	9
keine Angabe (Plattenepithelkarzinom)	1
gesamt	23

In 47,83% der Proben lag ein mutiertes KRAS-Gen vor und in 52,17% der KRAS-Wildtyp (Abb. 11A). 52,17% der NSCLC-Proben wurden anhand ihres

Differenzierungsgrades als G2 eingestuft, weitere 39,13% als G3. Ein Fall wurde als G1 klassifiziert und bei einem weiteren Fall lagen keine Angaben über den Differenzierungsgrad vor. Hierbei handelte es sich um ein Plattenepithelkarzinom, welche im Allgemeinen nicht in Differenzierungsgrade eingeteilt werden (Abb. 11B). Die NSCLC wiesen verschiedene histologische Wachstumsmuster auf (Abb. 11C). In 47,83% der Fälle handelte es sich um ein vorherrschend solides Adenokarzinom, weitere 21,74% zeigten ein vorwiegend azinäres Wachstum. In 13,04% der Fälle lag hauptsächlich ein lepidisches Wachstum vor, während sich die restlichen 17,40% auf ein entdifferenziertes Plattenepithelkarzinom, einen histologischen Mischtyp und auf zwei weitere Adenokarzinome verteilten, die nicht weiter spezifiziert waren.

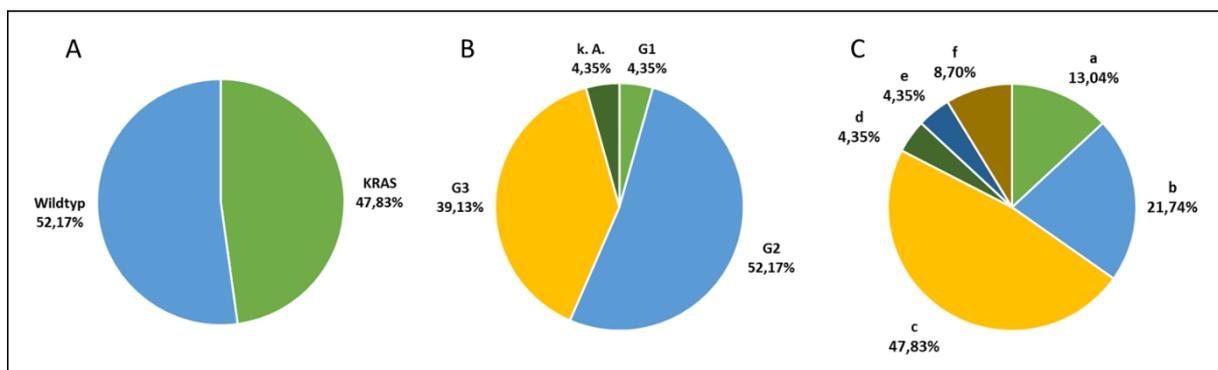


Abbildung 11: Charakterisierung des endgültigen Patientenkollektivs

Prozentuale Verteilung des KRAS-Mutationsstatus (A) des Tumorgrads (B) und des vorherrschenden Wachstumsmusters (C). a: lepidisch, b: azinär, c: solide, d: entdifferenziertes Plattenepithelkarzinom, e: Mischtyp: azinär und neuroendokrin, f: Adenokarzinom (nicht weiter spezifiziert)

3.3.2 LSD1 wird in menschlichen NSCLC-Proben überexprimiert

miRNA-200a zeigte in den Zellkulturstudien als einzige der untersuchten miRNA jeweils eine signifikante Abhängigkeit von LSD1 (Abb. 6 und 7). Nach der Qualitätskontrolle der isolierten RNA und der Auswahl des NSCLC-Probenkollektivs wurde daher der Fokus auf die Expression von miRNA-200a gelegt und ihre Assoziation mit der Expression ausgewählter EMT-Marker untersucht. Die Expression von LSD1, CDH1 und Vimentin wurde auf Proteinebene mithilfe der IHC und anschließender Pixelanalyse ermittelt. Die mRNA-Level von LSD1, miRNA-200a und der EMT-Marker CDH1 und ZEB1 wurden mittels qPCR bestimmt.

Bei der lichtmikroskopischen Begutachtung wurden die mit LSD1, CDH1 und Vimentin immunhistochemisch gefärbten Tumorgewebeschnitte unter Berücksichtigung der Farbtintensität miteinander verglichen. Sowohl CDH1 als auch Vimentin zeigten

lichtmikroskopisch keine Abhängigkeit von LSD1 (Abb. 12 und 13). CDH1 wurde im Zytoplasma und LSD1 in den Kernen der Karzinomzellen exprimiert. Vimentin wurde hauptsächlich im Zytoplasma mesenchymaler Zellen angefärbt. Vimentin-positive Karzinomzellen wurden nur vereinzelt nachgewiesen.

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen Tumorareale mit hoher und mit niedriger CDH1-Expression. Die gleichen Tumorareale wurden anschließend bezüglich ihrer LSD1- und ihrer Vimentinproteinexpression betrachtet. Abbildung 12 zeigt zwei Fälle von invasiven Adenokarzinomen mit KRAS-Mutation, deren Differenzierungsgrade als G2 eingestuft wurden. Abbildung 12A zeigt ein mäßig differenziertes Lungenadenokarzinom, bei dem der Anteil der Karzinomzellen an der Tumormasse etwa 40% betrug. In Abbildung 12B ist ein mäßig differenziertes Adenokarzinom zu sehen, bei dem die Relation der Karzinomzellen zum Tumorstroma etwa 50% betrug. Die Pfeile markieren eine markante Struktur im Gewebeschnitt und dienen der Orientierung.

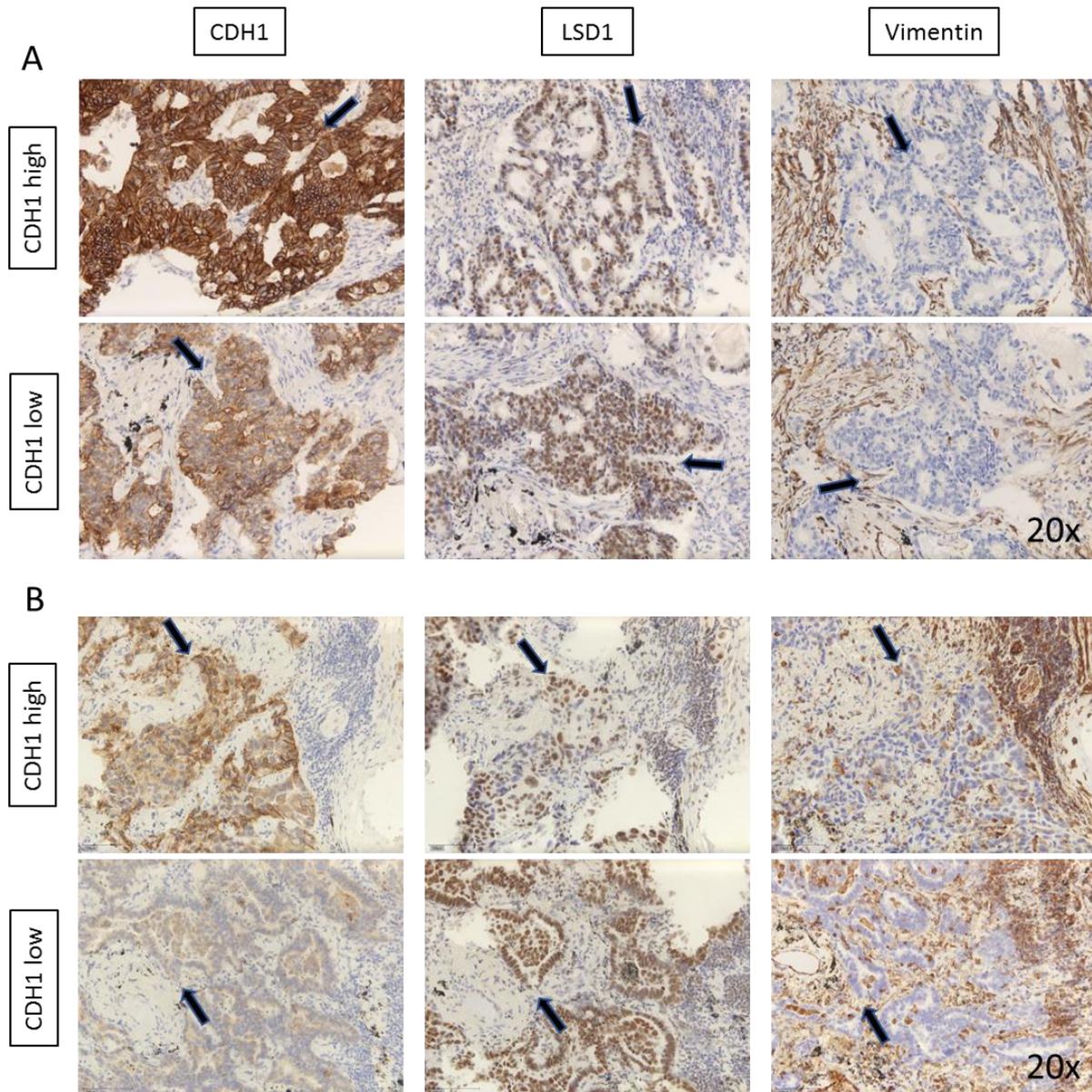


Abbildung 12: Immunhistochemische Darstellung der Expression von CDH1, LSD1 und Vimentin in tumorhaltigem Lungengewebe mit Malignitätsgrad G2

Beispielhaft ausgewählt wurden zwei als G2 klassifizierte Fälle mit nachgewiesener KRAS-Mutation. (A) Invasives Adenokarzinom mit einem Anteil an Karzinomzellen von 40%. Das vorherrschende Wachstumsmuster war nicht näher beschrieben. (B) Invasives, vorwiegend azinäres Adenokarzinom mit einem Karzinomanteil von 50%. Abgebildet sind jeweils ein Tumorareal mit hoher und ein Tumorareal mit niedriger CDH1-Expression. Die Pfeile dienen der Orientierung im dargestellten Gewebeareal. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Objektiv der 20-fachen Vergrößerung angefertigt.

In Abbildung 13 sind beispielhaft zwei Adenokarzinome mit KRAS-Mutation dargestellt, deren Differenzierungsgrade als G3 eingestuft wurden. Abbildung 13A stellt ein invasives, gering differenziertes Adenokarzinom dar, dessen Tumorgewebe einen Karzinomanteil von etwa 40% aufwies. Abbildung 13B zeigt ein invasives, gering differenziertes Adenokarzinom, bei dem der Anteil der Karzinomzellen an der Tumormasse etwa 60% betrug.

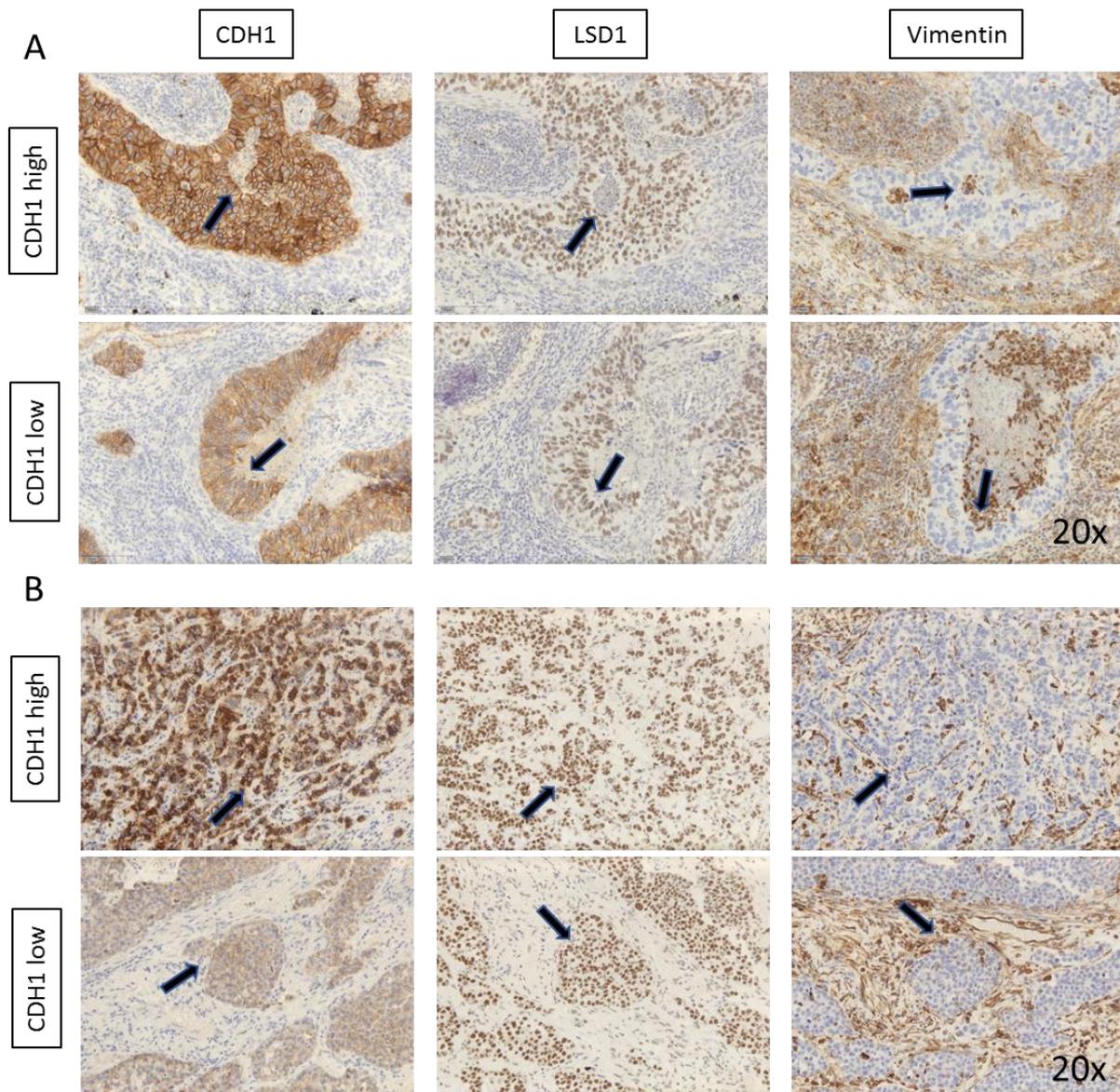


Abbildung 13: Immunhistochemische Darstellung der Expression von CDH1, LSD1 und Vimentin in tumorhaltigem Lungengewebe mit Malignitätsgrad G3

Beispielhaft ausgewählt wurden zwei als G3 klassifizierte Fälle mit nachgewiesener KRAS-Mutation. (A) Nicht invasives, vorwiegend azinäres Adenokarzinom mit einem Anteil an Tumorgewebe von 40%. (B) Invasives Adenokarzinom mit einem Tumoranteil von 60%. Das vorherrschende Wachstumsmuster war nicht näher beschrieben. Abgebildet sind jeweils ein Tumorareal mit hoher und ein Tumorareal mit niedriger CDH1-Expression. Die Pfeile dienen der Orientierung im dargestellten Gewebeareal. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Objektiv der 20-fachen Vergrößerung angefertigt.

Die morphometrische Analyse zeigte einen signifikanten, im Mittel 14-fachen Anstieg von LSD1 im Tumorgewebe (Abb. 14A). Auf mRNA-Ebene wurde allerdings nur ein Trend des LSD1-Anstiegs im Tumorbereich beobachtet (Abb. 14B). Trotzdem bestand eine Korrelation zwischen der LSD1-Expression auf Protein- und Transkriptebene, wobei diese von drei Ausreißern bestimmt wurde (Abb. 14C).

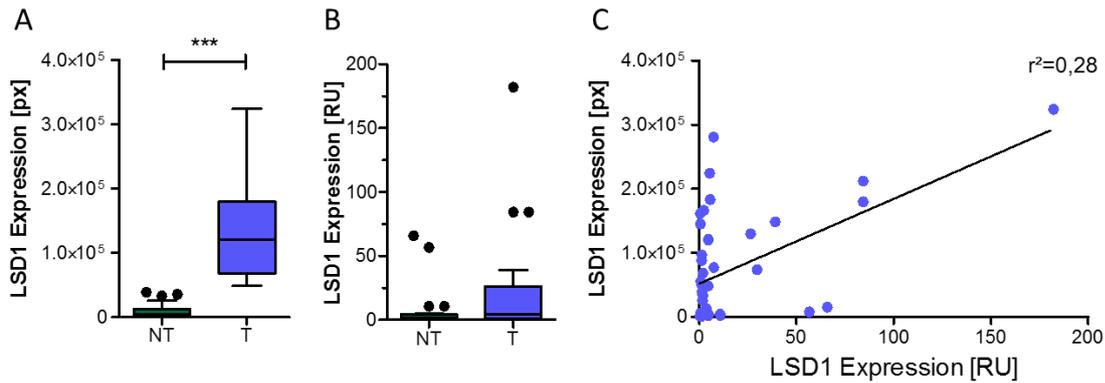


Abbildung 14: Expressionsmuster von LSD1 in menschlichen NSCLC

(A) Die Expression von LSD1 auf Proteinebene wurde mittels IHC ermittelt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt. *** $p < 0,001$ (B) Der mRNA-Level von LSD1 wurde mittels qPCR nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode bestimmt. Als Housekeeping-Gen diente dabei 18S-rRNA. Die Expression auf RNA- und Proteinebene (A, B) wurde in Box-Plot-Diagrammen zusammengefasst. (C) Die LSD1-Expression auf Proteinebene korrelierte signifikant mit dem mRNA-Level. Zur Berechnung der Signifikanz wurde die Korrelation nach Pearson verwendet. Das ergab einen p-Wert von $p = 0,0002$ und einen Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,28$.

3.3.3 Die Expression von miRNA-200a und CDH1 in Abhängigkeit von der LSD1-Expression im NSCLC

Anschließend wurde die miRNA-200a-Expression in menschlichen Tumorgewebe-proben mittels qPCR untersucht. Die Ergebnisse zeigten wie in den murinen Lungenkarzinomen (s. Kapitel 3.2) in den menschlichen Tumorgewebe-proben bei einer Hochregulation von LSD1 für miRNA-200a eine leichte Herunterregulation (Abb. 15A). Eine Korrelation von miRNA-200a mit der LSD1-Expression bestand auch hier nicht. Eine Abhängigkeit der miRNA-200a-Expression von LSD1 wie in den NSCLC-Zelllinien konnte daher nicht nachgewiesen werden.

Die Auswertung der CDH1-Färbung zeigte eine signifikante, im Mittel 3-fach erhöhte Anfärbung von CDH1 im Tumoreal, während auf mRNA-Ebene dahingehend nur eine leichte Tendenz erkennbar war (Abb. 15B und C). Für CDH1 konnte keine Korrelation zwischen der immunhistochemischen Anfärbung und der mRNA-Spiegel, die durch qPCR erhoben wurden, nachgewiesen werden. Interessanterweise korrelierte die immunhistochemische Positivität von LSD1 und CDH1 signifikant (Abb. 15D).

Die immunhistochemische Darstellung zeigte außerdem, dass Vimentin in den tumorhaltigen Gewebeproben gegenüber den tumorfreien Gewebeproben signifikant hochreguliert wurde (Abb. 15E). Bei der Mikroskopie der mit Vimentin

immunhistochemisch gefärbten Tumorgewebeschnitte konnte allerdings festgestellt werden, dass Vimentin nur vereinzelt in Karzinomzellen und vorwiegend im Zytoplasma mesenchymaler Zellen in den stromahaltigen Anteilen des Tumorgewebes exprimiert wurde (vergl. Abb. 12 und 13). Während ZEB1 in den Zelllinien und in den murinen Lungenkarzinomen entgegengesetzt zu miRNA-200a exprimiert wurde, zeigten sowohl ZEB1 als auch miRNA-200a im menschlichen Tumorgewebe gegenüber dem tumorfreien Gewebe eine leichte Herunterregulation (Abb. 15A und F). Eine Abhängigkeit zwischen der Expression von ZEB1 und LSD1, sowie zwischen miRNA-200a und CDH1 konnte daher nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls wurden keine Abhängigkeiten der untersuchten Parameter vom KRAS-Mutationsstatus der NSCLC-Proben gefunden.

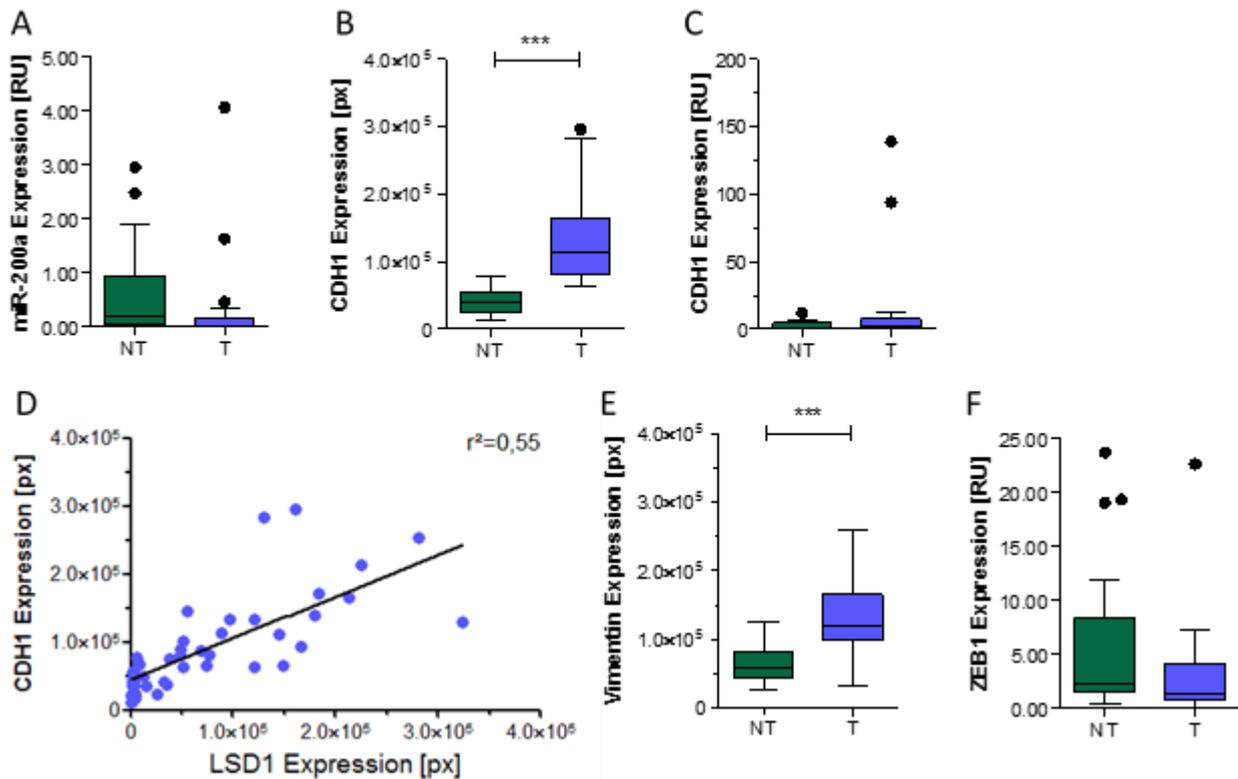


Abbildung 15: Expressionsmuster von miRNA-200a, CDH1, Vimentin und ZEB1 in menschlichen NSCLC

(A) Die Expression von miRNA-200a wurde mittels qPCR und Standardkurve ermittelt. Als Housekeeping-Gen wurde RNU6 verwendet. Die Expression von CDH1 (B) und Vimentin (E) auf Proteinebene wurde mittels IHC ermittelt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test bestimmt. *** $p < 0,001$. Die mRNA-Level von CDH1 (C) und ZEB1 (F) wurden mittels qPCR nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode bestimmt. Als Housekeeping-Gen diente dabei 18S-rRNA. (D) Die CDH1-Expression korrelierte signifikant mit der LSD1-Expression auf Proteinebene. $r^2=0,55$; $p < 0,0001$. Zur Berechnung der Signifikanz wurde die Korrelation nach Pearson verwendet. Die Punkte markieren den Mittelwert der biologischen Replikate einer Probe. Die Expression auf RNA- und Proteinebene (A, B, C, E, F) wurde in Box-Plot-Diagrammen zusammengefasst.

4. Diskussion

LSD1 und seine Zieldomänen sind in maßgeblichem Umfang an verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt. Neben der Funktion in der embryonalen Entwicklung kommt LSD1 auch eine besondere Rolle bei Wachstum und Metastasierung von Tumorzellen zu. In der vorgelegten Studie wurde der Einfluss von LSD1 auf ausgewählte miRNA und EMT-Marker im NSCLC an verschiedenen Zelllinien, einem murinen Lungenkarzinommodell und in menschlichen NSCLC-Proben untersucht.

4.1 Die LSD1-Expression wird in humanen NSCLC hochreguliert

In der hier vorgelegten Arbeit wurde gezeigt, dass LSD1 in menschlichen NSCLC überexprimiert wird. Während sich in der qPCR ein Trend zur Überexpression der LSD1-mRNA zeigte (Abb. 14B), konnte in der IHC eine signifikante Akkumulation des LSD1-Proteins nachgewiesen werden (Abb. 14A).

In vorangegangenen Studien wurden die Überexpression und der onkogene Effekt von LSD1 im Adenokarzinom der Lunge bereits dargelegt [60-62]. Andere Studien haben die Expression von LSD1 in weiteren Tumorentitäten beschrieben. So wurde eine Überexpression von LSD1 bereits im Prostatakarzinom [57], Mammakarzinom [58], Endometriumkarzinom [97], SCLC [59], hepatozellulärem Karzinom [98], Kolonkarzinom [59, 99], Blasenkarzinom [59, 100], Ösophaguskarzinom [101, 102], in Leukämien [103] und in verschiedenen Sarkomen [104] beschrieben.

Im menschlichen NSCLC korrelierte der LSD1-Proteingehalt nur in geringem Maße mit dem mRNA-Gehalt, was hauptsächlich von drei statistisch identifizierten Ausreißern bestimmt wurde (Abb. 14C). Diese Diskrepanz zwischen Protein- und mRNA-Level wurde ebenso an der CDH1-Expression festgestellt.

Eine mögliche Ursache dafür können posttranslationale Modifikationen sein, durch die Proteine stark reguliert werden können. Eine besondere Rolle bei der Akkumulierung von LSD1 spielt dabei die Blockade der Ubiquitinierung bzw. der Deubiquitinierung im Rahmen von Protein-Abbauprozessen [105-107].

Weiterhin ist bekannt, dass auch eine posttranskriptionale Regulierung an der mRNA stattfindet. Eine besondere Bedeutung kommt dabei den miRNA zu. Die Nukleotide 2-8 bilden die Seed-Region am 5'-Ende der miRNA, mit der sie komplementär an das 3'-Ende, seltener auch an das 5'-Ende der mRNA bindet und so den Abbau der mRNA

bewirkt oder ihre Translation unterdrückt [67, 73, 108, 109]. So wurde bereits mehrfach beschrieben, dass das LSD1-Gen z.B. im Neuroblastom als ein direktes Zielgen von miRNA-137 herunterreguliert wird [74, 110]. Zhang et al. berichteten kürzlich über den Zusammenhang von miRNA-137 und LSD1 im NSCLC, wobei die Hochregulation von miRNA-137 eine Herunterregulation von LSD1 in der qPCR und im Westernblot ergab [76].

Dass miRNA die LSD1-Expression in direkter Weise beeinflussen, wurde bereits mehrfach belegt. Unbekannt ist bisher, ob LSD1 ebenfalls die Expression von miRNA regulieren kann. Daher habe ich in meiner Arbeit die Expression von miRNA-15b, -16-2, -143 und -200a in Abhängigkeit von LSD1 untersucht.

4.2 LSD1 und sein Einfluss auf die EMT im NSCLC

Von den untersuchten miRNA zeigte miRNA-200a in Abhängigkeit von der LSD1-Expression in NSCLC-Zelllinien ein verändertes Expressionsmuster. In der Zelllinie A549 war miRNA-200a in den mit Flag-LSD1 stabil transduzierten Zellen unter dem Einfluß von überexprimiertem LSD1 ebenfalls hochreguliert (Abb. 6). In den H1975-Zellen, welche mit shLSD1 stabil transduziert wurden, wurde sowohl LSD1 als auch miRNA-200a herunterreguliert. Insgesamt konnten in den NSCLC repräsentierenden Zellkultursystemen mit modifizierter LSD1-Expression Hinweise gesammelt werden, dass miRNA-200a von der LSD1-Expression beeinflusst wird. Es ist bekannt, dass LSD1 die EMT fördert [51], während die Mitglieder der miRNA-200-Familie die Herunterregulation der zentralen EMT-Mediatoren ZEB1 und ZEB2 bewirken und damit die EMT inhibieren [82]. Daher wäre eher eine entgegengesetzte Abhängigkeit zwischen LSD- und miRNA-200a-Expression zu erwarten. In den Zelllinien H460 und PC9, die ebenfalls mit shLSD1 stabil transduziert wurden und eine verminderte LSD1-Expression zeigten [61], konnte keine Korrelation von miRNA-200a mit LSD1 nachgewiesen werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse in der Zellkultur auf eine Regulation der EMT-Signalwege hin, die zwar von LSD1 beeinflusst werden, aber wahrscheinlich von anderen, möglicherweise dominanteren Parametern abhängen könnten.

In den murinen und menschlichen Tumorproben dagegen wurde miRNA-200a bei Hochregulation von LSD1 tendenziell herunterreguliert. Obwohl sich hier keine signifikante negative Korrelation von miRNA-200a und LSD1 zeigte (Abb. 8B, 15A), geben diese Ergebnisse erste Hinweise, dass die miRNA-200a-Expression im NSCLC

unter dem epigenetischen Einfluss von LSD1 steht. Raponi et al. haben die miRNA-200a-Expression im Plattenepithelkarzinom der Lunge beschrieben. Die Autoren zeigten, dass miRNA-200a im Vergleich zum korrespondierenden normalen Lungengewebe in Plattenepithelkarzinomen etwa 1,2-fach hochreguliert wird [111]. Zhen et al. wiesen nach, dass miRNA-200a in verschiedenen NSCLC-Zelllinien, so auch in der Zelllinie H1975, herunterreguliert wird und eine Reexpression Migration und Invasion der Tumorzellen inhibiert [112].

miRNA-200a wird in vielen weiteren menschlichen Krebsarten dysreguliert [113]. Verschiedene Studien deuten jedoch an, dass die Funktion von miRNA-200a in Abhängigkeit von der Tumorart variiert [114]. miRNA-200a gehört zur miRNA-200-Familie, deren Mitglieder als Inhibitoren von EMT, Tumorzellinvasion und Metastasierung häufig während der Tumorprogression herunterreguliert werden [82, 113]. Es wurde mehrfach gezeigt, dass die Expression aller Mitglieder der miRNA-200-Familie stark mit Tumorzellen mit epithelialen Eigenschaften assoziiert ist [82]

Die Daten von Zhen et al. entsprechen daher der allgemeinen Ansicht, dass die miRNA-200/ZEB-Achse maßgeblich die epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften von Zellen beeinflusst [82] und miRNA-200-Spezies in Tumoren meist vermindert exprimiert werden [82, 113]. Eine solche im Tumor verminderte miRNA-200-Expression führt zur erhöhten Expression von ZEB1 und so zur Reduktion der epithelialen Zelleigenschaften von Tumorzellen [82]. Die vorgestellte Studie an NSCLC von Zhen et al. wurde allerdings unabhängig vom LSD1-Expressionsstatus durchgeführt [112]. Eine Regulierung von miRNA-200a durch LSD1 wurde bisher nicht beschrieben. Zieht man jedoch in Betracht, dass LSD1 im NSCLC stark hochreguliert wird (Abb. 14A und B) [61], bestätigt die Studie von Zhen et al. die eigenen Beobachtungen einer verminderten miRNA-200a-Expression bei erhöhter LSD1-Expression.

Nachdem in dieser Studie in NSCLC eine verminderte miRNA-200a-Expression festgestellt werden konnte, wurde anschließend die Expression der EMT-Marker CDH1, ZEB1 und Vimentin untersucht. Die Mikroskopie der immunhistochemisch gefärbten Präparate ergab, dass CDH1 ausschließlich in den epithelialen Anteilen, so auch in den Karzinomzellen der Gewebeschnitte exprimiert wurde. Innerhalb der einzelnen Tumore war die Protein-Expression von CDH1 jedoch nicht konstant. Es fanden sich jeweils Tumorareale mit unterschiedlicher Ausprägung der CDH1-Färbung

(s. Abb. 12 und 13). Insgesamt legen die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen der Tumorgewebeprobe eine signifikant vermehrte Expression von CDH1 im Tumorbereich gegenüber den Gewebearealen ohne Tumor dar. Die ausgeprägte CDH1-Expression korrelierte positiv mit dem LSD1-Protein. Auch auf mRNA-Ebene konnte in der Tendenz eine Hochregulation verzeichnet werden. Wie die qPCR ergab, wurde in den murinen Adenokarzinomen die CDH1-Expression ebenfalls hochreguliert.

CDH1 ist ein Transmembranglykoprotein, das in epithelialen Zellen exprimiert wird. Es ist maßgeblich an der Aufrechterhaltung der epithelialen Eigenschaften einer Zelle beteiligt und fungiert als Repressor von EMT, Invasion und Metastasierung [88]. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit vorgelegten Daten, weist CDH1 in verschiedenen Tumorentitäten entsprechend der EMT-fördernden Funktion von LSD1 [51] eine negative Korrelation zur LSD1-Expression und zu späten Tumorstadien auf [115-117]. Auch steht die in meiner Arbeit ermittelte starke CDH1-Expression im NSCLC-Tumorareal im Gegensatz zu den tumorassoziierten verminderten miRNA-200a-Spiegeln. Die Daten von Li et al. stützen ebenfalls frühere Berichte, dass in Karzinomen Epithelzellen nur vermindert CDH1 exprimieren. Die Autoren konnten nachweisen, dass LSD1 den H3K4me2-Level an der Promotorregion von CDH1 in Ovarialkarzinom-Zellen reduziert und die CDH1-Expression dadurch vermindert [117].

Eine mögliche Ursache für die hier gefundene signifikante Überexpression von CDH1 im Tumorgewebe ist der Anteil der epithelialen Zellen am Probenmaterial. Der Anteil der Epithelzellen im Tumorgewebe übersteigt den der Epithelzellen in den korrespondierenden gesunden Lungengewebeprobe. Daher könnte sich die hier gezeigte erhöhte Transkript- und Proteinexpression von CDH1 in NSCLC in einer Verdichtung der Tumorepithelzellen gegenüber den Epithelzellen im gesunden Lungengewebe begründen. Dies könnte die vermehrte CDH1-Detektion in den Tumorproben (s. Abb. 12 und 13) erklären.

ZEB1 zeigte in beiden H460-Klonen eine Herunterregulation, während es in den PC9-Zellen nicht messbar war. In den H1975-Zellen wurde dagegen eine Hochregulation beobachtet (Abb. 7). Auch in den murinen Adenokarzinomen wurde ZEB1 vermehrt exprimiert (Abb. 8C).

Der Transkriptionsfaktor ZEB1 gehört zur ZEB-Familie, deren Mitglieder durch direkte Bindung an die E-Box der Promotorregion die Expression von CDH1 inhibieren [82,

118]. Die ZEB-Faktoren wiederum sind direkte Zielgene aller Mitglieder der miRNA-200-Familie [82]. Eine Hochregulation von miRNA-200-Spezies fördert über die Repression der ZEB-Familie die Expression von CDH1 und folglich den epithelialen Status der Zelle [82, 118]. In den Zelllinien und in den murinen NSCLC-Proben wies somit auch ZEB1 ein entgegengesetztes Expressionsmuster zu miRNA-200a auf. In den menschlichen NSCLC dagegen wurde ZEB1 tendenziell herunterreguliert (Abb. 15J).

Während der Entwicklung der Hirnanhangdrüse rekrutiert der LSD1-CoREST-Komplex ZEB1, um die postpartale Expression von Wachstumshormon in laktotropen Zellen zu regulieren [119]. Ob dieser Komplex auch im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen existiert, wurde bisher nicht beschrieben. Der LSD1-CoREST-Komplex interagiert allerdings in verschiedenen Zelllinien mit dem Transkriptionsfaktor Snai1 und inhibiert so direkt die Expression von CDH1 und folglich die EMT (Abb. 4) [92].

Der Zinkfingerfaktor Snai1 induziert die EMT über die Regulation von ZEB1 und ZEB2 (Abb. 4) [82]. Bestimmte Zytokine wie TGF- β stimulieren die Expression von Snai1 und fördern somit die Expression der ZEB-Familie [82]. Dadurch wird die Expression von CDH1 gehemmt, was die Transition der epithelialen Zellen hin zu einem mesenchymalen Phänotyp bewirkt [82, 120]. Ein Kennzeichen mesenchymaler Zellen ist die Expression des EMT-Markers Vimentin [121].

Die lichtmikroskopische Begutachtung der menschlichen Lungengewebeschnitte hat gezeigt, dass Vimentin hauptsächlich in mesenchymalen Zellen des Tumorstromas exprimiert wurde. Die die Karzinomzellen umgebenden Stromazellen setzen sich zusammen aus mesenchymalen, Vimentin exprimierenden Zellen wie Fibroblasten, unterschiedlichen Immunzellen, Endothelzellen und Perizyten, die zusammen mit extrazellulärer Matrix (EZM), Lymph- und Blutgefäßen das *Tumormicroenvironment* bilden [122-124].

Während im Stromaanteil der menschlichen NSCLC eine starke Vimentin-Expression nachgewiesen werden konnte, fanden sich in den Tumorebenen der humanen NSCLC-Proben keine oder selten nur vereinzelte Vimentin-positive Zellen (Abb. 12 und 13). Ein Vimentin-negativer Tumor schließt jedoch eine EMT nicht aus, da diese nicht notwendigerweise von der Vimentin-Expression abhängig ist [125, 126].

Vimentin ist als Typ-3-Intermediärfilament Bestandteil des Zytoskeletts und wird ubiquitär im Zytoplasma mesenchymaler Zellen exprimiert, wo es für den Erhalt von Zytoarchitektur und Gewebestabilität sorgt [126-128]. Während Vimentin in normalen Epithelzellen nicht vorkommt, wird es in Fibroblasten, Neutrophilen, Lymphozyten, Makrophagen und Endothelzellen stark exprimiert [127].

Obwohl die NSCLC-Zellen mit einer hohen LSD1-Expression nur vereinzelt den EMT-Marker Vimentin exprimierten, konnte Vimentin bereits als ein direktes Zielgen von LSD1 identifiziert werden. Allerdings sind die bisher publizierten Studien widersprüchlich. So wiesen Liu et al. nach, dass eine Überexpression von LSD1 in Zervixkarzinom-Zelllinien zur Reduktion der CDH1-Expression und zum Anstieg der Vimentin-Expression führt [129]. Jin et al. stellten dagegen fest, dass ein LSD1-knock-down zu einem Anstieg der Vimentin-Expression in HCT116-Zellen führt [130].

Verschiedene Studien haben jedoch gezeigt, dass die Expression von Vimentin in epithelialen Tumoren mit einer schlechten Differenzierung, Invasion und Metastasierung assoziiert ist [131-136]. Tadokoro et al. identifizierten Vimentin als prädiktiven Marker für eine schlechte Prognose im NSCLC und zeigten, dass die Vimentinexpression in verschiedenen NSCLC-Zelllinien mit der Fähigkeit zur Invasion assoziiert ist [137].

Die immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte zeigen in der Lichtmikroskopie fast keine oder nur selten vereinzelte Vimentin-positive Karzinomzellen. Allerdings ist im Vergleich zu den tumorfreen Präparaten in den Tumorgewebeproben nicht nur eine starke Zunahme epithelialer Tumorzellen zu verzeichnen, sondern auch ein starker Anstieg von Stromazellen. Weiterhin hat die lichtmikroskopische Untersuchung ergeben, dass die Relation zwischen Karzinom- und Stromazellen in den einzelnen Proben sehr variabel ist. Der Anteil der Karzinomzellen am Tumorgewebe bewegt sich in einer Spannweite von 30-80%.

Die RNA der Patientenproben wurde aus makrodissektierten Tumorgewebeschnitten extrahiert, weshalb in manchen der Proben mit einem hohen Anteil an RNA zu rechnen ist, der aus mesenchymalen Zellen aus dem Tumorstroma stammt. Um dieser Problematik Rechnung zu tragen, erscheint die Lasermikrodissektion, bei der die Karzinomzellen unter Aussparung des Stromazellanteils präzise aus dem Tumorgewebe gewonnen werden können, eine geeignetere Methode für zukünftige Untersuchungen zu sein.

Zusammenfassend bestätigt die vorgelegte Studie eine erhöhte Expression von LSD1 in murinen und in menschlichen NSCLC-Proben und unterstreicht damit die LSD1-Funktion in der NSCLC-Progression. Bei der Untersuchung des Einflusses von LSD1 auf ausgewählte miRNA im NSCLC zeigte ausschließlich miRNA-200a in A549- und H1975-Zellen eine Abhängigkeit von der LSD1-Expression. In den murinen und den menschlichen Tumorproben konnte dieser Zusammenhang nicht nachgewiesen werden.

Sowohl in den Zelllinien H460 und H1975 als auch in den murinen Tumorproben zeigte ZEB1 ein reziprokes Expressionsmuster zu miRNA-200a. Die wechselseitige Regulation von ZEB1 und miRNA-200a ist bereits bekannt und konnte in dieser Arbeit im NSCLC bestätigt werden. Ob LSD1 einen direkten Einfluss auf die Expression von miRNA-200a nimmt und damit die EMT im NSCLC reguliert, konnte nicht abschließend geklärt werden und erfordert weitere Untersuchungen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden an bereits länger vorliegendem Probenmaterial durchgeführt. Insbesondere die in Paraffin eingebetteten Patientenproben waren vor den Untersuchungen zum Teil mehrere Jahre archiviert, was die Qualität der gewonnenen RNA beeinträchtigen kann. Eine Studie an frisch gewonnenem Lungengewebe mit größerem Stichprobenumfang von murinen und menschlichen Proben könnte genauere Erkenntnisse erbringen. Unter Einsatz der Lasermikrodissektion könnten die Untersuchungen spezifisch an Epithel- bzw. an Karzinomzellen durchgeführt werden und präzisere Ergebnisse liefern.

5. Zusammenfassung

Das Lungenkarzinom ist die führende Krebstodesursache weltweit. In etwa 85% der Lungenkrebsfälle liegt ein nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC) vor. Eine späte Diagnose, Resistenzbildung und das Auftreten von Rezidiven erweisen sich dabei häufig als eine besondere Herausforderung in der Therapie. Trotz verbesserter Diagnostik und neuer Therapieverfahren ist die relative 5-Jahresüberlebensrate mit 18% immer noch gering. Die Entwicklung neuer therapeutischer Verfahren ist daher ein wichtiger Gegenstand aktueller Forschung.

Die lysin-spezifische Demethylase 1 (LSD1) demethyliert Lysin 4 und 9 an Histon 3 (H3K4 und H3K9) und aktiviert oder unterdrückt dadurch die Gentranskription. LSD1 ist in vielen Krebstypen überexprimiert. Ein Zusammenhang zwischen LSD1 und der Expression von Micro-RNA (miRNA) wurde bislang jedoch nicht gezeigt. miRNA sind kleine, nicht-proteinkodierende RNA, die maßgeblich in die Genexpression eingreifen, indem sie posttranskriptionell die Proteinsynthese hemmen.

Die Untersuchungen zur miRNA in Abhängigkeit von der LSD1-Expression wurden zunächst aus verschiedenen humanen NSCLC-Zelllinien mit unterschiedlichem Mutationsstatus und modifizierter LSD1-Expression durchgeführt. Daneben wurden native Lungengewebe von genetischen NSCLC-Mausmodellen herangezogen sowie Schnittmaterial von 23 formalinfixierten und paraffineingebetteten, humanen Gewebeproben, von denen sowohl NSCLC-Präparate als auch die korrespondierenden Nicht-Tumor-Präparate zur Verfügung standen, untersucht.

In den Tumorproben des Patientenkollektivs konnte mittels Immunhistochemie auf Proteinebene eine signifikante Überexpression von LSD1 nachgewiesen werden. Auf mRNA-Ebene wurde die LSD1-Expression mittels qPCR analysiert, wobei auch hier ein Trend zur erhöhten LSD1-Expression im NSCLC-Gewebe nachweisbar war. Bei der Untersuchung des Einflusses von LSD1 auf die Expression verschiedener ausgewählter miRNA zeigte lediglich miRNA-200a in A549-Zellen eine signifikante Abhängigkeit von der LSD1-Expression. miRNA-200a ist als Mitglied der miRNA-200-Familie ein Repressor der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) und so wurde die Expression von ZEB1, E-Cadherin (CDH1) und Vimentin als EMT-Marker vertiefend untersucht. Die wechselseitige Regulation von ZEB1 und miRNA-200a konnte in dieser Arbeit im NSCLC bestätigt werden.

Ob LSD1 einen direkten Einfluss auf die Expression von miRNA-200a nimmt und damit die EMT im NSCLC reguliert, konnte allerdings nicht abschließend geklärt werden und erfordert weitere Untersuchungen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologische Subtypen des Lungenkarzinoms.....	- 12 -
Abbildung 2: Aufbau und Funktion von LSD1	- 18 -
Abbildung 3: Mechanismus der miRNA-Biogenese.....	- 19 -
Abbildung 4: Der Einfluss von miRNA-200-Familie, ZEB1 und CDH1 auf die EMT	- 21 -
Abbildung 5: Eine transgene KRAS-Expression nach adenoviraler Cre-Applikation führt zur Induktion von Lungenkarzinomen	- 33 -
Abbildung 6: Der LSD1-Level beeinflusst die Expression von miRNA-200a in A549-Zellen..	- 41 -
Abbildung 7: Der Einfluss des LSD1-Gehalts auf die Expression von miRNA200a und ZEB1 in verschiedenen NSCLC-Zelllinien	- 42 -
Abbildung 8: Expressionsmuster von LSD1, der miRNA und der EMT-Marker im murinen Lungenkarzinom-Modell	- 44 -
Abbildung 9: ZEB1-Expression in Abhängigkeit von LSD1- und CDH1-Expression.....	- 45 -
Abbildung 10: Ct-Werte von RNU6, 18S-rRNA und der miRNA nach qPCR aus FFPE-Proben eines vorläufigen Patientenkollektivs.....	- 46 -
Abbildung 11: Charakterisierung des endgültigen Patientenkollektivs.....	- 48 -
Abbildung 12: Immunhistochemische Darstellung der Expression von CDH1, LSD1 und Vimentin in tumorhaltigem Lungengewebe mit Malignitätsgrad G2.....	- 50 -
Abbildung 13: Immunhistochemische Darstellung der Expression von CDH1, LSD1 und Vimentin in tumorhaltigem Lungengewebe mit Malignitätsgrad G3.....	- 52 -
Abbildung 14: Expressionsmuster von LSD1 in menschlichen NSCLC	- 53 -
Abbildung 15: Expressionsmuster von miRNA-200a, CDH1, Vimentin und ZEB1 in menschlichen NSCLC	- 55 -

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Software.....	- 23 -
Tabelle 2: Geräte.....	- 24 -
Tabelle 3: Kits und Assays.....	- 25 -
Tabelle 4: Primer, die für die qPCR aus den Zelllinien verwendet wurden	- 26 -
Tabelle 5: Primer, die für die qPCR aus Mauslunge verwendet wurden	- 26 -
Tabelle 6: Primer, die für die qPCR aus FFPE-Gewebe verwendet wurden	- 27 -
Tabelle 7: miRNA-Primer, die für die qPCR aus Zellkultur, Mauslunge und FFPE-Gewebe verwendet wurden	- 27 -
Tabelle 8: Antikörper, die für die Immunhistochemie verwendet wurden.....	- 28 -
Tabelle 9: Chemikalien und Reagenzien.....	- 29 -
Tabelle 10: humane LUAD Zelllinien.....	- 31 -
Tabelle 11: Zusammensetzung des Mastermixes und das Gesamtvolumen einer qPCR (µl) -	37 -
Tabelle 12: Demographische und klinisch-pathologische Charakteristika des endgültigen Patientenkollektivs	- 47 -

8. Literaturverzeichnis

1. Pikor, LA, Ramnarine VR, Lam Sand Lam WL (2013). Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer*. 82(2): p. 179-89.
2. Fitzmaurice, C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, Allen C, Hansen G, Woodbrook R, Wolfe C, Hamadeh RR, Moore A, Werdecker A, Gessner BD, Te Ao B, McMahon B, Karimkhani C, Yu C, Cooke GS, Schwebel DC, Carpenter DO, Pereira DM, Nash D, Kazi DS, De Leo D, Plass D, Ukwaja KN, Thurston GD, Yun Jin K, Simard EP, Mills E, Park EK, Catala-Lopez F, deVeber G, Gotay C, Khan G, Hosgood HD, 3rd, Santos IS, Leasher JL, Singh J, Leigh J, Jonas JB, Sanabria J, Beardsley J, Jacobsen KH, Takahashi K, Franklin RC, Ronfani L, Montico M, Naldi L, Tonelli M, Geleijnse J, Petzold M, Shrimme MG, Younis M, Yonemoto N, Breitborde N, Yip P, Pourmalek F, Lotufo PA, Esteghamati A, Hankey GJ, Ali R, Lunevicius R, Malekzadeh R, Dellavalle R, Weintraub R, Lucas R, Hay R, Rojas-Rueda D, Westerman R, Sepanlou SG, Nolte S, Patten S, Weichenthal S, Abera SF, Fereshtehnejad SM, Shiue I, Driscoll T, Vasankari T, Alsharif U, Rahimi-Movaghar V, Vlassov VV, Marcenes WS, Mekonnen W, Melaku YA, Yano Y, Artaman A, Campos I, MacLachlan J, Mueller U, Kim D, Trillini M, Eshrati B, Williams HC, Shibuya K, Dandona R, Murthy K, Cowie B, Amare AT, Antonio CA, Castaneda-Orjuela C, van Gool CH, Violante F, Oh IH, Deribe K, Soreide K, Knibbs L, Kereselidze M, Green M, Cardenas R, Roy N, Tillmann T, Li Y, Krueger H, Monasta L, Dey S, Sheikhbahaei S, Hafezi-Nejad N, Kumar GA, Sreeramareddy CT, Dandona L, Wang H, Vollset SE, Mokdad A, Salomon JA, Lozano R, Vos T, Forouzanfar M, Lopez A, Murray Cand Naghavi M (2015). The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol*. 1(4): p. 505-27.
3. Deutschland, SB (2015). Die 10 häufigsten Todesursachen. Wiesbaden: 2015. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HaeufigsteTodesursachen.html>; Stand: 27.10.2017.
4. Deutschland., SB (2015). Die 10 häufigsten Todesfälle durch Krebs. Wiesbaden: 2015, https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Sterbefaelle_KrebsInsgesamt.html; Stand: 27.10.2015.
5. Institut", RK (Berlin, 2016.). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.
6. (Hrsg.):, DK (Heidelberg, 2005). Passivrauchen – ein unterschätztes Gesundheitsrisiko.
7. Krewski, D, Lubin JH, Zielinski JM, Alavanja M, Catalan VS, Field RW, Klotz JB, Letourneau EG, Lynch CF, Lyon JI, Sandler DP, Schoenberg JB, Steck DJ, Stolwijk JA, Weinberg Cand Wilcox HB (2005). Residential radon and risk of lung cancer: a combined analysis of 7 North American case-control studies. *Epidemiology*. 16(2): p. 137-45.
8. IARC (2012). IARC: diesel engine exhaust carcinogenic. *Cent Eur J Public Health*. 20(2): p. 120, 138.
9. Boffetta, P (2006). Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat Res*. 608(2): p. 157-62.
10. Hayes, RB (1997). The carcinogenicity of metals in humans. *Cancer Causes Control*. 8(3): p. 371-85.
11. Nielsen, LS, Baelum J, Rasmussen J, Dahl S, Olsen KE, Albin M, Hansen NCand Sherson D (2014). Occupational asbestos exposure and lung cancer--a systematic review of the literature. *Arch Environ Occup Health*. 69(4): p. 191-206.
12. Matakidou, A, Eisen Tand Houlston RS (2005). Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer*. 93(7): p. 825-33.
13. Sinha, R, Kulldorff M, Curtin J, Brown CC, Alavanja MCand Swanson CA (1998). Fried, well-done red meat and risk of lung cancer in women (United States). *Cancer Causes Control*. 9(6): p. 621-30.
14. Alberg, AJ, Brock MV, Ford JG, Samet JMand Spivack SD (2013). Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 143(5 Suppl): p. e1S-e29S.
15. Aoki, K (1993). Excess incidence of lung cancer among pulmonary tuberculosis patients. *Jpn J Clin Oncol*. 23(4): p. 205-20.
16. Cheng, YW, Chiou HL, Sheu GT, Hsieh LL, Chen JT, Chen CY, Su JMand Lee H (2001). The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res*. 61(7): p. 2799-803.
17. Siegel, RL, Miller KDand Jemal A (2017). Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 67(1): p. 7-30.
18. Spiro, SG, Gould MKand Colice GL (2007). Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 132(3 Suppl): p. 149s-160s.

19. Horeweg, Nand de Koning H (2014). The importance of screening for lung cancer. *Expert Rev Respir Med.* 8(5): p. 597-614.
20. Koyi, H, Hillerdal Gand Branden E (2002). Patient's and doctors' delays in the diagnosis of chest tumors. *Lung Cancer.* 35(1): p. 53-7.
21. Walter, FM, Rubin G, Bankhead C, Morris HC, Hall N, Mills K, Dobson C, Rintoul RC, Hamilton Wand Emery J (2015). Symptoms and other factors associated with time to diagnosis and stage of lung cancer: a prospective cohort study. *Br J Cancer.* 112 Suppl 1: p. S6-13.
22. Hamilton, W, Peters TJ, Round Aand Sharp D (2005). What are the clinical features of lung cancer before the diagnosis is made? A population based case-control study. *Thorax.* 60(12): p. 1059-65.
23. Latimer, K Mand Mott TF (2015). Lung cancer: diagnosis, treatment principles, and screening. *Am Fam Physician.* 91(4): p. 250-6.
24. Paraschiv, B, Diaconu CC, Toma CLand Bogdan MA (2015). Paraneoplastic syndromes: the way to an early diagnosis of lung cancer. *Pneumologia.* 64(2): p. 14-9.
25. Silvestri, GA, Littenberg Band Colice GL (1995). The clinical evaluation for detecting metastatic lung cancer. A meta-analysis. *Am J Respir Crit Care Med.* 152(1): p. 225-30.
26. Riihimaki, M, Hemminki A, Fallah M, Thomsen H, Sundquist K, Sundquist Jand Hemminki K (2014). Metastatic sites and survival in lung cancer. *Lung Cancer.* 86(1): p. 78-84.
27. Sherwood, J, Dearden S, Ratcliffe Mand Walker J (2015). Mutation status concordance between primary lesions and metastatic sites of advanced non-small-cell lung cancer and the impact of mutation testing methodologies: a literature review. *J Exp Clin Cancer Res.* 34: p. 92.
28. Onkologie, L (2018). S3-Leitlinie Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. AWMF online.
29. Lemjabbar-Alaoui, H, Hassan OU, Yang YWand Buchanan P (2015). Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta.* 1856(2): p. 189-210.
30. Wittekind, C (2017). TNM: Klassifikation maligner Tumoren. Wiley.
31. Bohle, R Mand Schnabel PA (2016). [Grading of lung cancer]. *Pathologe.* 37(4): p. 314-9.
32. Travis, WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MSand Wistuba I (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol.* 10(9): p. 1243-1260.
33. D'Amico, D, Carbone D, Mitsudomi T, Nau M, Fedorko J, Russell E, Johnson B, Buchhagen D, Bodner S, Phelps Rand et al. (1992). High frequency of somatically acquired p53 mutations in small-cell lung cancer cell lines and tumors. *Oncogene.* 7(2): p. 339-46.
34. George, J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretic L, Kong G, Leenders F, Lu X, Fernandez-Cuesta L, Bosco G, Muller C, Dahmen I, Jahchan NS, Park KS, Yang D, Karnezis AN, Vaka D, Torres A, Wang MS, Korbelt JO, Menon R, Chun SM, Kim D, Wilkerson M, Hayes N, Engelmann D, Putzer B, Bos M, Michels S, Vlasic I, Seidel D, Pinther B, Schaub P, Becker C, Altmüller J, Yokota J, Kohno T, Iwakawa R, Tsuta K, Noguchi M, Muley T, Hoffmann H, Schnabel PA, Petersen I, Chen Y, Soltermann A, Tischler V, Choi CM, Kim YH, Massion PP, Zou Y, Jovanovic D, Kontic M, Wright GM, Russell PA, Solomon B, Koch I, Lindner M, Muscarella LA, la Torre A, Field JK, Jakopovic M, Knezevic J, Castanos-Velez E, Roz L, Pastorino U, Brustugun OT, Lund-Iversen M, Thunnissen E, Kohler J, Schuler M, Botling J, Sandelin M, Sanchez-Cespedes M, Salvesen HB, Achter V, Lang U, Bogus M, Schneider PM, Zander T, Ansen S, Hallek M, Wolf J, Vingron M, Yatabe Y, Travis WD, Nurnberg P, Reinhardt C, Perner S, Heukamp L, Buttner R, Haas SA, Brambilla E, Peifer M, Sage Jand Thomas RK (2015). Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature.* 524(7563): p. 47-53.
35. Iwakawa, R, Kohno T, Totoki Y, Shibata T, Tsuchihara K, Mimaki S, Tsuta K, Narita Y, Nishikawa R, Noguchi M, Harris CC, Robles AI, Yamaguchi R, Imoto S, Miyano S, Totsuka H, Yoshida T and Yokota J (2015). Expression and clinical significance of genes frequently mutated in small cell lung cancers defined by whole exome/RNA sequencing. *Carcinogenesis.* 36(6): p. 616-21.
36. Chatziandreou, I, Tsioli P, Sakellariou S, Mourkioti I, Giannopoulou I, Levidou G, Korkolopoulou P, Patsouris Eand Saetta AA (2015). Comprehensive Molecular Analysis of NSCLC; Clinicopathological Associations. *PLoS One.* 10(7): p. e0133859.
37. Horn, Land Pao W (2009). EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 27(26): p. 4232-5.
38. Zhou, C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu XQ, Wang C, Zhang S, Wang J, Zhou S, Ren S, Lu S, Zhang L, Hu C, Luo Y, Chen L, Ye M, Huang J, Zhi X, Zhang Y, Xiu Q, Ma Jand You C (2011). Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-

- positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 12(8): p. 735-42.
39. Maemondo, M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isoke H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, Yoshimori K, Harada T, Ogura T, Ando M, Miyazawa H, Tanaka T, Saijo Y, Hagiwara K, Morita Sand Nukiwa T (2010). Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med.* 362(25): p. 2380-8.
 40. Yang, JC, Sequist LV, Geater SL, Tsai CM, Mok TS, Schuler M, Yamamoto N, Yu CJ, Ou SH, Zhou C, Massey D, Zazulina Vand Wu YL (2015). Clinical activity of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring uncommon EGFR mutations: a combined post-hoc analysis of LUX-Lung 2, LUX-Lung 3, and LUX-Lung 6. *Lancet Oncol.* 16(7): p. 830-8.
 41. Shaw, AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, Riely GJ, Varella-Garcia M, Shapiro GI, Costa DB, Doebele RC, Le LP, Zheng Z, Tan W, Stephenson P, Shreeve SM, Tye LM, Christensen JG, Wilner KD, Clark JWand lafrate AJ (2014). Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 371(21): p. 1963-71.
 42. Solomon, BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, Felip E, Cappuzzo F, Paolini J, Usari T, Iyer S, Reisman A, Wilner KD, Tursi Jand Blackhall F (2014). First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 371(23): p. 2167-77.
 43. Reck, M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Czoszi T, Fulop A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S, O'Brien M, Rao S, Hotta K, Leiby MA, Lubiniecki GM, Shentu Y, Rangwala Rand Brahmer JR (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 375(19): p. 1823-1833.
 44. Yu, HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, Kris MG, Miller VA, Ladanyi Mand Riely GJ (2013). Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res.* 19(8): p. 2240-7.
 45. Pao, Wand Chmielecki J (2010). Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Cancer.* 10(11): p. 760-74.
 46. Chansky, K, Detterbeck FC, Nicholson AG, Rusch VW, Vallieres E, Groome P, Kennedy C, Krasnik M, Peake M, Shemanski L, Bolejack V, Crowley JJ, Asamura Hand Rami-Porta R (2017). The IASLC Lung Cancer Staging Project: External Validation of the Revision of the TNM Stage Groupings in the Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 12(7): p. 1109-1121.
 47. Metzger, E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, Gunther T, Buettner Rand Schule R (2005). LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature.* 437(7057): p. 436-9.
 48. Shi, Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PAand Casero RA (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* 119(7): p. 941-53.
 49. Pasquinelli, AE (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet.* 13(4): p. 271-82.
 50. Chen, Y, Yang Y, Wang F, Wan K, Yamane K, Zhang Yand Lei M (2006). Crystal structure of human histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(38): p. 13956-61.
 51. Ambrosio, S, Sacca CDand Majello B (2017). Epigenetic regulation of epithelial to mesenchymal transition by the Lysine-specific demethylase LSD1/KDM1A. *Biochim Biophys Acta.* 1860(9): p. 905-910.
 52. Huang, J, Sengupta R, Espejo AB, Lee MG, Dorsey JA, Richter M, Opravil S, Shiekhattar R, Bedford MT, Jenuwein Tand Berger SL (2007). p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature.* 449(7158): p. 105-8.
 53. Yang, J, Huang J, Dasgupta M, Sears N, Miyagi M, Wang B, Chance MR, Chen X, Du Y, Wang Y, An L, Wang Q, Lu T, Zhang X, Wang Zand Stark GR (2010). Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(50): p. 21499-504.
 54. Wang, J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, Su H, Sun W, Chang H, Xu G, Gaudet F, Li Eand Chen T (2009). The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet.* 41(1): p. 125-9.
 55. Kontaki, Hand Talianidis I (2010). Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Mol Cell.* 39(1): p. 152-60.
 56. Schulte, JH, Lim S, Schramm A, Friedrichs N, Koster J, Versteeg R, Ora I, Pajtler K, Klein-Hitpass L, Kuhfittig-Kulle S, Metzger E, Schule R, Eggert A, Buettner Rand Kirfel J (2009). Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. *Cancer Res.* 69(5): p. 2065-71.

57. Kahl, P, Gullotti L, Heukamp LC, Wolf S, Friedrichs N, Vorreuther R, Solleder G, Bastian PJ, Ellinger J, Metzger E, Schule Rand Buettner R (2006). Androgen receptor coactivators lysine-specific histone demethylase 1 and four and a half LIM domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence. *Cancer Res.* 66(23): p. 11341-7.
58. Lim, S, Janzer A, Becker A, Zimmer A, Schule R, Buettner Rand Kirfel J (2010). Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis.* 31(3): p. 512-20.
59. Hayami, S, Kelly JD, Cho HS, Yoshimatsu M, Unoki M, Tsunoda T, Field HI, Neal DE, Yamaue H, Ponder BA, Nakamura Yand Hamamoto R (2011). Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers. *Int J Cancer.* 128(3): p. 574-86.
60. Lv, T, Yuan D, Miao X, Lv Y, Zhan P, Shen Xand Song Y (2012). Over-expression of LSD1 promotes proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer. *PLoS One.* 7(4): p. e35065.
61. Lim, SY, Macheleidt I, Dalvi P, Schafer SC, Kerick M, Ozretic L, Ortiz-Cuaran S, George J, Merkelbach-Bruse S, Wolf J, Timmermann B, Thomas RK, Schweiger MR, Buettner Rand Odenthal M (2017). LSD1 modulates the non-canonical integrin beta3 signaling pathway in non-small cell lung carcinoma cells. *Sci Rep.* 7(1): p. 10292.
62. Macheleidt, IF (2017). Inhibition of LSD1 in Non-Small Cell Lung Cancer – in vitro and in vivo.
63. Mohammad, HPand Kruger RG (2016). Antitumor activity of LSD1 inhibitors in lung cancer. *Mol Cell Oncol.* 3(2): p. e1117700.
64. Barlesi, F, Giaccone G, Gallegos-Ruiz MI, Loundou A, Span SW, Lefesvre P, Kruyt FAand Rodriguez JA (2007). Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 25(28): p. 4358-64.
65. Seligson, DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein Mand Kurdistani SK (2005). Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature.* 435(7046): p. 1262-6.
66. Bradley, C, van der Meer R, Roodi N, Yan H, Chandrasekharan MB, Sun ZW, Mernaugh RLand Parl FF (2007). Carcinogen-induced histone alteration in normal human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis.* 28(10): p. 2184-92.
67. Bartel, DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116(2): p. 281-97.
68. Humphries, Band Yang C (2015). The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy. *Oncotarget.* 6(9): p. 6472-98.
69. Lee, RC, Feinbaum RLand Ambros V (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75(5): p. 843-54.
70. Kim, VN (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(5): p. 376-85.
71. Rana, TM (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(1): p. 23-36.
72. Finnegan, EFand Pasquinelli AE (2013). MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 48(1): p. 51-68.
73. Filipowicz, W, Bhattacharyya SNand Sonenberg N (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 9(2): p. 102-14.
74. Althoff, K, Beckers A, Odersky A, Mestdagh P, Koster J, Bray IM, Bryan K, Vandesompele J, Speleman F, Stallings RL, Schramm A, Eggert A, Sprussel Aand Schulte JH (2013). MiR-137 functions as a tumor suppressor in neuroblastoma by downregulating KDM1A. *Int J Cancer.* 133(5): p. 1064-73.
75. Yang, H, Li Q, Zhao W, Yuan D, Zhao Hand Zhou Y (2014). miR-329 suppresses the growth and motility of neuroblastoma by targeting KDM1A. *FEBS Lett.* 588(1): p. 192-7.
76. Zhang, X, Yu B, Hu Rand Hao L (2017). Oncogene LSD1 is epigenetically suppressed by miR-137 overexpression in human non-small cell lung cancer. *Biochimie.* 137: p. 12-19.
77. Ma, L, Ma S, Zhao G, Yang L, Zhang P, Yi Qand Cheng S (2016). miR-708/LSD1 axis regulates the proliferation and invasion of breast cancer cells. *Cancer Med.* 5(4): p. 684-92.
78. Yu, T, Liu L, Li J, Yan M, Lin H, Liu Y, Chu D, Tu H, Gu Aand Yao M (2015). MiRNA-10a is upregulated in NSCLC and may promote cancer by targeting PTEN. *Oncotarget.* 6(30): p. 30239-50.
79. Li, J, Yu T, Cao J, Liu L, Liu Y, Kong HW, Zhu MX, Lin HC, Chu DD, Yao Mand Yan MX (2015). MicroRNA-148a Suppresses Invasion and Metastasis of Human Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 37(5): p. 1847-56.

80. Mei, Z, He Y, Feng J, Shi J, Du Y, Qian L, Huang Q and Jie Z (2014). MicroRNA-141 promotes the proliferation of non-small cell lung cancer cells by regulating expression of PHLPP1 and PHLPP2. *FEBS Lett.* 588(17): p. 3055-61.
81. Xia, Y, Wu Y, Liu B, Wang P and Chen Y (2014). Downregulation of miR-638 promotes invasion and proliferation by regulating SOX2 and induces EMT in NSCLC. *FEBS Lett.* 588(14): p. 2238-45.
82. Korpala, M and Kang Y (2008). The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *RNA Biol.* 5(3): p. 115-9.
83. Park, SM, Gaur AB, Lengyel E and Peter ME (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.* 22(7): p. 894-907.
84. Paterson, EL, Kazenwadel J, Bert AG, Khew-Goodall Y, Ruzsiewicz A and Goodall GJ (2013). Down-regulation of the miRNA-200 family at the invasive front of colorectal cancers with degraded basement membrane indicates EMT is involved in cancer progression. *Neoplasia.* 15(2): p. 180-91.
85. Thiery, JP (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2(6): p. 442-54.
86. Aigner, K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, Mikulits W, Brabletz T, Strand D, Obrist P, Sommergruber W, Schweifer N, Wernitznig A, Beug H, Foisner R and Eger A (2007). The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene.* 26(49): p. 6979-88.
87. Eger, A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Bex G, Cano A, Beug H and Foisner R (2005). DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene.* 24(14): p. 2375-85.
88. Frixen, UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D and Birchmeier W (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol.* 113(1): p. 173-85.
89. Gumbiner, B, Stevenson B and Grimaldi A (1988). The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol.* 107(4): p. 1575-87.
90. Zaravinos, A (2015). The Regulatory Role of MicroRNAs in EMT and Cancer. *J Oncol.* 2015: p. 865816.
91. Ding, XM (2014). MicroRNAs: regulators of cancer metastasis and epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Chin J Cancer.* 33(3): p. 140-7.
92. Lin, Y, Wu Y, Li J, Dong C, Ye X, Chi YI, Evers B and Zhou BP (2010). The SNAG domain of Snail1 functions as a molecular hook for recruiting lysine-specific demethylase 1. *Embo j.* 29(11): p. 1803-16.
93. Konig, K, Meder L, Kroger C, Diehl L, Florin A, Rommerscheidt-Fuss U, Kahl P, Wardelmann E, Magin TM, Buettner R and Heukamp LC (2013). Loss of the keratin cytoskeleton is not sufficient to induce epithelial mesenchymal transition in a novel KRAS driven sporadic lung cancer mouse model. *PLoS One.* 8(3): p. e57996.
94. Chomczynski, P and Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1): p. 156-9.
95. Livak, KJ and Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods.* 25(4): p. 402-8.
96. Brabletz, S, Bajdak K, Meidhof S, Burk U, Niedermann G, Firat E, Wellner U, Dimmler A, Faller G, Schubert J and Brabletz T (2011). The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *Embo j.* 30(4): p. 770-82.
97. Liu, YD, Dai M, Yang SS, Xiao M, Meng F and Chen XW (2015). Overexpression of Lysine-Specific Demethylase 1 Is Associated With Tumor Progression and Unfavorable Prognosis in Chinese Patients With Endometrioid Endometrial Adenocarcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 25(8): p. 1453-60.
98. Zhao, ZK, Yu HF, Wang DR, Dong P, Chen L, Wu WG, Ding W and Liu YB (2012). Overexpression of lysine specific demethylase 1 predicts worse prognosis in primary hepatocellular carcinoma patients. *World J Gastroenterol.* 18(45): p. 6651-6.
99. Ding, J, Zhang ZM, Xia Y, Liao GQ, Pan Y, Liu S, Zhang Y and Yan ZS (2013). LSD1-mediated epigenetic modification contributes to proliferation and metastasis of colon cancer. *Br J Cancer.* 109(4): p. 994-1003.
100. Kauffman, EC, Robinson BD, Downes MJ, Powell LG, Lee MM, Scherr DS, Gudas LJ and Mongan NP (2011). Role of androgen receptor and associated lysine-demethylase coregulators, LSD1 and JMJD2A, in localized and advanced human bladder cancer. *Mol Carcinog.* 50(12): p. 931-44.

101. Kosumi, K, Baba Y, Sakamoto A, Ishimoto T, Harada K, Nakamura K, Kurashige J, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Oki E, Watanabe M, Hino S, Nakao Mand Baba H (2016). Lysine-specific demethylase-1 contributes to malignant behavior by regulation of invasive activity and metabolic shift in esophageal cancer. *Int J Cancer*. 138(2): p. 428-39.
102. Yu, Y, Wang B, Zhang K, Lei Z, Guo Y, Xiao H, Wang J, Fan L, Lan C, Wei Y, Ma Q, Lin L, Mao C, Yang X, Chen X, Li Y, Bai Y and Chen D (2013). High expression of lysine-specific demethylase 1 correlates with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 437(2): p. 192-8.
103. Wada, T, Koyama D, Kikuchi J, Honda Hand Furukawa Y (2015). Overexpression of the shortest isoform of histone demethylase LSD1 primes hematopoietic stem cells for malignant transformation. *Blood*. 125(24): p. 3731-46.
104. Bennani-Baiti, IM, Machado I, Lombart-Bosch A and Kovar H (2012). Lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1A/AOF2/BHC110) is expressed and is an epigenetic drug target in chondrosarcoma, Ewing's sarcoma, osteosarcoma, and rhabdomyosarcoma. *Hum Pathol*. 43(8): p. 1300-7.
105. Wu, Y, Wang Y, Yang XH, Kang T, Zhao Y, Wang C, Evers B and Zhou BP (2013). The deubiquitinase USP28 stabilizes LSD1 and confers stem-cell-like traits to breast cancer cells. *Cell Rep*. 5(1): p. 224-36.
106. Zhou, A, Lin K, Zhang S, Chen Y, Zhang N, Xue J, Wang Z, Aldape KD, Xie K, Woodgett JR and Huang S (2016). Nuclear GSK3 β promotes tumorigenesis by phosphorylating KDM1A and inducing its deubiquitylation by USP22. *Nat Cell Biol*. 18(9): p. 954-966.
107. Piao, L, Suzuki T, Dohmae N, Nakamura Y and Hamamoto R (2015). SUV39H2 methylates and stabilizes LSD1 by inhibiting polyubiquitination in human cancer cells. *Oncotarget*. 6(19): p. 16939-50.
108. Brennecke, J, Stark A, Russell R and Cohen SM (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 3(3): p. e85.
109. Doench, J and Sharp PA (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*. 18(5): p. 504-11.
110. Sun, G, Ye P, Murai K, Lang MF, Li S, Zhang H, Li W, Fu C, Yin J, Wang A, Ma X and Shi Y (2011). miR-137 forms a regulatory loop with nuclear receptor TLX and LSD1 in neural stem cells. *Nat Commun*. 2: p. 529.
111. Raponi, M, Dossey L, Jatko T, Wu X, Chen G, Fan Hand Beer DG (2009). MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer. *Cancer Res*. 69(14): p. 5776-83.
112. Zhen, Q, Liu J, Gao L, Wang R, Chu W, Zhang Y, Tan G, Zhao X and Lv B (2015). MicroRNA-200a Targets EGFR and c-Met to Inhibit Migration, Invasion, and Gefitinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cytogenet Genome Res*. 146(1): p. 1-8.
113. Feng, X, Wang Z, Fillmore R and Xi Y (2014). MiR-200, a new star miRNA in human cancer. *Cancer Lett*. 344(2): p. 166-73.
114. van Kempen, LC, van den Hurk K, Lazar V, Michiels S, Winnepenninckx V, Stas M, Spatz A and van den Oord JJ (2012). Loss of microRNA-200a and c, and microRNA-203 expression at the invasive front of primary cutaneous melanoma is associated with increased thickness and disease progression. *Virchows Arch*. 461(4): p. 441-8.
115. Wang, M, Liu X, Jiang G, Chen H, Guo J and Weng X (2015). Relationship between LSD1 expression and E-cadherin expression in prostate cancer. *Int Urol Nephrol*. 47(3): p. 485-90.
116. Jie, D, Zhongmin Z, Guoqing L, Sheng L, Yi Z, Jing W and Liang Z (2013). Positive expression of LSD1 and negative expression of E-cadherin correlate with metastasis and poor prognosis of colon cancer. *Dig Dis Sci*. 58(6): p. 1581-9.
117. Li, Y, Wan X, Wei Y, Liu X, Lai W, Zhang L, Jin J, Wu C, Shao Q, Shao G and Lin Q (2016). LSD1-mediated epigenetic modification contributes to ovarian cancer cell migration and invasion. *Oncol Rep*. 35(6): p. 3586-92.
118. Comijn, J, Berx G, Vermassen P, Verschuere K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D and van Roy F (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell*. 7(6): p. 1267-78.
119. Wang, J, Scully K, Zhu X, Cai L, Zhang J, Prefontaine GG, Krones A, Ohgi KA, Zhu P, Garcia-Bassets I, Liu F, Taylor H, Lozach J, Jayes FL, Korach KS, Glass CK, Fu X and Rosenfeld MG (2007). Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. *Nature*. 446(7138): p. 882-7.
120. Burk, U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S and Brabletz T (2008). A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep*. 9(6): p. 582-9.

121. Zhao, J, Dong D, Sun Land Zhang G (2014). Prognostic significance of the epithelial-to-mesenchymal transition markers e-cadherin, vimentin and twist in bladder cancer. *Int Braz J Urol.* 40(2): p. 179-89.
122. Hanahan, Dand Coussens LM (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 21(3): p. 309-22.
123. Yuan, Y, Jiang YC, Sun CKand Chen QM (2016). Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications (Review). *Oncol Rep.* 35(5): p. 2499-515.
124. Hui, Land Chen Y (2015). Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* 368(1): p. 7-13.
125. Langa, F, Kress C, Colucci-Guyon E, Khun H, Vandormael-Pournin S, Huerre Mand Babinet C (2000). Teratocarcinomas induced by embryonic stem (ES) cells lacking vimentin: an approach to study the role of vimentin in tumorigenesis. *J Cell Sci.* 113 Pt 19: p. 3463-72.
126. Satelli, Aand Li S (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 68(18): p. 3033-46.
127. Kidd, ME, Shumaker DKand Ridge KM (2014). The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 50(1): p. 1-6.
128. Franke, WW, Schmid E, Osborn Mand Weber K (1978). Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(10): p. 5034-8.
129. Liu, Y, Wang Y, Chen C, Zhang J, Qian W, Dong Y, Liu Z, Zhang X, Wang X, Zhang Z, Shi Xand Wu S (2017). LSD1 binds to HPV16 E7 and promotes the epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer by demethylating histones at the Vimentin promoter. *Oncotarget.* 8(7): p. 11329-11342.
130. Jin, L, Hanigan C, Wu Y, Wang W, Park B, Woster Pand Casero R (2013). Loss of LSD1 (lysine-specific demethylase 1) suppresses growth and alters gene expression of human colon cancer cells in a p53- and DNMT1(DNA methyltransferase 1)-independent manner. *Biochem J.* 449(Pt 2): p. 459-68.
131. Zhao, Y, Yan Q, Long X, Chen Xand Wang Y (2008). Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells. *Cell Biochem Funct.* 26(5): p. 571-7.
132. Yamashita, N, Tokunaga E, Kitao H, Hisamatsu Y, Taketani K, Akiyoshi S, Okada S, Aishima S, Morita Mand Maehara Y (2013). Vimentin as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 139(5): p. 739-46.
133. Myong, NH (2012). Loss of E-cadherin and Acquisition of Vimentin in Epithelial-Mesenchymal Transition are Noble Indicators of Uterine Cervix Cancer Progression. *Korean J Pathol.* 46(4): p. 341-8.
134. Shi, ZG, Li SQ, Li ZJ, Zhu XJ, Xu Pand Liu G (2015). Expression of vimentin and survivin in clear cell renal cell carcinoma and correlation with p53. *Clin Transl Oncol.* 17(1): p. 65-73.
135. Li, M, Zhang B, Sun B, Wang X, Ban X, Sun T, Liu Zand Zhao X (2010). A novel function for vimentin: the potential biomarker for predicting melanoma hematogenous metastasis. *J Exp Clin Cancer Res.* 29: p. 109.
136. Fuyuhiko, Y, Yashiro M, Noda S, Kashiwagi S, Matsuoka J, Doi Y, Kato Y, Kubo N, Ohira Mand Hirakawa K (2010). Clinical significance of vimentin-positive gastric cancer cells. *Anticancer Res.* 30(12): p. 5239-43.
137. Tadokoro, A, Kanaji N, Liu D, Yokomise H, Haba R, Ishii T, Takagi T, Watanabe N, Kita N, Kadowaki Nand Bandoh S (2016). Vimentin Regulates Invasiveness and Is a Poor Prognostic Marker in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res.* 36(4): p. 1545-51.