

Aus dem Forschungszentrum Borstel

Leibniz Lungenzentrum

Forschungsgruppe: Pathologie

Leiter: Prof. Dr. med. Sven Perner

Untersuchungen zu SMAD2 und Phospho-Isoformen bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Dörte Nitschkowski

Kiel, 2021

Erster Gutachter: Prof. Dr. Holger Heine

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Röder

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2021

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Lungenerkrankungen..... | 2 |
| 1.1.1 Lungenkrebs | 2 |
| 1.2 Der TGF β -Signalweg | 4 |
| 1.2.1 TGF β -Liganden..... | 4 |
| 1.2.2 Kanonischer TGF β -Signalweg | 5 |
| 1.2.3 Nicht- und inter-kanonischer TGF β -Signalweg & Linker-Phosphorylierungen | 8 |
| 1.2.4 R-SMAD Phospho-Isoformen, SMAD2-Domänen und -Spleißvarianten | 9 |
| 1.2.5 SMAD2-Spleißvarianten | 10 |
| 1.3 TGF β & SMAD2 im Kontext von Embryonalentwicklung & Krebserkrankungen | 11 |
| 1.4 Zielsetzung der Arbeit | 13 |
| 2. Material & Methoden | 15 |
| 2.1 Material | 15 |
| 2.1.1 Verbrauchsmaterialien | 15 |
| 2.1.2 Humanes Patientenmaterial & Ethik..... | 15 |
| 2.1.3 Humane Zelllinien..... | 15 |
| 2.1.4 Antikörper..... | 16 |
| 2.1.5 Software & Programme..... | 17 |
| 2.2 Methoden..... | 17 |
| 2.2.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN | 17 |
| 2.2.1.1 Kultivierung humaner NSCLC-Zelllinien..... | 17 |
| 2.2.1.2 Zellzahlbestimmung | 18 |
| 2.2.1.3 Extraktion von Alveolarepithelzellen Typ II (AECII) | 18 |
| 2.2.1.4 T-Zellen Extraktion & Expansion..... | 19 |
| 2.2.1.5 Zellstimulationen..... | 21 |
| 2.2.1.6 Zellinvasions-Assay | 21 |
| 2.2.1.7 Wundheilungs-Assay | 22 |
| 2.2.1.8 Soft-Agar Kolonieformations-Assay | 23 |
| 2.2.2 FLUORESZENZFÄRBUNGEN | 24 |
| 2.2.2.1 Immunfluoreszenzmikroskopie | 24 |
| 2.2.2.2 Durchflusszytometrie | 25 |
| 2.2.2.3 Proliferations-Assay mittels CellTrace™ | 29 |
| 2.2.2.4 <i>Multiplex</i> -Immunhistochemie | 30 |
| 2.2.3 PROTEINCHEMIE..... | 33 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.2.3.1 | Proteinextraktion & Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration | 33 |
| 2.2.3.2 | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 34 |
| 2.2.3.3 | Western-Blot Analyse | 35 |
| 2.2.3.4 | Protein-Array | 36 |
| 2.2.3.5 | Bestimmung von Kinaseaktivitäten | 38 |
| 2.2.4 | MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN | 40 |
| 2.2.4.1 | DNA- und RNA-Isolierung | 40 |
| 2.2.4.2 | DNA & RNA Konzentrationsbestimmung | 41 |
| 2.2.4.3 | RNA-Integrität | 41 |
| 2.2.4.4 | Transkriptome | 42 |
| 2.2.4.5 | SMAD2 Linker-Substitution mittels CRISPR/Cas9 (A549L ^{sub}) | 44 |
| 2.2.4.6 | Reverse Traskriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) & cDNA-Gelextraktion | 51 |
| 2.2.4.7 | Methylome | 52 |
| 2.2.5 | IN SILICO ANALYSEN | 53 |
| 2.2.5.1 | SMAD2 Genexpressionen in Lungenkrebskohorten..... | 53 |
| 2.2.5.2 | Transkriptexpressionen von SMAD2-Spleißvarianten und stammzell-assoziierte Gensets..... | 53 |
| 2.2.6 | STATISTIK | 54 |
| 2.2.6.1 | Statistische Auswertung & Datendarstellung..... | 54 |
| 3. | Ergebnisse..... | 55 |
| 3.1 | Einfluss von SMAD2-Gesamtexpressionen auf das Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten | 55 |
| 3.2 | SMAD2 & Phospho-Isoformen in NSCLC-Zelllinien | 56 |
| 3.3 | Einfluss von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen auf das Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten | 61 |
| 3.4 | SMAD2 und Phospho-Isoformen in der Proliferation von NSCLC-Zellen | 65 |
| 3.4.1 | Effekte von CDK-Inhibitoren und PIRF auf den Zellzyklus von NSCLC-Zellen..... | 66 |
| 3.4.2 | Zellzyklusunabhängige Analysen stimulierter NSCLC-Zellen..... | 68 |
| 3.4.3 | Zellzyklusabhängige Analysen unstimulierter und stimulierter NSCLC-Zellen..... | 70 |
| 3.5 | Substitution des SMAD2-Linker Serin-Triplets in A549-Zellen (A549L ^{sub})..... | 77 |
| 3.5.1 | Verifizierung erfolgreicher SMAD2 Linker-Substitutionen in A549-Zellen..... | 78 |
| 3.6 | SMAD2 und Phospho-Isoformen in A549 ^{WT} - und A549L ^{sub} -Zellen | 80 |
| 3.7 | SMAD2 und Phospho-Isoformen in Primärzellen (AECII und T-Zellen) | 89 |
| 3.8 | Funktionelle Zellanalysen von A549 ^{WT} vs. A549L ^{sub} | 93 |
| 3.9 | Untersuchungen zu regulatorischen Einflüssen von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen mittels Array-basierter Verfahren | 97 |
| 3.9 | TGFβ-Signalwegsintegrität und Liganden Prozessierung in A549L ^{sub} - und A549 ^{WT} -Zellen..... | 110 |

| | |
|---|------------|
| 4. Diskussion | 123 |
| 4.1 SMAD2-Spleißvarianten und Phospho-Isoformen in NSCLC- und Primärzellen..... | 123 |
| 4.2. SMAD2 und Phospho-Isoformen in der Proliferation von NSCLC-Zellen | 130 |
| 4.3 S2 ^{ΔE3} – der „Linker“ zur Embryogenese | 135 |
| 4.4 SMAD2 Linker-Phosphorylierungen und S2 ^{ΔE3} im Fokus von Krebstherapien | 148 |
| 4.5 Fazit: SMAD2-Spleißvarianten und Phospho-Isoformen im TGFβ-Signalweg bei NSCLCs | 162 |
| 5. Ausblick | 165 |
| 6. Zusammenfassung | 166 |
| 7. Abstract | 168 |
| 8. Literaturverzeichnis | 170 |
| 9. Anhänge | 183 |
| 11. Abkürzungsverzeichnis | 188 |
| 10. Abbildungsverzeichnis | 193 |
| 12. Erklärung | 195 |
| 13. Danksagung | 196 |

1. Einleitung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen zum Einfluss posttranslationaler Proteinmodifikationen in Form von Phosphorylierungen der Linker-Domäne des *small mother against decapentaplegic 2* (**SMAD2**)-Proteins bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (*non-small cell lung carcinoma*; **NSCLC**).

Frühere Studien unserer Forschungsgruppe zeigten hohe Aktivitäten des *transforming growth factor beta* (**TGFβ**)-Signalwegs bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, basierend auf hohen Frequenzen C-terminaler TGFβ-Rezeptor-vermittelter Phosphorylierungen an SMAD2 und -3 (1). Darüber hinaus wurde eine Modulation durch Pirfenidon, einem Medikament zur Behandlung idiopathischer Lungenfibrosen, nachgewiesen (2). Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass C-terminale SMAD3 Phosphorylierungen in NSCLC-assoziierten Immunzellen einen Einfluss auf das Gesamtüberleben haben (3). Phosphorylierungen an SMAD2, -3 sind jedoch nicht auf C-terminale Motive beschränkt. Diese dienen ebenfalls als Substrate für intrazelluläre Kinasen anderer Signalwege (z. B. ERK1/2, p38, CDKs), die gezielt Linker-Domänen phosphorylieren. Damit stellen SMAD2, -3-Proteine zentrale Knotenpunkte für Kreuzvernetzungen von TGFβ-Signalen zu anderen Signalkaskaden dar (4) (5). Phosphorylierte SMAD-Proteine agieren als **Transkriptionsfaktoren (TFs)** und translozieren in den Nukleus, wo sie in Abhängigkeit mit weiteren Kofaktoren und TFs entsprechende Genexpressionen regulieren. TGFβ-Signale sind mit basalen zellulären Prozessen wie Embryonalentwicklung, Proliferation, Zelldifferenzierung und Gewebshomöostase assoziiert (6) (7). Darüber hinaus spielt der TGFβ-Signalweg eine zentrale Rolle bei der Tumorentstehung, mit einer anfänglich tumorsuppressiven Wirkung, aber tumorfördernden Eigenschaften in späteren Stadien. Derzeit ist die duale Rolle noch unzulänglich geklärt (8). Während der Karzinogenese erwerben maligne Zellen u. a. die Fähigkeit einer gesteigerten Proliferation sowie abweichenden Zelldifferenzierung und durchlaufen transiente Prozesse wie bspw. bei der *epithelial-mesenchymal transition* (**EMT**) (9) (10) (11). Es ist bekannt, dass verschiedene Phosphorylierungen an den SMADs Expressionen spezifischer Zielgene beeinflussen. Während C-terminale Phosphorylierungen mit anti-proliferativen Effekten einhergehen, sind die der Linker-Domänen mit Zellwachstum und Invasion assoziiert (12) (13) (14). Neben den vielfältigen Phospho-Isoformen sind ebenfalls verschiedene Spleißvarianten bekannt, denen unterschiedliche Funktionen zugeschrieben werden und das kombinatorische Spektrum folglich erweitern (15) (16) (17). Die vorliegende Arbeit befasst

sich mit SMAD2-Linker Phosphorylierungen und den daraus resultierenden Einflüssen bei Lungenkrebs. Eine Aufklärung grundlegender Mechanismen und gezielte Modulationen von SMAD2-Zielstrukturen könnten neue Ansätze in der Krebstherapie bieten.

1.1 Lungenerkrankungen

Millionen von Menschen aller Altersgruppen und sozioökonomischen Schichten sind weltweit von Lungenkrankheiten betroffen. Damit zählen diese zu den häufigsten Erkrankungen im Hinblick auf Morbidität und Mortalität (18). Durch die globale Verbreitung des *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)*-Erregers seit Beginn des Jahres 2020 sind diese präsenter in den Wahrnehmungsbereich der Weltbevölkerung gerückt. Doch nicht nur SARS-CoV-2 fordert Menschleben. Lange vor der Pandemie zählten bereits Lungenerkrankungen weltweit zu den zehn häufigsten Todesursachen. Dazu gehören Tuberkulose, Lungeninfektionen, chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen (*chronic obstructive pulmonary disease; COPD*) und Lungenkrebs. Von den insgesamt 56,9 Millionen Todesfällen 2016 waren $\geq 54\%$ auf die zehn häufigsten Todesursachen zurückzuführen. Davon entfielen etwa 9,3 Millionen Todesfälle auf die genannten Lungenerkrankungen, wovon $\geq 1,7$ Millionen mit Lungenkrebs assoziiert waren (WHO 2018) (19). Abgesehen von Tuberkulose haben Lungenerkrankungen in Deutschland eine ähnliche Häufigkeit im Vergleich zu anderen Industrieländern. Das Deutsche Statistische Bundesamt wies 2015 deutschlandweit insgesamt 925.200 Todesfälle aus und listete Pneumonien auf Platz 8, COPD auf Platz 6 und Lungenkrebs auf Platz 4 der zehn häufigsten Todesursachen. Zusammengenommen verstarben in Deutschland $\geq 10,3\%$ an einer Lungenkrankheit, wovon wiederum $4,9\%$ der Todesfälle auf Lungenkrebs entfielen (20).

1.1.1 Lungenkrebs

Lungenkrebs betrifft Frauen und Männer gleichermaßen und gehört zu den tödlichsten Krebsarten weltweit (21). In Deutschland lag die Inzidenz maligner Lungentumore 2015 bei 29.354 Männern und 15.817 Frauen, wobei die relative 5-Jahres-Überlebensrate lediglich rund 21% bei den Männern und 15% bei den Frauen beträgt (22). Lungenkrebs stellt damit die dritthäufigste Krebserkrankung bei beiden Geschlechtern dar. Exogene Risikofaktoren, die zur Karzinogenese beitragen können, sind bspw. das inhalative Zigarettenrauchen und Passivrauchen, ionisierende Strahlung (z. B. medizinische Strahlenexposition), Asbest oder

Berufsnoxen (z. B. Arsen, Kadmium, Chrom oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe). Lungenkarzinome entwickeln sich durch komplexe Prozesse, die bspw. mit genetischen Aberrationen einhergehen (22) (23). Über die Hälfte der Lungenkrebspatienten versterben innerhalb eines Jahres nach Diagnosestellung aufgrund fehlender Methoden zur Früherkennung, wodurch sich die Patienten oftmals in einem fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium befinden (21) (22) (24) und von kurativen chirurgischen Eingriffen ausgeschlossen sind (25).

Grundsätzlich werden Lungenkarzinome histologisch klassifiziert und in die beiden Hauptentitäten des kleinzelligen Lungenkarzinoms (*small cell lung carcinoma*, **SCLC**) und des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (*non-small cell lung carcinoma*, **NSCLC**) unterteilt. Etwa 80 % aller Lungenkarzinome sind NSCLCs. Diese setzen sich wiederum aus drei Hauptsubtypen zusammen, dem Adenokarzinom (*adenocarcinoma*, **ADC**), dem Plattenepithelkarzinom (*squamous cell carcinoma*, **SQC**) und dem großzelligen Karzinom (*large cell carcinoma*, **LCC**), wobei ADCs mit $\geq 40\%$ den größten Teil aller Lungenkrebsdiagnosen ausmachen (22) (25). Fortgeschrittene NSCLCs werden primär durch cytotoxische Chemo- und Strahlentherapie behandelt. Neben diesen können Immun- oder zielgerichtete Therapien (*targeted therapies*) Anwendung finden. Erstere zielt darauf ab spezifische Immun-Checkpoint-Signalwege zu blockieren, wie bspw. *programmed cell death 1* (**PD-1**) und *programmed cell death ligand 1* (**PDL-1**) (26). Hingegen erfordern zielgerichtete Therapien spezifische genetische Aberrationen. Aktivierende Treibermutationen können bspw. im *epidermal growth factor receptor* (**EGFR**) oder *anaplastic lymphoma kinase* (**ALK**) auftreten (21) (27). Werden diese Mutationen nachgewiesen, stehen mittlerweile verschiedene Medikamente wie bspw. Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (**TKIs**; Afatinib, Gefitinib und Crizotinib) zur Verfügung. Diese sind in der Lage spezifische Signalkaskaden zu unterbrechen. Studien konnten dadurch eine Verlängerung der Überlebenszeit nachweisen. Trotz dieser bemerkenswerten Fortschritte durch verbesserte Therapien in den letzten Jahren bleibt die Sterberate für Lungenkrebs hoch. Darüber hinaus kann die häufigste Onkogenmutation bei ADCs, *Kirsten rat sarcoma* (**KRAS**), bisher nicht spezifisch behandelt werden. Diese führt zu einer EGFR-unabhängigen konstitutiven Aktivierung des RAS/RAF/MAPK-Signalwegs und infolgedessen zu einer Resistenz gegen TKIs (28) (29). Insgesamt betrachtet bleiben die Therapiemöglichkeiten damit begrenzt und Lungenkrebspatienten haben weiterhin eine schlechte Prognose.

Vorherige Untersuchungen unserer Forschungsgruppe zeigten, dass der TGF β -Pseudorezeptor *bone morphogenic protein and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI)* in NSCLCs herunterreguliert ist und zu einer hohen Aktivität des TGF β -Signalwegs beiträgt (1). Darüber hinaus machte eine Folgestudie deutlich, dass SMAD2, -3-Gesamtproteine und TGF β -vermittelte Phosphorylierungen des C-Terminus an SMAD3 durch Pirfenidon in NSCLCs signifikant reduziert werden. Darüber hinaus induzierten Pirfenidon-Behandlungen in verschiedenen NSCLC-Zelllinien einen G0/G1-Arrest (30). Ein tieferes Verständnis und Untersuchungen systematischer Beeinflussungen des TGF β -Signalwegs bei NSCLCs sind daher für neue Therapien von essenzieller Bedeutung.

1.2 Der TGF β -Signalweg

Die Entdeckung des TGF β -Signalwegs, der im Tierreich hoch konserviert ist, liegt etwa 40 Jahre zurück (31). TGF β -Signalkaskaden lassen sich bis zu den ersten multizellulären Organismen zurückverfolgen und wurden durch evolutionäre Prozesse diversifiziert (32). TGF β gehört zur Gruppe der Cytokine und spielt nicht nur in der Embryogenese eine zentrale Rolle. Es liegt ebenfalls in adulten Organismen in den meisten Geweben aller *Metazoa* vor. Im Menschen sind mehr als 30 Proteine der TGF β -Superfamilie bekannt, welche bspw. die Gruppen der TGF β s, Aktivine, *bone morphogenetic proteins (BMPs)* sowie *growth and differentiation factors (GDFs)* umfasst. In Zellen nimmt TGF β eine multifunktionale Rolle ein und ist mit basalen Prozessen wie Proliferation, Apoptose, Zelldifferenzierung sowie Gewebshomöostase assoziiert. Es wirkt als potenter Wachstumsinhibitor für die meisten Arten von Zellen wie hämatopoetische Zellen, Endothel- und Epithelzellen (33) (34).

1.2.1 TGF β -Liganden

TGF β -Liganden werden in einer biologisch inerten Form exprimiert. Die dimeren Propeptide werden zunächst mittels furinähnlicher Proteasen im *trans*-Golgi Apparat abgespalten. Dabei bleiben TGF β -Dimere über eine nicht-kovalente Bindung mit dem *latency associated peptide (LAP)* assoziiert. Daher sind diese nach der Exozytose nicht in der Lage an Rezeptoren zu binden. In der *extra cellular matrix (ECM)* bindet der LAP-Komplex über Disulfidbrücken an *latent TGF β binding proteins (LTBPs)*, die wiederum mit Proteinen der ECM verbunden sind. Erst wenn diese bspw. durch **Matrix-Metalloproteasen (MMPs)** freigesetzt werden, sind die Liganden aktiv und können an die Transmembranrezeptoren binden. Die aktiven Liganden

können als Homo- und Heterodimere vorliegen, wobei die Monomere untereinander über Disulfidbrücken verbunden sind und wird als Cystein-Knoten bezeichnet. Die dimere Struktur scheint dabei eine Zusammenführung der Rezeptorpaare an der Zelloberfläche zu ermöglichen (35) (36).

1.2.2 Kanonischer TGF β -Signalweg

Signaltransduktionen von der Zellmembran ins Innere erfolgen nach Bindungen von Liganden an die Transmembranrezeptoren (Abb. 1, A). Aufgrund struktureller und funktionaler Eigenschaften werden diese in zwei Subfamilien vom Typ-I (T β R-I) und -II (T β R-II) untergliedert. Insgesamt codiert das humane Genom für 12 Mitglieder der Serin/Threonin-Kinase-Familie. Davon werden sieben dem Typ I und fünf dem Typ II zugeordnet. Beide weisen überdies eine schwächere Tyrosinkinaseaktivität auf (35) (37). Ligandenbindungen erfolgen am T β R-II, der als Homodimer vorliegt. Die cytoplasmatisch lokalisierte Kinase-Domäne ist mittels eines Liganden-unabhängigen Mechanismus konstitutiv aktiv. Nach der Ligandenbindung rekrutiert dieser den homodimeren T β R-I, was eine Zusammenlagerung beider Rezeptoren zu einem heterotetrameren Rezeptorkomplex bewirkt. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung, die eine Übertragung des Phosphats von der T β R-II- auf die T β R-I-Serin/Threonin-Kinase-Domäne ermöglicht (Abb. 1, B) (37) (38).

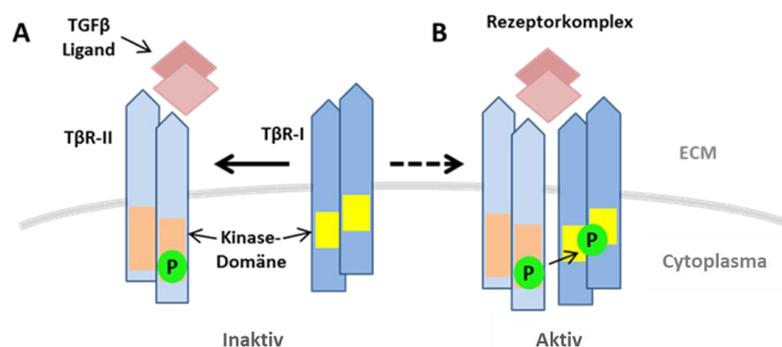


Abb. 1: TGF β Liganden-Bindung und Rezeptoraktivierung. Die Abbildung zeigt schematisch (A) die Bindung des TGF β -Liganden (rot) an den T β R-II (hellblau) und die Rekrutierung des T β R-I (dunkelblau). (B) Die Zusammenlagerung zum Heterotetramer bewirkt eine Konformationsänderung und ermöglicht eine Übertragung der Phosphorylierung (grün) von der Kinase-Domäne des T β R-II (orange) auf die des T β R-I (gelb) (nach (12)).

Als zentrale Mediatoren der Signalweiterleitung von der inneren Zellmembran des aktivierten TGF β -Rezeptorkomplexes zum Nukleus fungieren die **Rezeptor-regulierten SMAD (R-SMAD)**-Proteine. Diese sind direkte Substrate der T β R-I-Kinase (33). Das erste intrazelluläre TGF β -Signalprotein wurde in *Drosophila melanogaster* entdeckt und als *mother against decapentaplegic (MAD)*-Protein bezeichnet. Weitere Homologe wurden kurz darauf in *Caenorhabditis elegans* und Vertebraten beschrieben und mit Sma bzw. SMAD benannt (35). Das Human- und Mausgenom codieren für acht SMAD-Proteine. SMADs werden anhand ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften in drei Subfamilien untergliedert. Die erste Gruppe umfasst **Rezeptor-regulierte SMADs (R-SMADs)** als direkte Substrate des aktivierten T β R-Komplexes. In einer zweiten Gruppe werden kooperative SMADs (**common-SMAD; Co-SMAD**) zusammengefasst, die mit allen R-SMADs interagieren können. Inhibitorische SMADs (**inhibitory-SMAD; I-SMADs**) bilden die dritte Gruppe und können Signaltransduktionen durch R- und Co-SMADs unterbinden.

Bei den Säugetieren gehören insgesamt fünf Proteine der R-SMAD-Gruppe an. SMAD1, -5 und -8 sind Substrate von **BMP-Rezeptoren (BMPRs)**, während SMAD2 und -3 mit TGF β - und Aktivin-Rezeptoren interagieren. Gemein haben alle R-SMADs, dass Phosphorylierungen am konservierten Serin-Motiv (SSXS) des C-Terminus der Proteine erfolgen. Eine Übertragung wird durch das **SMAD anchor for receptor activation (SARA)**-Protein erleichtert (Abb. 2, A) (13) (39). Die Subfamilie der Co-SMADs wird allein durch SMAD4 vertreten. Es kann mit allen R-SMADs interagieren und pendelt als Monomer zwischen dem Nukleus und Cytoplasma. SMAD4 bildet mit C-terminal phosphorylierten R-SMADs heterodimere- oder -tertiäre Strukturen aus. R-SMAD/Co-SMAD-Komplexe translozieren anschließend in den Zellkern und binden an das **SMAD binding element (SBE)**. Da die Affinität an das SBE relativ schwach ist, werden weitere Kofaktoren (Aktivatoren bzw. Repressoren) für Zielgentranskriptionen benötigt. Eine Kombination aus verschiedenen Kofaktoren und TFs bedingen daher spezifische Expressionen oder Repressionen TGF β -responsiver Gene. Zur Gruppe der I-SMADs gehören zwei Mitglieder, SMAD6 und -7. Diese können R-SMAD-Rezeptor Interaktionen als auch bildungen von R-SMAD/Co-SMAD-Komplexen bereits phosphorylierter Proteine unterbinden. Infolgedessen werden Translokationen in den Nukleus und Gentranskriptionen unterbunden (34) (40) (41).

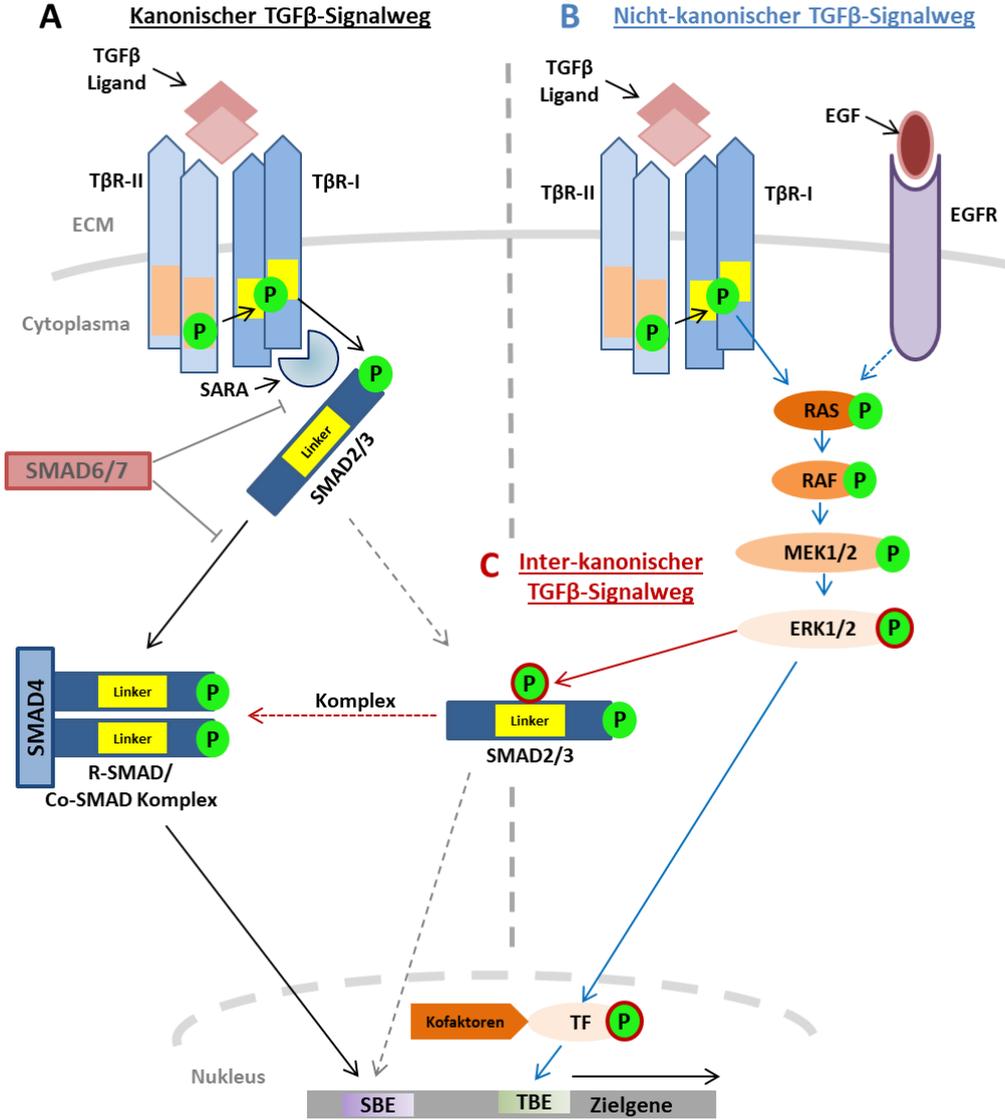


Abb. 2: Der TGFβ-Signalweg & Kreuzvernetzungen zu anderen Signalkaskaden. Schematische und vereinfachte Abbildung des TGFβ-Signalwegs und Kreuzvernetzungen zu anderen Signalkaskaden. (A) Im kanonischen TGFβ-Signalweg (schwarze Pfeile, li.) sind R-SMADs direkte Substrate des aktiven TGFβ-Rezeptorkomplexes. Die TβR-I-Kinase überträgt die Phosphorylierung (grün) auf den C-Terminus von SMAD2/3. SARA erleichtert die Übertragung der Phosphorylierung auf das konservierte C-terminale Motiv. Die aktivierten SMAD2/3-Proteine bilden einen Komplex mit SMAD4 (R-SMAD/Co-SMAD-Komplex) und translozieren in den Nukleus. Dort binden sie an das SMAD *binding element* (SBE) und können durch eine Interaktion mit anderen Ko- und Transkriptionsfaktoren (TFs) spezifische Gentranskriptionen induzieren. Eine Inhibierung der Phosphorylierung und Komplexbildung kann durch inhibitorische SMADs (SMAD6/7; rot) erfolgen. Die unterbrochenen Linien (grau) weisen auf die Möglichkeit einer direkten Translokation in den Nukleus ohne die Bildung eines Komplexes hin. (B) Der nicht-kanonische TGFβ-Signalweg ist R-SMAD unabhängig (blaue Pfeile, re.) und die Phosphorylierung (grün) wird auf andere intrazelluläre Signalkaskaden (z. B. MAPK; orange) übertragen. Phosphorylierte intrazelluläre Kinasen translozieren in den Nukleus und agieren als TFs indem diese an entsprechende Zielsequenzen (*transcription factor binding element*; TBE) binden oder mit dem R-SMAD/Co-SMAD-Komplex kooperieren. (C) Im inter-kanonischen TGFβ-Signalweg (rote Pfeile, mittig) erfolgt eine Phosphorylierung der R-SMADs innerhalb der Linker-Domäne durch intrazelluläre Kinasen. Diese können aus dem nicht-kanonischen TGFβ-Signalweg oder anderer Signalkaskaden (z. B. MAPK, orange) hervorgehen. Die Linker-Domänen von R-SMADs stellen somit unmittelbare Knotenpunkte für eine Kreuzvernetzung von TGFβ-Mediatoren mit anderen Signalwegen dar (nach (7) (39) (42)).

1.2.3 Nicht- und inter-kanonischer TGF β -Signalweg & Linker-Phosphorylierungen

Der nicht-kanonische TGF β -Signalweg erfolgt R-SMAD unabhängig durch weitere Signalkaskaden, die durch aktive TGF β -Liganden initiiert werden. Dabei bleibt eine T β R-Komplex-Aktivierung bestehen (Abb. 1). Die Übertragung des Phosphats vom T β R-I erfolgt in diesem Falle auf anderer Signalkaskaden, die weitere intrazelluläre Kinasen wie bspw. *extracellular signal regulated kinase (ERK)*, *phosphoinositol-3 kinase (PI3K)* oder *c-JUN N-terminal kinase (JNK)* phosphorylieren (Abb. 2, B) (13) (43). Diese können anschließend weitere Proteine phosphorylieren oder selbst als TFs agieren und in den Zellkern translozieren. Dort lösen diese wiederum Gentranskriptionen aus oder kooperieren mit R-SMAD/Co-SMAD-Komplexen und regulieren bspw. Prozesse wie Migration und Proliferation (12).

Im inter-kanonischen TGF β -Signalweg kommt es zu regulatorischen Phosphorylierungen von R-SMAD Linker-Regionen (42). Diese Struktur verbindet die konservierten *Mad homology 1* und *-2 (MH1, -2)*-Domänen miteinander (Abb. 3, B). R-SMAD Linker-Sequenzen sind variabel in ihrer Länge und Abfolge und tragen zusätzliche Aminosäurereste als Phosphorylierungsstellen. Phosphorylierungen erfolgen durch intrazelluläre Kinasen anderer Signalwege und nicht direkt durch den TGF β -Rezeptorkomplex (Abb. 2, C). Dabei können intrazelluläre Kinasen auch TGF β -unabhängig induziert werden wie bspw. durch den *epidermal growth factor (EGF)* der am EGFR bindet. Im Gegensatz zur T β R-I-Kinase weisen diese eine höhere Tyrosinaktivität auf. Nachgeschaltete Signalkaskaden wie bspw. der MAPK-Signalweg übertragen Phosphorylierungen anschließend spezifisch auf Linker-Regionen von R-SMADs. Weitere Kinasen die Phosphorylierungen auf die Linker-Domänen überleiten sind bspw. *cyclin dependent kinases (CDKs)* und *glycogen synthase kinase 3- β (GSK3 β)* (7) (39) (44).

Sowohl der nicht- als auch der inter-kanonische TGF β -Signalweg ermöglichen eine Kreuzvernetzung zu anderen Signalwegen. Insbesondere die Route des inter-kanonischen TGF β -Signalwegs trägt zur Entstehung verschiedener R-SMAD Phospho-Isoformen unter Beeinflussung der Zielgentranskription bei. Linker-Phosphorylierungen sind demnach zentrale Knotenpunkte für direkte Vernetzungen zu anderen Signalwegen und deren Kinasen (45) (46).

1.2.4 R-SMAD Phospho-Isoformen, SMAD2-Domänen und -Spleißvarianten

Durch TGF β -Signalwege und deren Vernetzung mit anderen Signalkaskaden können grundsätzlich drei Phospho-Isoformen von R-SMADs entstehen: C-terminal phosphorylierte, Linker phosphorylierte und dual phosphorylierte (Abb. 3, A) (7) (47). Darüber hinaus weisen R-SMADs mehrere potenzielle Phosphorylierungsstellen innerhalb der Linker-Domäne in Form von Threonin- und Serinresten auf. Aufgrund des Forschungsschwerpunktes der vorliegenden Arbeit wurden die des SMAD2-Proteins auszugsweise näher dargestellt (Abb. 3, B). Linker-Phosphorylierungen sind in der Lage, C-terminale Signaltransduktionen zu beeinflussen und zu verändern wodurch das Repertoire an möglichen Signalantworten erweitert wird (48). Neben Kinasen zur Phosphorylierung von R-SMADs können diese ebenfalls einer Dephosphorylierung unterliegen. Serine des C-terminalen Motivs werden im Nukleus durch *protein phosphatase (magnesium-dependent) 1A (PPM1A)* dephosphoryliert und aus dem Nukleus exportiert (6) (49). Phosphorylierte Serinreste innerhalb der Linker-Domäne werden durch *small C-terminal domain phosphatases (SCPs)* aufgehoben. Diese Phosphatasen wirken nicht auf Threonine innerhalb des Linkers oder Serinreste des C-Terminus dephosphorylierend (7) (49).

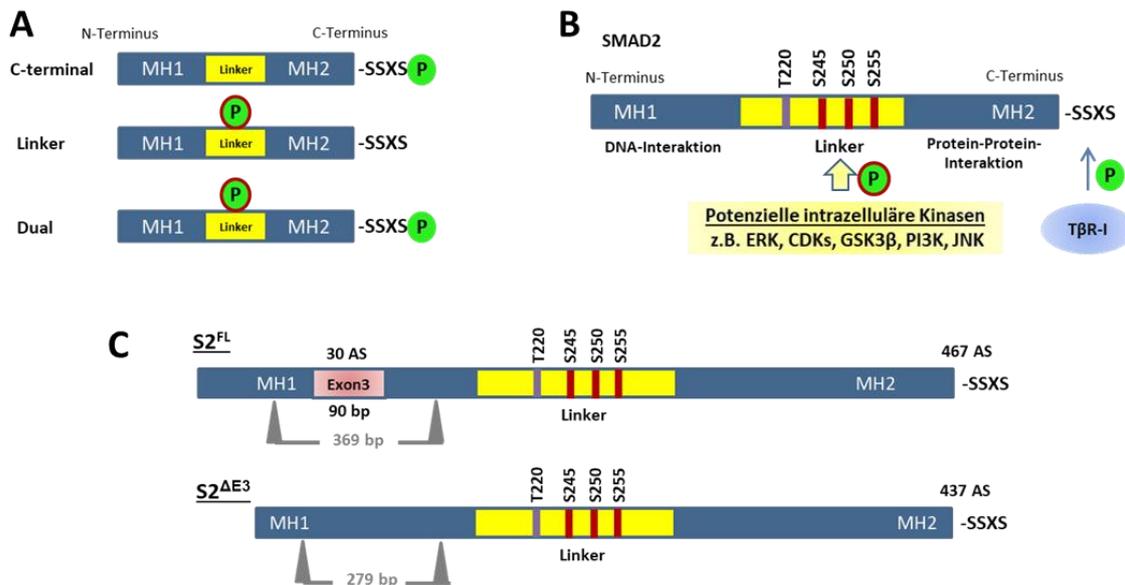


Abb. 3: R-SMAD Phospho-Isoformen, SMAD2-Domänen und -Spleißvarianten. Die stark vereinfachten Abbildungen zeigen: **(A)** Potenzielle R-SMAD Phospho-Isoformen, die durch ein Zusammenspiel von TGFβ-Signalwegen und anderer Signalkaskaden entstehen können. **(B)** Hauptdomänen des SMAD2-Proteins und ihre Funktionen sowie Phosphorylierungsstellen innerhalb der Linker-Domäne (gelb) in Form von Threonin (violett) und Serinen (rot), die durch intrazelluläre Kinasen phosphoryliert werden können. C-Terminus ist das Serin-Motiv (SSXS) lokalisiert, das durch die TβR-I-Kinase (hellblau) phosphoryliert wird. **(C)** Die SMAD2-Spleißvariante ‚full length‘ (S2^{FL}; oben) mit Exon 3 (E3) Struktur (hellrot) innerhalb der MH1-Domäne und einer Gesamtlänge von 467 Aminosäuren (AS). Unten wurde die kurze SMAD2-Spleißvariante ohne Exon 3 (S2^{ΔE3}) abgebildet. Die fehlende E3-Struktur führt zu einem 30 AS kürzeren SMAD2-Protein (nach (50)). Die grauen Dreiecke unter den jeweiligen MH1-Domänen verweisen auf die erwarteten Fragmentlängen (bp) in der RT-PCR.

1.2.5 SMAD2-Spleißvarianten

Bevor Proteinmodifikationen regulatorische Funktionen an Proteinen ausüben können, ist eine Gentranskription und anschließende Translation vorausgesetzt. Das zentrale Dogma der Molekularbiologie ist der Fluss dieser genetischen Information von der DNA über die RNA bis hin zum Protein. Alternatives Spleißen ist ein wesentlicher zellulärer Prozess, um das grundlegende Codierungspotenzial des Genoms zu erweitern. Der Spleißvorgang erfolgt als Zwischenschritt an der prä-mRNA. Diese enthält die nicht codierenden Introne und codierenden Exone in einer vom Gen festgelegten Abfolge. Durch diesen Vorgang werden aus einer prä-mRNA nicht nur Introne entfernt, es können ebenfalls gezielt Exone herausgetrennt und wieder zusammengefügt werden, bevor diese durch Ribosomen translatiert werden. Demnach führt alternatives Spleißen zu multiplen mRNA Transkripten, die zu einer Proteom-Diversität beitragen und Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften hervorbringen. Diese können wiederum spezifische Funktionen erfüllen. Ausgeführt wird dieser Prozess vom Spleißosom, einer Makromolekül-Maschinerie, die eine Reihe

konstitutiver DNA-Motive erkennt und die mRNA erstellt, während die RNA-Polymerase II diese im Kern synthetisiert (51) (52).

Insgesamt sind 12 Spleißvarianten des humanen SMAD2-Proteins bekannt, die sich in ihrer Exon-Anzahl und -Abfolge unterscheiden (53). Drei davon werden vom *National Center of Biotechnology Information (NCBI)* mit kuratierten *reference-sequence*-Nummern erfasst. Die Spleißvarianten 1 und 2 (NM_001003652; NM_005901) enthalten alternative Exon 1-Sequenzen innerhalb der prozessierten mRNA. Beide führen jedoch nach einer Translation zu identischen SMAD2-*full length*' ($S2^{FL}$)-Proteinen mit einer Gesamtlänge von 467 Aminosäuren. Bei der SMAD2-Spleißvariante 3 (NM_001135937) fehlt das 90 bp lange Exon 3 ($S2^{\Delta E3}$). Dies führt zu einem 30 Aminosäuren kürzeren Protein (54). Das Exon 3 (**E3**) codiert für einen *stretch*-Einschub in der MH1-Domäne des SMAD2-Proteins (15) (55). Folglich bleiben bei beiden SMAD2-Spleißvarianten sowohl die Linker-Domänen als auch C-terminalen Motive davon unberührt. Damit erweitert dieser Vorgang das kombinatorische Spektrum potenzieller SMAD2 Phospho-Isoformen (Abb. 3, C).

1.3 TGF β & SMAD2 im Kontext von Embryonalentwicklung & Krebserkrankungen

Das SMAD2-Protein nimmt eine zentrale Funktion bei der Embryonalentwicklung ein und ist an der Ausbildung der *anterior-posterior*-Achse beteiligt (56) (57). Weiterhin wurde in Tierversuchen demonstriert, dass ein kompletter Knockout von *Smad2* in Mausembryonen letal wirkt, da dies eine fehlende Gastrulation und Mesodermentwicklung zur Folge hat (56) (58). Ein differenzieller Knockout der langen und kurzen *Smad2*-Spleißvariante zeigte, dass Mausembryonen sich normal und fertil entwickelten, wenn ausschließlich $S2^{\Delta E3}$ (*Smad3*^{null/null}) exprimiert wird. Hingegen führt eine alleinige Expression von $S2^{FL}$ in murinen embryonalen Stammzellen (mESC) zu Fehlern bei der Ausbildung der *anterioren*-Neuralplatte (57). Ferner wurde gezeigt, dass beide SMAD2-Proteinvarianten während der Gehirnentwicklung von Mäusen (16) sowie bei der Embryogenese von *Xenopus laevis* und Mäusen differenzielle Proteinniveaus aufweisen. Des Weiteren wurde ein höheres Niveau an $S2^{\Delta E3}$ in mESCs detektiert. Es wurde lange Zeit angenommen, dass nur $S2^{\Delta E3}$ zu einer intrinsischen DNA-Bindung durch die fehlende E3-Struktur befähigt sei (59) (17). Dies wurde kürzlich in einer Studie widerlegt und zeigte, dass die E3-Struktur eher als ein Scharnier fungiert und eine DNA-Interaktion von $S2^{FL}$ ebenfalls möglich ist (55). Es wird angenommen, dass beide SMAD2-Spleißvarianten spezifische Funktionen erfüllen und nicht als redundante

Proteine angesehen werden können (60) (57). Darüber hinaus zeigten verschiedene Studien, dass TGF β -vermittelte Signale an SMAD2 und -3 während der Lungenentwicklung an der Ausbildung der Atemwegsverzweigungen als auch an der Alveolarisierung beteiligt sind (61) (62) (63).

Einen ebenfalls komplexen Prozess stellt die Karzinogenese dar. Dabei erlangen Zellen bestimmte Schlüsselmerkmale wie eine abnormal gesteigerte Proliferation, Befähigung zur Invasion in angrenzendes Gewebe sowie zur Metastasierung (10) (11) (64). TGF β nimmt dabei eine pleiotrope Rolle ein und es werden sowohl tumorsuppressive als auch -fördernde Eigenschaften beschrieben, die weiterhin noch unzulänglich geklärt sind. In normalen Epithelzellen wirken TGF β -Signale cytostatisch und tragen zur Gewebshomöostase bei. C-terminal vermittelte Phosphorylierungen durch die T β R-I-Kinase an SMAD2/3 bewirken dabei eine Mobilisierung von CDK-Inhibitoren und eine Suppression von MYC. So kommt es u. a. durch Induktionen von *CDKN2B* und *CDKN1A* zu Inhibierungen von CyclinD-CDK4/6- und CyclinE/A-CDK2-Komplexen, was einen G1-Arrest nach sich zieht (8). Diese Wirkung wird in Krebszellen gehemmt, obwohl eine genetische Inaktivierung von Signalmolekülen nur in etwa 10 % aller Fälle auftritt (12). In späteren Krebsstadien werden TGF β -vermittelte Signaltransduktionen mit Invasion assoziiert, insbesondere durch duale Phosphorylierungen des SMAD2-Proteins (5). Es wurde ferner gezeigt, dass TGF β ein potenter EMT-Induktor ist. Bei diesem transienten Prozess verlieren Zellen ihre Polarität und interzelluläre Adhäsion. Dabei verschiebt sich das zelluläre Profil auf verschiedenen Ebenen und bewirkt bspw. eine erhöhte Expression mesenchymaler Marker (z. B. Vimentin, N-Cadherin). Gleichzeitig gehen epitheliale Marker wie E-Cadherin verloren oder werden reduziert exprimiert. Dieses Ereignisse befähigen Zellen zur Metastasierung (8) (65) (66) und spielen ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Fibrosierung und Wundheilung (67). *In vitro* Experimente in A549-Zellen zeigten, dass diese durch TGF β 1-Stimulationen einen EMT-Mechanismus mittels SMAD2-Aktivierungen erfahren (68). Des Weiteren verdeutlichten Untersuchungen unserer Forschungsgruppe die zentrale Stellung von TGF β -Signalen bei Lungenkrebs. Sowohl in NSCLC-Geweben als auch -Zelllinien ist der TGF β -Pseudorezeptor *BAMBI* herunterreguliert. Hingegen zeigte sich nach einer *BAMBI*-Reaktivierung ein reduziertes Zellwachstum und verminderte Invasionsfähigkeit. Ein aktiver TGF β -Signalweg konnte überdies durch eine hohe Frequenz an C-terminalen SMAD2,-3-Phosphorylierungen nachgewiesen werden (1).

Einen entscheidenden Hinweis zur Aufklärung pleiotroper TGF β -Signale lieferte eine kürzlich publizierte Studie. Dort wurden Zellen der *human mammary epithelial cell line (HMEL)* über längere Zeit (12 und 24 Tage) mit TGF β 1 stimuliert. Nachdem der Stimulus für einige Tage entfernt wurde zeigte sich, dass nur der EMT-Mechanismus nach kürzeren Stimulationen reversibel war. Zellen die länger stimuliert wurden verloren nur partiell ihre EMT-Eigenschaften, trotz zusätzlicher Inhibierung der T β R-I-Kinase. Sie kategorisierten daher die EMT Subtypen in „reversibel“ (TGF-abhängig) und „stabilisiert“ (TGF β -unabhängig). Darüber hinaus konnten sie nachweisen, dass eine Inhibierung von MTOR auch die Tumorigenität in Zellen mit einer „stabilisierten“ EMT reduzierte. Ferner wurden erhöhte Resistenzen gegen Krebsmedikamente und Generierungen von *stem cell-like* Zellpopulationen als Folgen einer „stabilisierten“ EMT nachgewiesen (69).

Inwieweit SMAD2-Spleißvarianten und insbesondere SMAD2-Linker Phosphorylierungen TGF β -induzierte Prozesse im Kontext des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms beeinflussen, wurde daher in der vorliegenden Arbeit untersucht.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Trotz der weit zurückliegenden Entdeckung des TGF β -Signalwegs und der weltweit hohen Lungenkrebs Inzidenz sind derzeit keine Studien bekannt, die Linker-Phosphorylierungen des SMAD2-Proteins im NSCLC-Kontext untersuchen. In den wenigen vorangegangenen Studien anderer Karzinome wurden zudem keine Differenzierungen von SMAD2-Spleißvarianten vorgenommen; insbesondere nicht unter Betrachtung eines differenziellen Phosphorylierungsstatus. Ziel der vorliegenden Arbeit waren daher Untersuchungen zum regulatorischen Einfluss und Modulierbarkeit von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen in NSCLCs. Zur Realisierung dieser Vorhaben standen die Generierung einer Modell-Zelllinie mit einer Substitution innerhalb der SMAD2 Linker-Domäne sowie Stimulationsexperimente im Fokus. Letztere beinhalteten bspw. PIRF und Palbociclib (CDK4/6-Inhibitor), wobei es sich um zugelassene Medikamente für Behandlungen von IPF bzw. metastasiertem Brustkrebs handelt.

Zentrale Fragestellungen & Ziele:

- (i) Werden beide SMAD2-Spleißvarianten in verschiedenen NSCLC-Zelllinien exprimiert und gibt es einen Unterschied in den Verhältnissen zueinander?

Gibt es Unterschiede zu extrahierten Alveolarepithelzellen Typ II (AECII) aus tumorfreien Geweben oder anderen benignen Zellen? Wenn beide Spleißvarianten auftreten, weisen beide C-terminale und Linker-Phosphorylierungen auf?

- (ii) Sind SMAD2 Linker-Phosphorylierungen mit Proliferation assoziiert und können diese durch Zellzyklus- oder TGF β -Inhibitoren beeinflusst werden? Hat die SMAD2 Linker-Phosphorylierung Einfluss auf das Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten?
- (iii) Generierung und Etablierung einer **A549**-Zelllinie mit einer SMAD2 Linker-Substitution (**A549L^{sub}**) des Serin-Triplets zu Alaninen (Ser245/S250/S255 \rightarrow Ala245/A250/A255) zur Unterbindung einer Phosphorylierung.
- (iv) Wie wirkt sich eine fehlende Linker-Phosphorylierung des SMAD2-Proteins auf die Spleißvarianten und C-terminale Phosphorylierung aus? Gibt es Unterschiede zu **A549 Wildtyp (A549^{WT})**-Zellen? Sind Unterschiede auf verschiedenen zellulären Ebenen aufgrund einer Linker-Substitution nachweisbar? Welche funktionellen Unterschiede ergeben sich daraus bspw. im Hinblick auf Proliferation, Migration und Invasion, wenn SMAD2 nicht innerhalb der Linker-Domäne phosphoryliert wird?
- (v) Gibt es Unterschiede in der TGF β -Signal Prozessierung, wenn eine SMAD2 Linker-Phosphorylierung unterbunden wird?

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle verwendeten Geräte, Chemikalien, Reagenzien und Kits in den Anhängen I-III hinterlegt. Pufferlösungen wurden unter Verwendung von Reinstwasser (Millipore) hergestellt. Zellkultur- und Reaktionsgefäße wurden von der Firma Corning oder Sarstedt verwendet und Glaswaren stammten von der Firma Schott. Pipetten und Pipettenspitzen wurden von den Firmen Corning, Greiner und Eppendorf bezogen.

2.1.2 Humanes Patientenmaterial & Ethik

Für die experimentellen Arbeiten wurden im Rahmen des Forschungsverbundes „**Deutsches Zentrum für Lungenforschung**“ (**DZL**) humane frische Lungengewebe zur Extraktion von Primärzellen verwendet. Letztere stammten von der LungenClinic Grosshansdorf und dort vorgenommener Lob- bzw. Pneumektomien aufgrund therapeutischer Notwendigkeit. Die Gewebe wurden zur Diagnose in die Pathologie des Forschungszentrums Borstel überstellt und überschüssiges Material für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt. Die Verwendung wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt (Aktenzeichen 07-157; 14-043) wie auch die Verwendung von Archivmaterial und Patientenbasisdaten (Aktenzeichen 18-026). Eine Gesamtübersicht des verwendeten humanen Materials wurde in den Anhängen IV und V hinterlegt. Blutproben gesunder Spender für T-Zellen Extraktionen wurden über das Forschungszentrum Borstel erhalten.

2.1.3 Humane Zelllinien

Für die Experimente wurden fünf humane NSCLC-Zelllinien verwendet. Genauere Angaben können der nachstehenden Tabelle entnommen werden (Tab. 1). Die Kultivierung der Zellen wird im Methodenteil näher erläutert. Die Zelllinien A549 und H520 wurden über die **American Type Culture Collection (ATCC)** bezogen. Die Zelllinien H838, H1650 und H1975 waren eine freundliche Leihgabe von Prof. Ursula Klingmüller (DKFZ).

Tab. 1: Verwendete NSCLC-Zelllinien & bekannte Mutationen.

| Bezeichnung | Subtyp | Geschlecht | Alter (Jahre) | Mutationen |
|-------------|------------------------|------------|---------------|------------|
| A549 | Adenokarzinom | männlich | 58 | KRAS |
| H838 | Adenokarzinom | männlich | 59 | MET, TP53 |
| H1650 | Adenokarzinom | männlich | 27 | EGFR |
| H1975 | Adenokarzinom | weiblich | unbekannt | EGFR |
| H520 | Plattenepithelkarzinom | männlich | unbekannt | unbekannt |

2.1.4 Antikörper

Verwendete Antikörper, deren Wirtsspezies und Bezugsquellen können der folgenden Tabelle entnommen werden. Darüber hinaus ebenfalls, bei welchen Methoden diese Anwendung fanden. Es kamen sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper zum Einsatz. Verwendete Isotyp-Kontrollen wurden ebenfalls an gleicher Stelle hinterlegt (Tab. 2). Die eingesetzten Verdünnungen werden im jeweiligen Methodenteil separat angegeben.

Tab. 2: Antikörper, Isotyp-Kontrollen & Methoden.

| | Bezeichnung (Klon) | Antigen | Wirt | Firma | Methode |
|-------------|---|--|-----------|-----------------------------|--------------------|
| 1°AK | Anti-SMAD2 (D043B4) | SMAD2 total | Kaninchen | Cell Signaling Technologies | DFZ, WB |
| | Anti-SMAD3 (C67H9) | SMAD3 total | Kaninchen | Cell Signaling Technologies | WB |
| | Anti-p-SMAD2 (S464/467) (C25A9) | SMAD2 C-terminale Phosphorylierung Serin 465/467 | Kaninchen | Cell Signaling Technologies | DFZ, WB |
| | Anti-p-SMAD2 (S245/250/255) | SMAD2 Linker-Phosphorylierung S245/S250/S255 | Kaninchen | Cell Signaling Technologies | DFZ, WB, IFM, mIHC |
| | Anti-p-SMAD2 (S245/250) (2H24L4) | SMAD2 Linker-Phosphorylierung S245/S250 | Kaninchen | Thermo Fisher (Invitrogen) | WB |
| | Anti-p-SMAD2 (S250) (EPR2855(2)) | SMAD2 Linker-Phosphorylierung S250 | Kaninchen | Abcam | WB |
| | Anti-p-SMAD2 (S255); (EPR2856(N)) | SMAD2 Linker-Phosphorylierung S255 | Kaninchen | Abcam | WB, |
| | Anti-p-Histone H3 (Ser10) (11D8) Alexa Fluor® 647 | Phospho-Histon H3 Serin 10 | Maus | BioLegend | DFZ |
| | Anti-p-Histone H3 (Ser10) (11D8) pure | Phospho-Histon H3 Serin 10 | Maus | BioLegend | IFM, mIHC |
| | Anti-Pericentrin | Pericentrin | Maus | Cell Signaling Technologies | IFM |
| | Anti-Pan-Cytokreatin (AE1/AE3) | PanCK | Maus | ZytoMed Systems | IHC |
| | Anti-β-Actin; ab8226 | β-Actin | Maus | Abcam | WB |
| | Anti-CD3 (OKT3) human | CD3 | Maus | BioLegend | DFZ |
| | Anti CD45 (2D1) human Alexa Fluor® 488 | CD45 | Kaninchen | BioLegend | DFZ |
| | Anti-CD45 (D9M8I) | CD45 | Kaninchen | Cell Signaling Technologies | mIHC |
| 2°AK | IRDye® 800CW Goat anti Rabbit | Kaninchen Antikörper | Ziege | Li-COR | WB |

| | | | | | |
|------------------|---|-----------------------------|-----------|-----------------------------------|------|
| | IRDye® 680CW <i>Goat anti Mouse</i> | Kaninchen Antikörper | Ziege | Li-COR | WB |
| | Alexa Fluor® 647 <i>Goat anti Mouse (H+L)</i> | Maus Antikörper | Ziege | Thermo Fisher (Life technologies) | DFZ |
| | Alexa Fluor® 488 <i>Goat anti Rabbit (H+L)</i> | Kaninchen Antikörper | Ziege | Thermo Fisher (Life technologies) | DFZ |
| | GOXMO TRITC <i>Goat anti Mouse</i> | Maus Antikörper | Ziege | Thermo Fisher (Invitrogen) | IFM |
| | Opal HRP Polymer <i>anti Mouse & Rabbit</i> | Maus & Kaninchen Antikörper | | AKOYA Biosciences | mIHC |
| Iso-Kntr. | <i>Mouse IgG2b, κ (MPC-11) Isotype Control (Alexa Fluor® 647)</i> | Isotyp-Kontrolle | Maus | BioLegend | DFZ |
| | <i>Rabbit IgG Isotype Control (Alexa Fluor® 488)</i> | Isotyp-Kontrolle | Kaninchen | Cell Signaling Technologies | DFZ |
| | <i>Normal rabbit IgG</i> | Isotyp Kontrolle (poly) | Kaninchen | Cell Signaling Technologies | DFZ |

1°AK = Primärantikörper; 2°AK = Sekundärantikörper; Iso-Kntr. = Isotyp-Kontrolle; DFZ = Durchflusszytometrie; WB = Western Blot; IFM = Immunofluoreszenzmikroskopie; mIHC= *Multiplex* Immunhistochemie; S = Serin.

2.1.5 Software & Programme

Verwendete Software und Programme werden in den jeweiligen Methodenteilen aufgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

Alle eingesetzten Materialien wurden in steriler Zellkulturqualität bezogen oder vor Gebrauch autoklaviert. Wenn nicht anders angegeben wurden die Zellen bei 37 °C mit einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert und Zentrifugationen für 7 min bei 300 x g (RT) durchgeführt.

2.2.1.1 Kultivierung humaner NSCLC-Zelllinien

Zur Durchführung von Zellkultur-Experimenten wurden verschiedene humane Zelllinien in RPMI⁺-Medium kultiviert (Tab. 1). Zunächst wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen (T25, T75) dekantiert und die adhärennten Zellen mit PBS gespült, um Rückstände zu entfernen. Im Anschluss wurden diese mit 4 ml Trypsin/EDTA (TE)-Lösung benetzt und 6 min bei 37° C inkubiert. Nach Ablösung der *monolayer*-Kulturen von den Kulturflaschen wurden die Reaktionen durch Zugabe von je 6 ml RPMI⁺ gestoppt. Die Zellen wurden resuspendiert, in 50 ml Röhrchen überführt und pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und Zellpellets in je 10 ml RPMI⁺ resuspendiert. Je 1x10⁶ Zellen wurden in neue Kulturgefäße überführt, Kulturflaschen auf je 40 ml mit RPMI⁺ aufgefüllt und erneut inkubiert. Die

Zellkultur-Routine erfolgte in einem wöchentlichen 72 h-96 h-Rhythmus. Die Zellen wurden nicht über die 30. Passage hinaus verwendet.

2.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Zellzahlbestimmungen erfolgten mittels Neubauer-Zählkammern (*improved*). Zuvor wurden die Zellen in einer Trypanblau-Lösung (1:10) resuspendiert und je 10 μl in die Zählkammern überführt. Unter Verwendung eines Lichtmikroskops wurden vier Eckquadrate ausgezählt. Bei den Berechnungen der Zellzahlen wurden sowohl der Kammerfaktor ($\times 10^4$) als auch Verdünnungsfaktor ($\times 10$) berücksichtigt.

2.2.1.3 Extraktion von Alveolarepithelzellen Typ II (AECII)

Makroskopisch tumorfreies Patientenmaterial stammte aus der LungenClinic Grosshansdorf. Das AECII-Extraktionsprotokoll war für Gewebe bis zu 30 g bestimmt. Im Falle einer Überschreitung wurden die verwendeten Enzymmengen verdoppelt. Die Gewebe wurden bis zur Aufbereitung in RPMI-Medium (2 % Penicillin/Streptomycin (v/v)) bei 4 °C gelagert. Das folgende Schema zeigt vereinfacht die Hauptschritte der AECII-Extraktion (Abb. 4).



Abb. 4: Vereinfachter Ablauf der AECII-Extraktion aus Lungengewebe. Das Fließschema zeigt die Hauptschritte der AECII-Primärzellextraktion aus unfixierten Lungengewebe.

Zunächst wurde das Lungengewebe mit einem Skalpell in kleine Stücke zerteilt (ca. $\times 3$ mm), um eine möglichst große Gewebeoberfläche für die Enzymbehandlung zu gewährleisten. Zur Beseitigung von Rückständen (z. B. Mucus, Blut) wurde das Gewebe in ein Sieb gegeben und mit 100 – 600 ml AECII-Puffer gespült. Dieses wurde anschließend in ein Becherglas mit 80 ml vorgewärmten (37° C) AECII-Puffer überführt. Nach Zugaben von 200 mg Dispase II, 500 μl DNaseI und 100 μl Accutase wurde der Gewebe-Enzym-Mix rührend (400 rpm) für 60 min im Brutschrank inkubiert. Währenddessen wurde ein Sieb mit Nylongaze (50 μm) ausgelegt und auf ein Becherglas gesetzt. Nachdem die Inkubation beendet war wurde die Gewebe-Enzym-Suspension im Sieb ausmassiert. Dieser Schritt wurde mit einer neuen Gaze (20 μm) wiederholt. Die gewonnene Zellsuspension wurde gleichmäßig in 50 ml Rörchen überführt und diese für 15 min bei 380 x g und RT zentrifugiert. Danach erfolgten

Dekantierungen der Überstände und Zellpellet-Resuspensionen in je 30 ml AECII-Puffer. Jeder Resuspension wurden 300 µl DNase I und 30 µl Accutase zugesetzt. Im Anschluss wurden je 10 ml Dichtegradientenmedium mit 10 ml der Zellsuspension überschichtet und für 30 min bei 380 x g (RT) bei ausgeschalteter Bremse zentrifugiert.

Die intermediären Phasen wurden abpipettiert und in einem 50 ml Röhrchen vereinigt. Die gewonnenen Zellen wurden erneut mit AECII-Puffer aufgefüllt und bei 380 x g (RT) für 15 min zentrifugiert, um restliche Zelltrümmer zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 10 ml RPMI⁺-Medium resuspendiert und für den Adhärenzschritt je 1 ml in Zellkulturflaschen (T75) mit 7 ml RPMI⁺-Medium überführt. Diese wurden für 20 min inkubiert, da AECII auf Kunststoffoberflächen eine längere Zeit zum adhären benötigen als andere Zelltypen wie bspw. Immunzellen. Nicht adhären Zellen wurden mit dem Medium in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und die Kulturflaschen verworfen. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 380 x g (RT) wurde der Überstand dekantiert und eine Resuspension des Zellpellets in RPMI⁺ vorgenommen.

Nachdem die Zellzahl bestimmt wurde erfolgte eine Immunzell-Depletion mittels MACS-Isolierung (negative Selektion) über eine LD-Säule (max. Kapazität 5×10^8 Zellen). Entsprechend der Zellzahl wurden diese mit MACS-Puffer resuspendiert (1×10^7 Zellen = 80 µl MACS-Puffer) und mit CD45-*Beads* (1×10^7 Zellen = 20 µl CD45-*Bead*-Lösung) versetzt. Eine Inkubation erfolgte rotierend für 15 min bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Zellen erneut mit MACS-Puffer gewaschen (1×10^7 Zellen = 2 ml) und 7 min bei 4 °C und 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Nachdem die LD-Säule mittels einer Midi-MACS Magnethalterung am MACS-Multi Stand angeheftet wurde, erfolgte eine Equilibration mit 2 ml MACS-Puffer. Die Zellsuspension wurde auf die Säule appliziert. Nach dem Zelldurchtritt wurde diese verworfen und die eluierten AECII-Zellen gezählt. Diese standen nun für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

2.2.1.4 T-Zellen Extraktion & Expansion

Zur Gewinnung benigner T-Zellen wurde heparinisiertes Vollblut gesunder Spender verwendet. Für die Extraktionen fand das DYNAL™ Dynabeads® Untouched™ Human T Cells Kit Anwendung. *In vitro* Expansionen erfolgten unter Verwendung von Gibco™ DYNAL™ Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28-*Beads*.

Zunächst wurde das Blut mit dem gleichen Volumen an PBS verdünnt. Zur Gewinnung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (**p**eripheral **b**lood **m**ononuclear **c**ells; **PBMCs**) wurden Dichtegradientenzentrifugationen durchgeführt. Dazu erfolgten Überschichtungen mit je 20 ml des Blut/PBS Gemisches, gefolgt von einer Zentrifugation für 20 min bei 800 x g bei ausgeschalteter Bremse. Die Zellen aus den intermediären Phasen wurden entnommen und vereinigt, bevor diese zweimal mit PBS gewaschen, pelletiert und gezählt wurden. 5×10^7 PBMCs wurden in 0,5 ml Isolationspuffer (*isolation buffer*; **IB**) resuspendiert und 100 µl FCS sowie 100 µl Antikörper-Mix zugegeben. Eine Inkubation erfolgte für 20 min bei RT. Zwischenzeitlich wurden die Dynabeads® in 1 ml IB resuspendiert und unter Verwendung eines Magnettracks gewaschen. Nach Entfernung der Überstände wurden den *Beads* erneut 0,5 ml IB zugegeben. Zu den Zellen wurden 4 ml IB pipettiert, bevor diese pelletiert und der Überstand dekantiert wurde. Die Dynabeads® wurden mit den Zellen vereinigt und die Probe rotierend für 15 min bei RT inkubiert. Dem Zell-*Bead*-Mix wurden 4 ml IB zugegeben und je 1 ml der Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Trennung wurden diese für 2 min ins Magnettrack gestellt. Die Überstände enthielten die nicht-markierten T-Zellen und wurden in einem neuen Röhrchen vereinigt.

Nach der Zellzahlbestimmung wurde die T-Zell-Population geteilt. Eine Hälfte wurde mit 30 ml RPMI⁺-Medium in eine Zellkulturflasche (T75) gegeben (= nicht-aktivierte Population), die Andere wurde in 1 ml RPMI⁺ aufgenommen. Letztere erhielt zur T-Zell-Aktivierung CD3/CD28-*Beads* im Verhältnis 1:1 zur Zellzahl. Anschließend erfolgte eine rotierende Inkubation des T-Zell-*Bead*-Mix für 20 min bei RT, bevor dieser in eine Zellkulturflasche (T75) mit 30 ml RPMI⁺ überführt wurde. Das zuvor in Essigsäure (100 mM) rekonstituierte Interleukin-2 (IL2) wurde mit 30 U/ml zugegeben (= aktivierte Population). Als Kontrolle wurde das gleiche Volumen an Lösungsmittel zur nicht-aktivierten Population gegeben. Nach drei Tagen wurden die CD3/CD28-*Beads* durch eine Zentrifugation und anschließende Trennung am Magnettrack entfernt. Die *Bead*-freien Zellen wurden in Zellkulturflaschen (1×10^6 /ml) mit 30 ml RPMI⁺ überführt. Es wurden erneut 30 U/ml IL2 zugesetzt. Nicht-aktivierte Zellen wurden in der gleichen Zelldichte in frisches Medium unter Zugabe des IL2-Lösungsmittelvolumens verbracht. Die T-Zellen wurden für weitere drei Tage expandiert und standen anschließend für die Analysen bereit.

2.2.1.5 Stimulation von NSCLC-Zellen

Für Stimulationsexperimente wurden die Zelllinien wie in der nachstehenden Tabelle aufgeführt ausgesät (Tab. 3).

Tab. 3: Verwendete NSCLC-Zelllinien für Stimulationen und Zellzahlen für die Aussaat.

| Zelllinie | Zellzahl | Zellkultur-flasche | Volumen RPMI ⁺ | Inkubations-dauer | Konfluenz |
|--------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------------------|-----------|
| A549 | 2x10 ⁶ | T75 | 20 ml | 24 h | 70 - 80 % |
| H838 | 2x10 ⁶ | T75 | 20 ml | 24 h | 70 - 80 % |
| H1650 | 2x10 ⁶ | T75 | 20 ml | 24 h | 70 - 80 % |
| H1975 | 2x10 ⁶ | T75 | 20 ml | 24 h | 70 - 80 % |
| H520 | 4x10 ⁶ | T75 | 20 ml | 24 h | 70 - 80 % |

Vor den Analysen wurden die Zellen mit verschiedenen Substanzen stimuliert. Verwendung fanden Inhibitoren gegen Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs), Pirfenidon und TGFβ1. Die genauen Bezeichnungen und Konzentrationen sowie ergänzende Informationen können der folgenden Tabelle entnommen werden (Tab. 4). Nach Aussaat der Zellen wurde die Konfluenz am Folgetag lichtmikroskopisch geprüft, das Medium dekantiert und durch 8 ml RPMI⁺ mit der entsprechenden Substanz ersetzt. Ergänzend dazu wurden die jeweiligen Lösungsmittel der Stimulanzien als Kontrollen mit den gleichen Volumina mitgeführt. Die Zellen wurden erneut für weitere 24 h bzw. 48 h inkubiert, bevor diese geerntet und gezählt wurden.

Tab. 4: Verwendete Substanzen und Konzentrationen für die Stimulation verschiedener NSCLC-Zelllinien.

| Stimulanz | Konz. | Konz. Stock | Volumen Stimulanz bzw. Lösungsmittel | Lösungs-mittel | Stimulations-volumen final (RPMI ⁺) | Inkubations-dauer |
|--------------------------------|-----------|-------------|--------------------------------------|--------------------|---|-------------------|
| CDK1-I. | 10 µM | 10 mM | 8 µl | DMSO | 8 ml | 24 h |
| CDK2-I. | 10 µM | 10 mM | 8 µl | DMSO | 8 ml | 24 h |
| Pirfenidon | 1,5 mg/ml | 10 mg/ml | 1200 µl | PBS | 8 ml | 24 h |
| Palbociclib (CDK4/6-I.) | 10 µM | 10 mM | 8 µl | ddH ₂ O | 8 ml | 24 h |
| TGFβ1 | 5 ng/ml | 1 ng/µl | 40 µl | 4 mM HCl | 8 ml | 48 h |
| Medium | --- | --- | --- | --- | 8 ml | 24 h |

CDK = *Cyclin dependent kinase*; I. = Inhibitor; Konz. = Konzentration; ddH₂O = di-destilliertes Wasser; DMSO = Dimethylsulfoxid; PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung; HCl = Chlorwasserstoff

2.2.1.6 Zellinvasions-Assay

Zur Bestimmung der Anzahl invasiver Zellen wurde ein mit Matrigel (ECM) erweitertes Transwell-System (6-Well Format) verwendet. Invasionsfähige Zellen konnten über eine perforierte Polycarbonat-Membran (8 µm) von dem apikalen in das basale Kompartiment gelangen. Dazu wurden 3x10⁶ Zellen in 30 ml RPMI⁺ in Zellkulturflaschen (T75) für 16 h

inkubiert. Am Folgetag wurde das RPMI⁺ dekantiert und durch 10 ml RPMI⁻ ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 7 h inkubiert. Währenddessen wurde das Matrigel unter Verwendung von RPMI⁻ entsprechend der Zielkonzentration verdünnt. Die Membranen wurden mit 500 µl Matrigel (210 µg/ml; Wachstumsfaktor-reduziert) beschickt. Für eine Polymerisation wurde die Matrigel-Lösung für 30 min bei 37 °C inkubiert. Basale Wells wurden mit je 2 ml RPMI⁺ vorbereitet und anschließend die apikalen Wells eingesetzt. Die geernteten Zellen wurden resuspendiert und je 3x10⁶ Zellen in 1 ml RPMI⁺ zum Matrigel gegeben. Die Transwell-Platten wurden für weitere 24 h inkubiert.

Depolymerisierungen des Matrigels erfolgten unter Verwendung der Cell Recovery Solution für 20 min bei 4 °C. Die Matrigel-Zell-Lösungen wurden in ein Röhrchen überführt und mit 1 ml RPMI⁺ verdünnt. Apikale Wells wurden in neue Kavitäten eingehängt und die Membranen mit einer vorgewärmten T/E-Lösung (37 °C) benetzt. Dafür wurden 2,5 ml in die basalen- und 1 ml in die apikalen Wells gegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 15 min bei 37 °C, damit invasive Zellen von der Membranunterseite in die basalen Wells absinken konnten. Mittels einer Pipette wurden die Zellsuspensionen aufgenommen und jeweils in 1 ml RPMI⁺ überführt. Nach einer Zentrifugation und Dekantierungen der Überstände wurden die Zellpellets in je 500 µl PBS resuspendiert und durch Zugabe von je 500 µl einer PFA-Lösung (2 %) für 10 min bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 2 ml WP wurden die Zellzahlen aus dem apikalen- und basalen-Well unter Verwendung des MQ10-Analyzer bestimmt. Invasive Zellen wurden als prozentualer Anteil der Gesamtzellzahl berechnet.

2.2.1.7 Wundheilungs-Assay

Die Zellen wurden in 24-Well-Platten mit 2-Well Self-Insertion Culture Inserts (ibidi) ausgesät. In jede Seite eines Einsatzes wurden 5x10⁴ Zellen in 50 µl RPMI⁺ gegeben und mit 1 ml RPMI⁺ umspült. Nachdem die Zellen am nächsten Tag adhärirt waren, wurden die Einsätze mittels einer Pinzette entfernt. Das Medium wurde abgenommen und durch 1,5 ml frisches ersetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für weitere 24 h.

Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 1,5 ml einer PFA/PBS-Lösung (2 %) für 15 min bei RT fixiert. Die Lösungen wurden entfernt und durch vorgekühltes Methanol (-20°C) ersetzt. Nach zweimaligem Waschen erfolgte eine Färbung mit DAPI (3 µM). Die noch offenen Flächen mit den angrenzenden Zellen wurde unter Verwendung eines Immunfluoreszenz-

Mikroskops (Nikon Eclipse 80i) als Übersicht bei 4-facher Vergrößerung anhand des DAPI-Signals detektiert. Mittels ImageJ Software (V1.50i) und Verwendung des *wound-healing tools* wurden die verbliebenen freien Flächen analysiert. Die erhaltenen Werte der A549^{WT}- wurden mit denen von A549L^{sub}-Zellen verglichen. Anhand der normalisierten Daten (n = 4) wurde anschließend die Migrationsfähigkeit verglichen.

2.2.1.8 Soft-Agar Kolonieformations-Assay

Ein Schlüsselmerkmal transformierter Zellen ist das ankerlose Wachstum unabhängig von festen Oberflächen. Unter Verwendung eines Soft-Agar Kolonieformations-Assays kann dies *in vitro* charakterisiert werden (70). Zunächst wurden dazu die Böden von 6-Well Platten mit 1,5 ml einer 0,6 % *low-melt* Agarose-RPMI⁺-Lösung bedeckt. Nach Polymerisierung für 30 min bei 37 °C wurden die Platten für 10 min bei 4 °C gekühlt. Währenddessen wurden die Zellen geerntet, gezählt und mit einer Zellzahl von 5×10^3 Zellen/ml RPMI⁺ eingestellt. Je 2,5 ml der Zellsuspensionen wurde das gleiche Volumen 0,6 % *low-melt* Agarose-RPMI⁺-Lösung zugegeben. Von der resuspendierten Zell-Agar-Lösung (0,3 %) wurden 2,5 ml ($2,5 \times 10^3$ Zellen/ml) auf die zuvor präparierten 6-Well Vertiefungen gegeben. Für eine vollständige Polymerisierung wurden die Platten für 10 min bei 4 °C gekühlt und im Anschluss daran für 2 h bei 37°C inkubiert. Jedem Well wurden dann 300 µl RPMI⁺ zugesetzt und die Platten für 21 Tage inkubiert. Zweimal wöchentlich wurde das Medium abgenommen und durch 300 µl frisches ersetzt.

Nach Beendigung der Inkubationsdauer wurde das Medium abgenommen und die Wells mit PBS gewaschen. Unter Verwendung von 1 ml EtOH (100 %) wurden die Zellen jedes Wells für 10 min bei RT fixiert. Die Platten wurden drei Mal mit PBS gespült und 300 µl einer Kristallviolett-Lösung (0,01 %) zur Färbung der Kolonien in die Wells gegeben. Nach einer Inkubation von 20 min bei RT wurden die Färbelösungen abpipettiert, durch 1 ml ddH₂O ersetzt und für 15 min auf einem Horizontalschüttler gewaschen. Die Lösungen wurden abgenommen und die Kolonien unter dem Lichtmikroskop bei 4-facher Vergrößerung detektiert. Aufnahmen erfolgten durch ein Smartphone (Huawei P9) mit Okular-Adapter. Es wurden jeweils fünf Bildaufnahmen je Well aus den gleichen Regionen aufgenommen. Die Bilder wurden für die Erfassung der Koloniezahlen unter Verwendung des *Colony counter*

plugins der ImageJ Software (V1.50i) manuell (≥ 10 Zellen) erfasst. Die erhaltenen Mittelwerte wurden in GraphPad Prism (V6) statistisch analysiert und grafisch visualisiert.

2.2.2 FLUORESZENZFÄRBUNGEN

2.2.2.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für Proteinlokalisationsanalysen fand das Verfahren der Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) Anwendung. Es wurden 1×10^5 Zellen in 200 μ l RPMI⁺-Medium aufgenommen und auf Deckgläschen in 12-Well-Platten ausgesät und für 24h inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt, die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen und mit 200 μ l PFA (2 %) für 10 min bei RT fixiert. Nach Entfernung der Lösungen wurden die Zellen drei Mal mit jeweils 1 ml Waschpuffer (WP) gespült. Permeabilisierungen erfolgten durch Zugaben von je 200 μ l einer Triton-Lösung (0,25 %) für 10 min bei RT. Nach dreimaligem Waschen wurden diese mit PBS gespült und je 200 μ l einer Blockierlösung (PBS/BSA 1 %) in die Wells pipettiert. Die Platten wurden für 30 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurden die Primärantikörper- oder Rhodamine-Phalloidin-Lösungen unter Verwendung einer PBS/BSA-Lösung (1 %) der Tabelle entsprechend verdünnt (Tab. 5). Blockierlösungen wurden nach der Inkubation entfernt, durch die entsprechenden Antikörper- bzw. Färbelösungen ersetzt und für 1 h bei RT inkubiert.

Tab. 5: Verwendete Antikörper für IFM-Analysen.

| Zielprotein/ Struktur | 1° AK/ Farbstoff | Verdünnung 1° AK | 2° AK/ Fluorochrom | Verdünnung 2° AK |
|-----------------------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| pSMAD2 Linker (Ser245/250/255) | pS2L | 1:50 | G α Rb AF488 | 1:2000 |
| pHistone H3 (Ser10) | pHH3 | 1:20 | G α M TRITC | 1:500 |
| Pericentrin | PCNT | 1:100 | G α M TRITC | 1:500 |
| F-Actin Filamente | Rhodamine- Phalloidin | --- | TRITC | 1:500 |

G = Goat; M = Mouse; Rb = Rabbit; AF488 = AlexaFluor™ 488; TRITC = Tetramethylrhodamin-isothiocyanat

Die Deckgläschen wurden drei Mal mit PBS gewaschen und 200 μ l der jeweils vorbereiteten Sekundärantikörper-Lösungen hinein pipettiert. Die Platten wurden für 45 min (dunkel) bei RT inkubiert. Zur Kontrolle der Sekundärantikörperspezifität wurden stets Färbungen ohne Primärantikörper mitgeführt. Zur Darstellung der Nuklei wurden die Zellen erneut gewaschen und mit 200 μ l einer DAPI-Lösung (3 μ M) für 20 min bei RT inkubiert. Die

Lösungen wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Deckgläschen aus den Plattenvertiefungen entnommen und auf Fluoromount G präparierten Objektträgern platziert. Bis zu den mikroskopischen Analysen wurden die Zellpräparate dunkel und bei 4 °C gelagert. Ergänzende Angaben zu den Antikörpern wurden in Tabelle 2 hinterlegt.

Detektionen erfolgten durch die Verwendung eines Immunfluoreszenz-Mikroskops (Nikon Eclipse 80i), das mit einer geeigneten Kamera (Leica DFC450 C) ausgestattet war. Die Filter zur Sekundärantikörperdetektion wurden entsprechend der Fluorochrome gewählt und Fluoreszenzsignale mittels der FixFoto Software (V2.79) dokumentiert. Für eine Vergleichbarkeit wurden die Belichtungszeiten anhand von Sekundärantikörperkontrollen für jedes Fluorochrom eingestellt und für die Analysen beibehalten. Überlagerungen der Signale erfolgten unter Verwendung der ImageJ Software (V1.50i). Zur Visualisierung wurden Veränderungen der Bildwerte wie bspw. Helligkeit und Kontrast erst nach einer Überlagerung der Fluoreszenzkanäle vorgenommen.

2.2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Messtechnik der **Durchflusszytometrie (DFZ)** dient der quantitativen Bestimmung von Makromolekülen wie bspw. Zellen. Das Prinzip beruht auf einer hydrodynamischen Fokussierung durch eine Flusszelle, wobei die in einer Suspension enthaltenen Zellen vereinzelt werden. Diese passieren Laser unterschiedlicher Wellenlängen und werden anhand ihrer Lichtstreuung beim Laserdurchtritt in ihrer Größe (*forward scatter*, **FSC**) und Granularität (*side scatter*, **SSC**) analysiert. Neben Oberflächenmoleküle können auch intrazelluläre Proteine oder Peptide durch Antikörper und Fluorochrome detektiert werden. Zudem ist es möglich den DNA-Gehalt bspw. durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe wie DAPI zu quantifizieren. Fluoreszenz- und Streulichtsignale werden über verschiedene Spiegel- und Filtersysteme zu den entsprechenden *photomultiplier tubes* geleitet, verstärkt und detektiert (71) (72). Aufgenommene Signale wurden mittels einer geeigneten Software dargestellt und analysiert.

Zellanalysen erfolgten in der vorliegenden Arbeit wurde durch Verwendung des MQ10-Analyzers. Das System verfügt über drei Laser und erlaubte durch verschiedene

Filtersysteme simultane Fluoreszenzdetektionen von bis zu acht Fluorochromen. Verwendete Laser, Filter und Fluorochrome sind in der folgenden Tabelle angegeben (Tab. 6).

Tab. 6: Laser, Filter und Fluorochrome (MQ10).

| Laser & Wellenlänge | Kanal | Filter (nm) | Fluorophor/Parameter |
|---------------------|------------|------------------|-----------------------|
| Violett 405 nm | V1 | 450/50 | DAPI |
| Blau 488 nm | B1 | 525/50 | Alexa Fluor® 488 |
| Blau 488 nm | FSC SSC | 488/10 488/10 | Größe Granularität |
| Rot 635 nm | R1 | 655-730 | Alexa Fluor® 647 |

2.2.2.2.1 Antikörper

Die eingesetzten Antikörper und Verdünnungen bzw. Konzentrationen können der folgenden Tabelle entnommen werden (Tab. 7). Ergänzende Informationen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 7: Antikörper & Verdünnungen für DFZ-Analysen.

| AK-Typ | Bezeichnung/Fluorochrom | Verdünnung bzw. Konzentration |
|--------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Primärantikörper | S2 total/AF488 | 1:500 |
| | pS2L/AF488 | 1:50 |
| | pS2C/AF488 | 1:100 |
| | pHH3/AF647 | 1:20 |
| Sekundärantikörper | GαRb/ AF488 | 1 µg/ml |
| Isotyp-Kontrollen | Normal Rb IgG | äquivalent |
| | Iso-Kntr. IgG AF647 | äquivalent |

Für die Färbungen wurden jeweils 1×10^6 Zellen verwendet. Dazu wurden diese zentrifugiert, Überstände dekantiert und Zellpellets in 500 µl PBS resuspendiert. Fixierungen erfolgten durch Zugaben von je 500 µl einer PFA -Lösung (2 %) für 10 min bei RT. Die Zellsuspensionen wurden durch Zugabe von jeweils 2 ml Waschpuffer (WP; 1 x PBS + 1 % FCS) und einer anschließenden Zentrifugation gewaschen und Überstände dekantiert. Permeabilisierungen erfolgten in je 1 ml vorgekühlten (-20°C) MeOH für 30 min bei -20°C. Währenddessen wurden die Primärantikörper mit dem entsprechenden Volumen WP verdünnt. Wenn im Protokoll vorgesehen wurde ebenfalls pHH3 simultan mitgeführt. MeOH-Lösungen wurden nach der Inkubation zwei Mal mit je 2 ml WP verdünnt, die Zellen zentrifugiert und Überstände verworfen. Die zuvor verdünnten Primärantikörper wurden auf die Pellets gegeben und resuspendiert. Eine Inkubation erfolgte für 60 min bei RT. Nach zweimaligem

Waschen mit je 2 ml WP wurden die Zellpellets in je 100 µl Sekundärantikörper-Lösung resuspendiert. Eine Inkubation erfolgte für 45 min bei RT (dunkel). Der Waschschrift wurde zwei Mal mit je 2 ml WP wiederholt. Anschließend erfolgten Resuspensionen in je 500 µl einer DAPI-Lösung (3 µM). Vor den Analysen wurden die Zellen mind. für 15 min (dunkel) bei 4°C inkubiert. Messungen erfolgten mit dem MQ10 mittels MACSQuantify™ Software (V2.8). Für Isotyp-Kontrollen wurde gleichermaßen verfahren. Die Einstellungen sind in den nachstehenden Tabellen aufgeführt (Tab. 8 + 9).

Tab. 8: MACSQuantify™ Experiment Einstellungen.

| Bezeichnung | Kanal | Skalierung | PMT [Volt] |
|--------------|-------|------------|------------|
| Größe | FSC | hyper log | 190 |
| Granularität | SSC | hyper log | 200 |
| S2 total | B1 | hyper log | 320 |
| pS2L | | | 320 |
| pS2C | | | 360 |
| pHH3 | R1 | hyper log | 320 |
| DAPI | V1 | linear | 290 |

Tab. 9: MACSQuantify™ Instrument Einstellungen.

| Flussrate | Modus Probenvermischung | Modus Reinigung nach jeder Messung | Analyse Volumen [µl] |
|-----------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| Medium | <i>Gentle</i> | <i>Fast</i> | 450 |

2.2.2.2.2 Gating-Strategie

Die Daten der DFZ-Analysen wurden wie in der nachfolgenden Abbildung schematisch gezeigt unter Verwendung der FCS Express Software (V6) (DeNovo) prozessiert (Abb. 5). Während Fluoreszenzsignale der DAPI-Färbungen mit einer linearen Achsenskalierung versehen wurden, erfolgte eine Skalierung für die weiteren Fluoreszenzkanäle (B1, R1) biexponentiell. Zellhauptpopulationen wurden zunächst anhand der FSC- und SSC-Signale detektiert und als *density plot* dargestellt (Abb. 5, A). Die in *gate 1* enthaltenen Zellen wurden einem Dublettenausschluss unterzogen, um lediglich Einzelzellen für weitere Analysen zu berücksichtigen. Dies erfolgte anhand der Flächenwerte (*area = A*) und Signalhöhe (*height = H*) des FSC-Kanals, die als *dot plot* dargestellt wurden. Alle Signale, die nicht proportional erschienen, wurden durch das *gate 2* für weitere Analysen eliminiert. Erfasste Einzelzellen im *gate 2* bildeten die Zellpopulationen für weitere Analysen (Abb. 5, B).

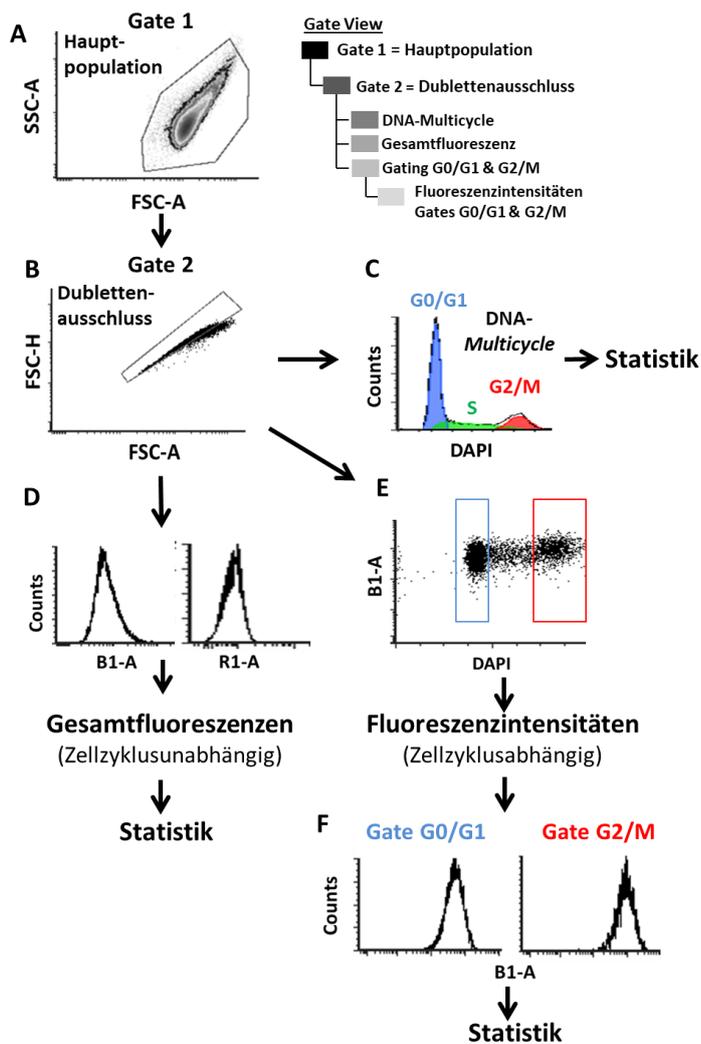


Abb. 5: Gating-Strategien DFZ-Analysen. Die Abbildung gibt schematisch und beispielhaft das Vorgehen zur Datengenerierung der Zellanalysen wieder. Das *gate 1* erfasste die Hauptzellpopulation (A) und bildete die Grundlage für den nachfolgenden Dublettenausschluss (B), der durch *gate 2* erfolgte. Grundsätzlich wurden alle Daten ausschließlich nach dem Dublettenausschluss erfasst und berücksichtigten folglich Einzelzellereignisse. Die Zellzyklusphasen (C) wurden unter Verwendung der *Multicycle*-Funktion der FCS Express Software (V6) ermittelt. Gesamtfluoreszenzen von Einzelzellen wurden unabhängig vom Zellzyklus als Histogramme dargestellt (D) und die arithmetischen Mittel der Signalintensitäten erfasst. Zellzyklusabhängige Analysen wurden anhand der DAPI Signale zu den jeweiligen Antikörperfärbungen durch Platzierung zweier *gates* ermöglicht (E). Signalintensitäten der entsprechenden Zellzyklusphasen wurden als separate Histogramme dargestellt und arithmetische Mittel für statistische Vergleiche exportiert.

Zellzyklusanalysen wurden mittels der *Multicycle*-Funktion (*model 5*) durchgeführt. Die Funktion berechnet auf Grundlage der linearen DAPI-Signalintensitäten (V1-A) die drei diploiden Hauptphasen des Zellzyklus (G0/G1-, S- und G2/M-Phase) (Abb. 5, C). Im nächsten Schritt wurden die Gesamtfluoreszenzen für die jeweiligen Antikörper erfasst. Dazu wurden die Zellpopulationen nach dem Dublettenausschluss als Histogramme ausgegeben und Fluoreszenzintensitäten des jeweiligen Kanals (x-Achse; B1-A, R1-A) zur Anzahl der Zellen (y-Achse; *counts*) dargestellt. Die arithmetischen Mittel wurden anschließend zur statistischen Auswertung herangezogen. Für detailliertere Begutachtungen von Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit einer Zellzyklusphase wurden DAPI-Signale zu den jeweiligen Fluoreszenzintensitäten des Sekundärantikörpers mittels *dot plots* dargestellt. Dieses Vorgehen ermöglichte eine Platzierung von zwei weiteren *gates*, um Signalintensitäten von Zellen in G0/G1- bzw. G2/M-Phasen getrennt voneinander zu analysieren (Abb. 5, E).

Zellzyklusabhängige arithmetische Mittel wurden ebenfalls einer statistischen Auswertung unterzogen (Abb. 5, F).

2.2.2.2.3 Datenanalyse

Die Rohdaten wurden durch die *Batch*-Funktion der Software in MS Excel (Format .xlsx) exportiert und \log_2 -transformiert. Für einen statistischen Vergleich wurden die Daten in die GraphPad Prism Software (V6) überführt. In Abhängigkeit der Vergleichsgruppen wurden T-Tests oder ANOVAs mit verschiedenen Signifikanzniveaus durchgeführt und grafisch dargestellt.

2.2.2.3 Proliferations-Assay mittels CellTrace™

Zum Vergleich der Proliferationsraten von A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen wurde das CellTrace™ Far Red Cell Proliferation-Kit (Thermo Fisher) verwendet. CellTrace™ ist plasmamembranpermeabel und bindet kovalent an freie Amine, sowohl an der Oberfläche als auch intrazellulär. Durch Proliferationsereignisse fluoreszenzmarkierter Zellen kommt es zu einer Verringerung des Farbstoffanteils. Ein Vergleich der Fluoreszenzintensitäten vom Zeitpunkt der Aussaat (Startwert) mit denen nach einer 48 h Inkubation (Endwert) kann daher Aufschluss über die Proliferationsrate liefern. Nach Verwendung wurde der in DMSO gelöste Farbstoff (1 mM) bei -20 °C gelagert und für max. 4 Wochen verwendet. Die Analysen erfolgten mittels des MQ10-Analyzers.

2.2.2.3.1 Durchführung

Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen in eine Zellkulturflasche (T75) überführt und für 24 h in Medium inkubiert. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden Zelllinien mit einer ähnlichen Passagenzahl (± 2) verwendet. Jeweils 2×10^6 Zellen wurden pelletiert und in CellTrace™-Lösungen (4 μ l CellTrace™ + 2 ml PBS) resuspendiert. Eine Inkubation erfolgte für 20 min bei 37 °C. Anschließend wurden je 5 ml Medium verwendet, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Proben wurden 5 min bei RT inkubiert, danach zentrifugiert und Überstände dekantiert. Resuspensionen wurden in 4 ml vorgewärmtem Medium durchgeführt, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 10 min. Danach wurden die Zellpopulationen geteilt. 1×10^6 Zellen wurden in eine Zellkulturflasche (T75) gegeben und für weitere 48h bei 37 °C inkubiert. Die verbliebenen Zellen wurden pelletiert und Überstände dekantiert. Es folgten

Resuspensionen in je 500 µl PBS und Fixierungen des CellTrace™-Farbstoffs durch je 500 µl einer PFA -Lösung (2 %). Nach 10 min wurden die fixierten Zellen zentrifugiert und Überstände dekantiert. Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und in jeweils 500 µl PBS resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden diese bei 4°C (dunkel) gelagert (Startwert). Nach Beendigung der 48 h Inkubation wurden die mit CellTrace™ markierten Zellen geerntet und gezählt. Fixierungen erfolgten wie zuvor beschrieben (Endwert).

Beide Zellpopulationen wurden pelletiert und unter Verwendung von 1 ml vorgekühlten MeOH (100 %) für 20 min bei -20 °C permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 2 ml WP wurden die Überstände dekantiert und Zellpellets in je 500 µl WP mit DAPI (3 µM) resuspendiert. Bis zu den Messungen am MQ10-Analyser wurden die Proben mind. 15 min bei 4 °C (dunkel) gelagert.

2.2.2.3.2 Fluoreszenzanalyse & Rohdaten

Die Zellanalysen erfolgten mit dem MQ10-Durchflusszytometer. Verwendete Einstellungen sind den Tabellen 8 & 9 zu entnehmen. Detektionen des CellTrace®-Farbstoffs erfolgten bei 360 V mittels des R1-Lasers. Aus den Histogrammen wurden die Gesamtfluoreszenzintensitäten ermittelt (Abb. 5, D). Zellzyklusanalysen erfolgten unter Verwendung der Multicycle-Funktion (Abb. 5, C). Die Rohdaten wurden für weitere Berechnungen in MS Excel (Format .xlsx) exportiert.

2.2.2.3.3 Datenauswertung

Die erhaltenen Startwerte der CellTrace™-Markierung wurden mit den Werten nach einer 48 h Kultivierung verglichen. Anhand der jeweiligen Startwerte (=100 %) wurden die Abnahmen der Fluoreszenzintensitäten bestimmt. Für eine vergleichende Zellzyklusanalyse wurden die prozentualen Anteile der Zellen nach 48 h in den Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M beider Zelllinien herangezogen. Die Daten wurden im Anschluss mittels GraphPad Prism Software (V6) auf Signifikanz geprüft.

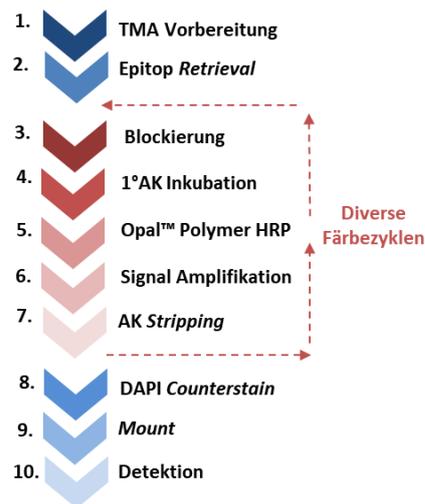
2.2.2.4 Multiplex-Immunhistochemie

Das Verfahren der *multiplex*-Immunhistochemie (**mIHC**) erlaubt simultane Detektionen verschiedener Zielstrukturen von formalinfixierten Gewebeschnitten bzw. -Arrays sowie nachgeschaltete Quantifizierungen einzelner Signale (73) (74). Die Gewebe-Arrays wurden

von Herrn Dr. Sebastian Marwitz und Herrn Christian Rosero in der Pathologie des Forschungszentrums Borstel erstellt und gefärbt. Hierfür wurden verschiedene Antikörper nacheinander in Zyklen aufgetragen und entfernt (*stripping*), ohne bereits spezifisch gebundene Signalamplifikationen zu beeinträchtigen. Anschließend konnte eine weitere Färbung vorgenommen werden und der Zyklus wiederholte sich (Abb. 6). Um sicherzustellen, dass wiederholende FärbeprozEDUREN die Fluorochromdetektionen nicht beeinträchtigen, wurden zuvor Einzelfärbungen prozessiert und die Reihenfolge der Primärantikörper festgelegt. Detektionen erfolgten unter Verwendung des Vectra® Polaris™ 1.0 (Akoya Biosciences). Das System ist darüber hinaus mit der InForm Tissue Finder Software™ ausgestattet, die durch automatisierte und trainierbare Algorithmen eine Erkennung und Segmentierung spezifischer Gewebe und Identifizierung von Phänotypen ermöglicht.

Abb. 6: Schematischer Ablauf der mIHC.

Das Fließschema fasst das Prinzip und die Hauptschritte der mIHC-Färbungen zusammen. Wiederholende Färbeyklen erlaubten Markierungen mehrerer Zielstrukturen auf einem Gewebeschnitt bzw. Gewebe-Array (rot; 3. – 7.), bevor eine Nuklei Detektion via DAPI erfolgte. Detektionen erfolgten mittels des Vectra® Polaris™ (Akoya Biosciences). Hinweise: TMA = *Tissue microarray*; HRP = *Horseradish peroxidase*; 1°AK = Primärantikörper.



2.2.2.4.1 Färbungen von Schnittpräparaten

Entparaffinierte Schnitte wurden mit dem Opal™ Polaris 7-Color Stain Kit (Akoya Biosciences) gemäß den Anweisungen des Herstellers gefärbt. Die Reagenzien wurden zuvor unter Verwendung von DMSO entsprechend rekonstituiert. Opal™ Fluorophor-Arbeitslösungen wurden vor jeder Färbung frisch angesetzt und mit 1x Amplification Diluent entsprechend verdünnt. Die FärbeprozEDUREN und Zyklen sind der nachstehenden Tabelle zu entnehmen (Tab. 10). Die Detektionszeiten für die jeweiligen Fluoreszenzkanäle betragen für DAPI: 2 ms, Opal570: 28 ms, Opal690: 9,06 ms, Opal520: 7 ms und *sample AF*: 100 ms. Verwendetes Patientenmaterial ist im Anhang IV hinterlegt.

Tab. 10: Verwendete Antikörper, Fluorophore und Färbezyklen in der mIHC.

| Zyklus | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---|
| Antigen Retrieval/ Stripping (pH6) | AR-Puffer6 | AR-Puffer6 | AR-Puffer6 | AR-Puffer6 | AR-Puffer6 |
| Einst. Mikrowelle | 1 min 1000W; 10 min 100W | 1 min 1000W; 5 min 100W |
| Blocking (3% H₂O₂) | 10 min | --- | --- | --- | --- |
| 1x TBST [min] | 3x je 2 min |
| 1°AK Verdünnung Inkubation [min]/Temp. | panCK 1:300 45/RT | CD45 1:800 45/RT | pS2L 1:100 45/RT | pHH3 1:100 45/RT | Spectral DAPI (3 Tropfen in 1000 µl 1x PBS) |
| 1x TBST [min] | 3x je 3 min | --- |
| Opal™ HRP Polymer M+Rb [min]/Temp | 10/RT | 10/RT | 10/RT | 10/RT | 5/RT |
| 1x TBST [min] | 3x je 3 min |
| Opal™ fluorophore Verdünnung, λ_{ex} [nm] und Inkubation [min]/Temp. | 1:150 690 10/RT | 1:150 570 10/RT | 1:100 620 10/RT | 1:800 620 10/RT | --- 358 --- |
| 1x TBST [min] | 3x je 3 min | ddH ₂ O 2min |
| Mount | | | | | ProLong® Gold |

2.2.2.4.2 Datenanalyse

Die Daten wurden von Herrn Dr. Sebastian Marwitz analysiert. Dafür wurde mittels Phenochart (V1.0.12) (Akoya Biosciences) ein *grid* über die Positionen gelegt und mittels Koordinaten annotiert. Repräsentative Bereiche von allen TMAs wurden verwendet, um einen Auswertalgorithmus zu generieren. Bildauswertungen erfolgten mittels InForm (V2.4.5) Software (Akoya Biosciences). Es erfolgten Gewebssegmentierungen (Tumor vs. Stroma vs. leerer Bereich/ Bereich mit Bildartefakten), adaptive Zellsegmentierungen und *machine-learning*-basierte Zellklassifikationen. Erstere erfolgten durch *point&click* Annotationen. Die Genauigkeit (*accuracy*) lag bei $\geq 95\%$. Für die Zellklassifikationen wurde für jeden Zelltyp bzw. IHC-Marker ein eigenes Projekt mit denselben Gewebs- und Zellsegmentierungsparametern erstellt. Repräsentative Zellen eines jeden Markers wurden über mehrere Bilder/Patienten hinweg zum Trainieren händisch annotiert. Die Gewebssegmentierungen und Zellklassifikationen wurden über alle Bilder hinweg durchgeführt und bei Bedarf erneut trainiert. Die Ergebnisse wurden mittels des R *packages*

PhenoptR Reports (V0.2.1) übereinandergelegt, um ein konsolidiertes Tabellenblatt zu erhalten. Marker-Kombinationen wurden in Relation zur Gewebsfläche (mm^2) exportiert. Replikate von mehreren Stenzen pro Patient wurden mittels der R *packages* dplyr und tidyverse gemittelt und für weitere Analysen exportiert (Format .txt).

2.2.3 PROTEINCHEMIE

2.2.3.1 Proteinextraktion & Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Die geernteten Zellen wurden unter Verwendung des *Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER; Thermo Fisher)* in Ergänzung mit Halt-Protease und Halt-Phosphatase Inhibitor Cocktails (1:100) (Thermo Fischer) lysiert. Es wurden 100 μl je Zellpellet (1×10^6 - 4×10^6 Zellen) verwendet. Eine Inkubation erfolgte auf Eis für 30 min. Im Anschluss daran wurden die Zelllysate für 10 min bei $\geq 10.000 \times g$ zentrifugiert. Gewonnene Überstände wurden abgenommen und in neue Reaktionsgefäße überführt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde das Pierce™ BCA™ Protein-Assay Kit (Thermo Fischer) nach Herstellerangaben verwendet. Das Prinzip beruht auf der Biuretreaktion, wobei unter alkalischen Bedingungen ein Chelatkomplex mit violetterm Farumschlag entsteht nachdem zweiwertige Kupfer-Ionen an der Peptidbindung zu einwertigen Ionen reduziert werden. Die Extinktion des Komplexes ist über einen breiten Konzentrationsbereich (20-2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) annähernd linear und kann fotometrisch detektiert werden (75). Bei jeder Durchführung wurde zunächst eine Bicinchoninsäure (BCA)-Kupfersulfat-Lösung (Lösung A (BCA/0,1 M NaOH) + Lösung B (4 % Cu_2SO_4)) im Verhältnis 50:1 hergestellt.

Nach Verdünnung der Proben (1:10) in Lyse-Puffer wurden je 25 μl in 96-Well Platten überführt. Auf gleiche Weise wurde mit den Kalibrierproben aus dem Kit verfahren. Es wurden acht Standardwerte mit Konzentrationen von 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aus Rinderserumalbumin zur Erstellung einer Kalibriergeraden mitgeführt. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Ebenfalls wurden zur Messkorrektur zwei Leerwerte appliziert, die kein Protein beinhalteten. Fehlende Volumina der Proteinlysate wurden durch Lyse-Puffer ersetzt. Den Proben und Kontrollen wurden je 200 μl der BCA-Kupfersulfat-Lösung zugegeben und die Platten dunkel bei 37 °C für 30 min inkubiert. Intensitätswerte nach den Farbumschlägen wurden fotometrisch unter Verwendung des Magellan™ *microplate readers* (Tecan) bei einer Wellenlänge von 562 nm

detektiert. Mit der zugehörigen Software wurde eine Kalibriergerade erstellt und die Konzentrationswerte der gemessenen Proben berechnet.

2.2.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Dazu werden Proteine unter Zugabe von SDS und Dithiotreitol (DTT) denaturiert, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Dies bewirkt eine Molekülstreckung und Proteine erhalten negative Ladungen. Das Polyacrylamidgel fungiert wiederum als eine Art „Sieb“ für die Molekülgröße. Dabei kann die Porenweite über die eingesetzte Menge beeinflusst werden. Durch das Anlegen einer Spannung (Gleichstrom) wandern Proteine aufgrund einer einheitlichen negativen Ladung in Abhängigkeit ihrer Größe unterschiedlich schnell durch die Gelmatrix. Durch eine gleichzeitige Trennung von Proteinen mit bekannter Größe kann später auf das Molekulargewicht geschlossen werden (76) (77). Für die Experimente wurden NuPAGE™ Bis-Tris-Gradientgele (4-12 %) (Thermo Fisher) mit dem XCell SureLock Elektrophorese System (Invitrogen) verwendet.

2.2.3.2.1 Probedenaturierung & Puffer

Es wurden je 25 µg Gesamtprotein eingesetzt und mit der entsprechenden Menge des reduzierenden SDS-Probenladepuffers (pH 6,8) versehen. Dieser enthielt neben SDS, Bromphenolblau, Glycerol und TRIS-HCl ebenfalls DTT. Zur Denaturierung wurden die Proben für 10 min bei 99 °C auf einem Heizblock erwärmt. Als Laufpuffer wurde 1 x SDS-3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)-Puffer (Thermo Fisher) verwendet und in die Elektrophoresekammern gefüllt. MOPS-Puffer in der inneren Elektrophoresekammer enthielt zusätzlich Novex™ NuPAGE™ Antioxidans (0,1 %).

2.2.3.2.2 Proteintrennung

Die denaturierten Proben wurden in die entsprechenden Taschen des Gels appliziert. Bei jedem Gel wurden 7,5 µl des Chameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder (LiCOR) als Größenstandard mitgeführt. Die aufgetragenen Proben wurden zunächst für 20 min bei 20 V im aufgelagerten Sammelgel gestaut, um ein gleichmäßiges Eindringen ins Trenngel zu gewährleisten. Die Stromspannung wurde auf 120 V erhöht und Proteine für 90 min getrennt.

2.2.3.3 Western-Blot Analyse

Die mittels SDS-PAGE getrennten Proteine wurden unter Anwendung des Nassblotverfahrens (78) elektrophoretisch auf Protran® Whatman® Nitrocellulosemembranen (0,45 µm) (Fisher Scientific) transferiert. Der Proteintransfer erfolgte unter Verwendung des XCell II Blot Moduls in einer Tankblotkammer (Invitrogen). Diese wurde mit 1x Novex™ Tris-Glycin Transferpuffer (Thermo Fisher) befüllt. Der Blot-Vorgang wurde mit einer Spannung von 20V bei RT für 2 h durchgeführt.

Die Membranen wurden aus den Blotvorrichtungen entnommen und in ddH₂O gewaschen. Im Anschluss wurden diese zur Blockierung in einer 1x Roti-Block-Lösung (Carl Roth) für 1 h bei RT inkubiert. Nach Entfernung der Blockierlösung wurden die Membranen 3x für 10 min in einer TRIS-gepufferten Tween20™-Lösung (TBST) gewaschen. Währenddessen wurden die Primärantikörper wie nachstehend aufgeführt in 1x Roti-Block resuspendiert (Tab. 11). β-Actin fungierte als Ladekontrolle. Die TBST-Lösungen wurden nach dem letzten Waschschrift durch die Antikörperlösungen ersetzt und für 1 h bei RT auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Die Membranen wurden erneut drei Mal mit TBST gewaschen und die Lösungen durch die in 1x Roti-Block verdünnten Sekundärantikörper ersetzt. Die Inkubation erfolgte bei RT für 45 min (dunkel) auf einem Horizontalschüttler. Final wurden die Membranen drei Mal mit TBST und anschließend ein Mal in TRIS-gepuffertes Salzlösung (TBS) gespült, bevor diese mittels des ODYSSEY Clx Scan-Systems (LiCOR) analysiert wurden.

Tab. 11: Primär- und Sekundärantikörper für Western-Blot Analysen.

| AK-Typ | Bezeichnung | AK Verdünnung |
|--------------------|--------------------|----------------------|
| Primärantikörper | S2 total | 1:1000 |
| | pS2L | 1:500 |
| | pS2L S245/250 | 1:1000 |
| | pS2L S250 | 1:1000 |
| | pS2L S255 | 1:1000 |
| | pS2C | 1:400 |
| | S3 total | 1:1000 |
| | β-Actin | 1:20.000 |
| Sekundärantikörper | CW680 | 1:20.000 |
| | CW800 | 1:20.000 |

2.2.3.3.1 Antikörperdetektion

Die feuchten Membranen wurden auf den Scanner verbracht und durch Silikonmatten beschwert. Das LiCOR-System verfügt über zwei Laserdioden im Nahinfrarot-Bereich mit Wellenlängen von 785 nm und 685 nm zur Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen, wodurch eine duale Detektion ermöglicht wurde. Messeinstellungen der verwendeten ImageStudio

Software (V4) können der folgenden Tabelle entnommen werden (Tab. 12). Rohdaten wurden als Bilddateien (Format .tiff) exportiert und gesichert.

Tab. 12: Messeinstellungen ImageStudio Software für Western Blot-Analysen.

| Kanal | Resolution | Intensität Laser 785 nm | Intensität Laser 685 nm | Qualität | Fokus Verschiebung |
|-------|-------------------|----------------------------|----------------------------|----------|-----------------------|
| Auto | 169 μm | 5 | 5 | low | 0 mm |

2.2.3.3.2 Datenauswertung

Die erhaltenen Daten wurden in die ImageStudio Software (V4) importiert und die Anzahl auszuwertender *lanes* festgelegt. Danach wurden die Proteingrößen des Größenstandards im Programm hinterlegt und zur Berücksichtigung unspezifischer Färbeergebnisse lokale Hintergrundkontrollen innerhalb der Blotmembranen festgelegt. Diese Werte wurden von den spezifischen Signalen subtrahiert. Intensitätswerte der manuell ausgewählten Zielbanden wurden als MS Excel Datei (Format .xlsx) exportiert und gesichert. Für statistische Prüfungen wurden in die Daten in die GraphPad Prism Software (V6) überführt. In Abhängigkeit des Versuchsaufbaus wurden die Werte mittels T-Tests oder ANOVAs mit verschiedenen Signifikanzniveaus analysiert und grafisch dargestellt.

2.2.3.4 Protein-Array

Der verwendete Proteome Profiler Human XL Oncology Array (RnD Systems) berücksichtigte 84 mit Krebserkrankungen assoziierte Proteine und diente dem Vergleich zwischen A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen. Die Antikörper waren als Spots in Doppelbestimmung auf Nitrocellulosemembranen immobilisiert. Das System verfügte über interne Referenz- sowie Negativkontrollen. Die an den Antikörpern der Membran gebundenen Proteine wurden mittels eines Antikörper-Cocktails markiert. Dieser wurde mit dem IRDye 800CW Streptavidin Sekundärantikörper (LiCOR) detektiert. Die Analysen erfolgten mittels des ODYSSEY Clx Scanners (LiCOR).

2.2.3.4.1 Probengewinnung & Vorbereitungen

Die zuvor für 24 h in Medium kultivierten Zellen wurden mittels Zellschabern geerntet, lysiert und die Proteinkonzentrationen bestimmt. Anschließend erfolgte eine Rekonstitution des Primärantikörper-Cocktails mittels 200 μl ddH₂O. Der Array-Puffer-4/6 des Kits wurde aus 4 ml Array-Puffer-4 und 8 ml Array-Puffer-6 für jede Durchführung frisch angesetzt. Zur

Herstellung des 1x Waschpuffers wurde dem Konzentrat (RT) 960 ml ddH₂O zugesetzt und durch mehrmaliges invertieren durchmischt. Alle Reagenzien wurden bei RT verwendet und die Proben am Tag der Analyse bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagert.

2.2.3.4.2 Durchführung

Benötigte Membranen wurden entnommen und in die jeweiligen Vertiefungen einer 4-Well Multi-Platte verbracht. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden diese mit je 2 ml des Array-Puffer-6 benetzt und 1 h bei RT schwenkend inkubiert. Während der Inkubationsphase wurden 200 µg Gesamtprotein in einem maximalen Volumen von 500 µl zu weiteren 500 µl des Array-Puffer-4 gegeben. Alle Proben wurden dann auf ein einheitliches Gesamtvolumen von 1,5 ml unter Verwendung des Array-Puffer-6 aufgefüllt. Der zuvor applizierte Array-Puffer-6 wurde entfernt und durch die vorbereiteten Proben ersetzt. Die Platte wurde verschlossen und bei 4 °C ü. N. auf einem Wippschüttler inkubiert.

Am Folgetag wurden die Membranen in separate Waschcontainer überführt und mit 20 ml 1x Waschpuffer für 10 min schwenkend gespült. Dieser Schritt erfolgte insgesamt drei Mal. Währenddessen wurde die 4-Well Multi-Platte mit ddH₂O gewaschen und für eine spätere Verwendung getrocknet. Für Antikörperdetektionen wurden die Membranen zurück in die Vertiefungen der 4-Well Multi-Platte überführt und mit je 1,5 ml der Antikörper-Lösung (30 ml Antikörper-Cocktail + 1,5 ml Array-Puffer-4/6) überdeckt. Eine Inkubation erfolgte für 1 h schwenkend bei RT. Wie zuvor beschrieben, wurden die Membranen erneut drei Mal mit je 20 ml 1x Waschpuffer gespült und die 4-Well Multi-Platte mit ddH₂O gereinigt und getrocknet. Für Sekundärdetektionen wurde IRDye 800CW Streptavidin (1 µg/µl) unter Verwendung des Array-Puffers-4/6 1:2000 verdünnt. Für jede Membran wurden 2 ml verwendet. Nach Platzierung der Membranen wurde die vorbereitete Streptavidin-Lösung für 30 min schwenkend (dunkel) inkubiert. Die Array-Membranen wurden erneut drei Mal mit je 20 ml 1x Waschpuffer gespült.

2.2.3.4.3 Antikörperdetektion

Die Membranen wurden feucht auf dem Scanner platziert und mittels Silikonmatten beschwert und Fluorochrome mittels ImageStudio Software (V4) detektiert (Tab. 13). Rohdaten wurden als Bilddateien (Format .tiff) exportiert und gesichert.

Tab. 13: Messeinstellungen für Protein-Arrays.

| Kanal | Resolution | Intensität Laser 785 nm | Qualität | Fokus Verschiebung |
|-------|------------|----------------------------|----------|-----------------------|
| Auto | 84 µm | 3 | medium | 0 mm |

2.2.3.4.4 Datenauswertung

Die Rohdaten wurden in die ImageStudio Software (V4) importiert. Ein erzeugtes Array-grid wurde angepasst und für alle Analysen gespeichert. Die Intensitätswerte wurden als MS Excel Datei (Format .xlsx) exportiert und gesichert. Zunächst wurden die arithmetischen Mittel der Doppelbestimmungen berechnet. Für die negativen Kontrollspots wurde gleichermaßen verfahren und von den spezifischen Messwerten subtrahiert. Zum Vergleich der Proteinniveaus wurden die Mediane (n=3) jeder Zelllinie (A549^{WT} vs. A549L^{sub}) in GraphPad Prism (V6) überführt. Differenzielle Proteinniveaus wurden unter Verwendung eines *Multiple* T-Tests mit einer *false discovery rate* (FDR) von 5 % ermittelt. Bevor GO_BP-Analysen mittels **Gene Set Enrichment Analysis Molecular Signatures Database (GSEA MSigDB)** (gsea-msigdb.org/gsea) erfolgten wurden signifikante Zielproteine aufgrund der gleichen Analyseebene mit den Ergebnissen der Kinase-Arrays (2.2.3.5) fusioniert und mittels STRING DB (string-db.org/) ein interagierendes Netzwerk erstellt und exportiert (vergl. Abb. 33). KEGG-Signalweganalysen erfolgten mittels STRING DB ohne eine vorherige Datenexpansion.

2.2.3.5 Bestimmung von Kinaseaktivitäten

Für ihre biologische Aktivität benötigen Proteine oftmals posttranslationale Modifikationen wie bspw. Phosphorylierungen. Daher wurden zur Bestimmung der Kinaseaktivitäten von **Serin-Threonin- (STK)** und **Protein-Tyrosin Kinasen (PTK)** zwei verschiedene Arrays eingesetzt. Die spezifischen Proteinsequenzen waren auf einer porösen Membran in Spots immobilisiert. Durch diese wurde das Protein-Lysat in Zyklen auf und ab gepumpt. Das für die Kinaseaktivität benötigte **Adenosintriphosphat (ATP)** wurden durch den Master-Mix bereitgestellt. Innerhalb eines Zeitintervalls wurden in regelmäßigen Abständen die Fluoreszenzintensitäten der Phosphorylierungen in *real-time* analysiert. Dies ließ Rückschlüsse auf die Kinaseaktivitäten zu. Anwendung fand das PamChip®4-Assay System (PamGene) und wurde nach den Protokollen des Herstellers durchgeführt. Auf dem STK-Array befanden sich 145 und auf dem PTK-Array 196 spezifische Aminosäuresequenzen. Für die Messungen wurde eine PamStation®12 (PamGene) verwendet.

2.2.3.5.1 Kultivierung, Zellernte & Proteinlysate

Zunächst wurden je 2×10^6 Zellen in Zellkulturflaschen (T75) in RPMI⁺ für 48 h kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, abgeschabt und zentrifugiert. Nach Dekantierung der Überstände erfolgte eine Zellyse und Proteinkonzentrationsbestimmung. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Aliquots gelagert.

2.2.3.5.2 Probenvorbereitungen

Am Tag der Messung wurden die Proben auf Eis aufgetaut und zwei Spritzen mit Waschlösungen befüllt. Erstere enthielt 3 ml 1x PK-Puffer (300 μl 10x PK-Puffer + 2,7 ml ddH₂O), die Weitere eine 1x PBS/0,01 % Tween-Lösung (300 μl 10x PBST + 2,7 ml ddH₂O). Nach Aufforderung des Programms wurden diese entsprechend in die PamStation[®]-Halterungen eingespannt. Vor Verwendung der PamChips[®] wurden die Trägermembranen mit 30 μl einer BSA-Lösung (2 %) für 15 min geblockt (30 Pump-Zyklen je 30 s). Für die Analysen wurden je 3 bzw. 5 μg Protein für das STK- (V5.1) bzw. PTK-Protokoll (V3.0) verwendet. Die Proben wurden durch den in der Lyse verwendeten M-PER-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 10 μl eingestellt (*Lysate-Dilution-Mix*).

2.2.3.4.2 Basic- und Detection-Mix-Präparation & Antikörperdetektion

Im nächsten Schritt wurde der jeweilige STK- bzw. PTK *Basic-Mix* vorbereitet. ATP wurde als letzte Komponente mit einer Konzentration von 0,5 mM je Reaktion zugegeben. Zu jeder vorbereiteten Probe wurden 30 μl des entsprechenden *Basic-Mix* gegeben und zu einem totalen Mix resuspendiert (Gesamtvolumen 40 μl). Davon wurden 30 μl in die jeweiligen Array-Kavitäten appliziert und durch die Membran auf und ab gepumpt. Während bei dem PTK-Array ein direkt konjugierter FITC-Antikörper (PY20 FITC) eingesetzt wurde, war für die Phospho-Detektion des STK-Arrays ein weiterer *Detection-Mix* mit FITC markierten Sekundärantikörpern notwendig.

Die Antikörper-Lösung bzw. der *Detection-Mix* wurden direkt auf die Arrays pipettiert (30 μl) und im Gerät inkubiert. Unter Verwendung der Evolve Software (V1.2) wurden mittels einer *charged coupled device* (CCD)-Kamera Bilder der Fluoreszenzintensitäten mit unterschiedlichen Belichtungszeiten (10, 50 und 200 ms) aufgenommen. Nach 3 min erfolgte die erste Aufnahme mit den ersichtlichen Referenzspots sowie zwei Positivkontrollen. Über

30 Zyklen hinweg wurden nach jedem fünften (1 min je Zyklus) erneut drei Aufnahmen angefertigt, um den Phosphorylierungsstatus über die Zeit zu detektieren. Die Software dokumentierte und kalkulierte im Anschluss die kinetischen Reaktionen und Steigungen über ein Zeitintervall für die jeweiligen Spots.

2.2.3.4.3 Datenauswertung

Signalquantifizierungen biologischer Replikate erfolgten durch die BioNavigator Software (V6.3). Zu diesem Zweck wurden die Daten der *Array-layouts*, Proben-Annotationen und gespeicherten Fluoreszenzaufnahmen in die Software geladen. Die erhaltenen Signalwerte wurden als Tab-Stop Textdatei (.txt Format) gespeichert. Anschließend erfolgte ein Import der Daten in MS Excel (V6). Signifikanzprüfungen erfolgten mittels *Multiple* T-Tests mit einer *false discovery rate (FDR)* von 5 % unter Verwendung der GraphPad Prism Software (V6). GO_BP- und KEGG-Analysen erfolgten wie unter 2.2.3.4.4 beschrieben.

2.2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.4.1 DNA- und RNA-Isolierung

Für die Isolation genomischer **DNA (gDNA)** bzw. gesamt RNA wurde das AllPrep[®] DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Vor Verwendung der Kit Bestandteile wurden die Puffer entsprechend des Herstellerprotokolls komplettiert. Dem RLT Plus Puffer wurden 10 µl β-Mercaptoethanol zugesetzt (1 % v/v) und dem Konzentrat des RPE Puffers das 4-fache Volumen an EtOH (100 %).

2.2.4.1.1 Zellhomogenisierung

Es wurden 1×10^6 pelletierte Zellen für die Isolationen verwendet und diesen 600 µl RLT Plus Puffer zugesetzt. Die Pellets wurden resuspendiert und unter Verwendung eines Schüttlers durchmischt. Zur Lysat-Gewinnung wurden diese bei $\geq 8000 \times g$ für 3 min zentrifugiert und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt.

2.2.4.1.2 DNA-Isolation

Jeweils 700 µl der homogenisierten Lysate wurden auf AllPrep DNA-Säulen gegeben, die auf einem 2 ml Auffanggefäß platziert waren. Die Säulen wurden verschlossen und für 30 s bei $\geq 8000 \times g$ zentrifugiert. Die Durchläufe wurden für die RNA-Isolation verwendet. Wenn

beide Komponenten extrahiert wurden, erfolgten RNA-Isolationen vor der Fortsetzung des DNA-Protokolls. In diesem Falle wurden die DNA-Säulen bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert. gDNAs wurde mit je 50 µl *elution* Puffer für 1 min bei 8000 x g und RT eluiert. gDNA-Konzentrationen wurden mittels des NanoDrop 2000 (Thermo Fisher) bestimmt (2.2.4.2). Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.4.1.3 RNA-Isolation

Die Durchläufe der DNA-Säulen wurden mit der gleichen Menge an EtOH (70 %) versetzt und resuspendiert. Jeweils 700 µl wurden auf die RNA-Säulen pipettiert und bei ≥ 8000 x g für 15 s zentrifugiert. Da Volumina $\geq 700\mu\text{l}$ vorlagen wurde der Schritt wiederholt. Die RNA-Elutionen wurden mit je 30 µl Nulkease-freiem Wasser bei ≥ 8000 x g nach einer Inkubation für 1 min bei RT durchgeführt. RNA-Konzentrationen und -Qualitätsbestimmungen erfolgten wie nachfolgend beschrieben (2.2.4.2; 2.2.4.3).

2.2.4.2 DNA & RNA Konzentrationsbestimmung

Die gDNA- bzw. RNA-Konzentrationen wurde mittels des NanoDrop 2000 UV-Spektrometer (Thermo Fisher) bestimmt. Für gDNA-Messungen wurde im Menü der Probenotyp „DNA-50“ ausgewählt, für RNA Messungen „RNA-40“. Vor Beginn der Messungen wurde ein Leerwert mit dem jeweiligen Elutionsmedium bestimmt. Für die Konzentrationsbestimmungen wurde je 1 µl Probe verwendet und die Absorptionen bei 260 nm und 280 nm detektiert. Während Messungen bei 280 nm auf Kontaminationen durch Proteine schließen lassen, kann durch Extinktionen bei 260 nm eine Konzentrationsberechnung von Nukleinsäuren erfolgen.

2.2.4.3 RNA-Integrität

Bevor RNAs für Transkriptomanalysen eingesetzt wurden, erfolgten Untersuchungen der RNA-Integrität mittels des Bioanalyzers (Agilent). Dazu wurde das RNA 6000 Nano Kit (Agilent) nach Herstellerangaben verwendet und jeweils 1 µl denaturierte RNA eingesetzt. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese und Detektion des interkalierenden RNA-Fluoreszenzfarbstoffes PicoGreen. Durch Anlegen einer Spannung erfolgt eine RNA-Trennung entsprechend der molekularen Größe durch Polymer befüllte Mikrokapillaren. Als Referenz wurde ein Größenstandard mitgeführt. Durch einen

Algorithmus wird das Elektropherogramm analysiert und eine **RNA-Integritätsnummer (RIN)** berechnet. Die Werte auf einer Skala von 1 (Degradation) bis 10 (optimale Qualität) können zur Beurteilung der RNA-Probe herangezogen werden (79). Alle eingesetzten RNA-Proben zeigten RIN-Werte von $\geq 9,0$.

2.2.4.4 Transkriptome

Die Genexpressionsanalysen wurden unter Verwendung von 4 x 44K V2 Arrays (Agilent) und dem Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent). Alle Master-Mixe, Verdünnungen und Formeln zur Berechnung der cRNA-Aktivität können dem Herstellerprotokoll entnommen werden. Es wurden je Reaktion 200 ng Gesamt-RNA verwendet. Zunächst wurden die extrahierten RNAs durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA transkribiert. Die komplementären cDNA Stränge dienten wiederum als Vorlagen für amplifizierte Rückschreibungen in cRNA durch T7 RNA-Polymerasen, wobei zeitgleich die cRNAs bei ihrer Assemblierung durch Cyanine-3 (Cy3) fluoreszenzmarkiert (*Labeling*) wurden. Die markierten cRNAs wurden erneut extrahiert und die Aktivität bestimmt, bevor diese für 17 h auf den Arrays hybridisiert wurden.

2.2.4.4.1 Spike-In-Mix, reverse Transkription & cRNA-Markierung

Das Agilent-System verfügte über interne Kontrollen definierter Oligonukleotid-Sonden zur Kontrolle der Reaktionen und Expressionsnormalisierungen zum Vergleich einzelner Arrays. Hierfür wurden den jeweiligen Proben in Abhängigkeit der eingesetzten RNA Konzentration ein verdünnter *Spike-In-Mix* zugesetzt. Dieser wurde bei 37 °C für 5 min inkubiert. Die entsprechenden Komponenten wurden resuspendiert und nach jedem Pipettierschritt zentrifugiert, um Flüssigkeitsrückstände an der Innenwand des Reaktionsgefäßes zu vermeiden. Zur Verdünnung wurde der *Dilution* Puffer verwendet. Zunächst wurden die RNA-Proben mit Nuklease-freiem Wasser auf die entsprechenden RNA-Konzentrationen verdünnt und ein Gesamtvolumen von 1,5 µl eingestellt. Nach Zugabe des *Spike-In-Mix* wurden jeder Probe 0,8 µl T7-Primer zugegeben. Bevor Denaturierungen erfolgten, wurden die Proben geschüttelt und zentrifugiert. Anschließend wurden diese auf Eis inkubiert, um eine Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Jeder Probe wurden 4,7 µl des Master-Mix für die reverse Transkription (cDNA-Synthese) zugesetzt, resuspendiert und zentrifugiert. Durch eine Inkubation für 5 min auf Eis, wurde der Synthese-Schritt

abgeschlossen. Die Proben erhielten 6 µl des Amplifikation- und Labeling-Master-Mix und wurden resuspendiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden Cy3-markierte assemblierte cRNAs isoliert.

2.2.4.4.2 cRNA-Isolation und Aktivitätsbestimmung

cRNA-Isolierungen erfolgten unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Eluationen wurden mit je 30 µl Nuklease-freiem Wasser bei 13000 x g für 30 s durchgeführt. Die Proben wurden auf Eis gelagert und die Aktivitäten mittels des NanoDrop 2000 (Agilent) bestimmt. Nach Bestimmung des Leerwerts wurden für jede Probe 1 µl Cy3-markierte cRNA eingesetzt. Die Software ermittelte die Werte für die Cy3-Farbstoffkonzentrationen (pmol/µl), RNA Absorptionsverhältnisse (260 nm/280 nm) und RNA Konzentrationen (ng/µl). Für die verwendeten Arrays wurde mindestens ein cRNA-Ertrag von 1,65 µg und eine spezifische Aktivität von ≥ 6 pmol Cy3 je µg cRNA vorausgesetzt, um mit der Hybridisierung fortzufahren.

2.2.4.4.3 cRNA-Hybridisierung

Vor den Hybridisierungen wurde das 10x Gene Expression Blocking Agent mit 500 µl Nukease-freiem Wasser versetzt und durch schütteln gemischt. Nach vollständiger Lösung wurden Aliquots bei -20 °C gelagert. Das Reagenz fand Anwendung, um unspezifische Bindungen der cRNA an den Array-Sonden zu verhindern. Anschließend erfolgte eine cRNA Fragmentierung für 30 min bei 37° C, um eine gleichmäßige Bindung an die Sonden zu gewährleisten. Von den fragmetierten Proben wurden je 100 µl auf Gasket Slides appliziert und durch den Array in der Hybridisierungskammer verschlossen. Nach kurzem invertieren wurden diese in den vorgeheizten (65° C) Hybridisierungsofen eingesetzt und für 17 h rotierend inkubiert. Jeder Waschpuffercontainer wurde mit 0,005 % Triton X-102 (10 %) versetzt und invertiert. Der Waschpuffer 2 wurde vor seiner Verwendung in eine Glasküvette gegeben und über Nacht in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Am nächsten Tag wurden die Glasküvetten für die Wachsritte mit Rührfischchen versehen und zu gegebener Zeit auf Magnetrührer verbracht. Die Array-Demontagen erfolgten in einer gesonderten Küvette im Waschpuffer 1. Im Anschluss wurden die Arrays in die mit Waschpuffer 1 gefüllte Küvette überführt und für 1 min bei RT inkubiert. Währenddessen

wurde die vorgewärmte Küvette aus dem Wasserbad entnommen und ebenfalls platziert. Die Arrays wurden in die Waschpufferlösung 2 eingesetzt und ebenfalls 1 min gewaschen. Nach der Entnahme wurden Flüssigkeitsreste an der Unterseite mit einem Papiertuch abgenommen, bevor die Arrays in Scanapparatur-Halterungen gesetzt und diese verschlossen wurden.

2.2.4.4.3 Array-Scan & Rohdaten

Die Arrays wurden mit den Halterungen in die Scanner-Kassetten verbracht. Der Scanvorgang erfolgte nach dem 4 x 44k V2 Standard Protokoll mit einer Auflösung von 5 μm . Generierte Bilddateien (Format .tiff) wurden unter Verwendung der Feature Extraction Software (V13) extrahiert und in Zahlenwerte konvertiert. Diese wurden als Tab-Stop getrennte Textdateien (Format .txt) erhalten und zentral auf einem Server gesichert.

2.2.4.4.4 Datenanalyse

Die Dateien wurden in die GeneSpring GX Software (V13) importiert und für eine Vergleichbarkeit unter Auswahl des 75 % Perzentils zur *baseline* des Medians normalisiert und transformiert (\log_2). Statistische Analysen (ANOVA, *modetared* T-Test) zum Vergleich von Genexpressionen wurden mit einem Signifikanzniveau von mind. $p \leq 0,05$ berechnet und unter Verwendung der Benjamini-Hochberg (BH) *multiple testing correction* Funktion mit einer *false discovery rate* (FDR) von 5 % bewertet. Nachgeschaltete Analysen erfolgten durch verschiedene *web*-basiert mittels GSEA MSigDB (gsea-msigdb.org/gsea) und STRING DB (string-db.org). Weitere Informationen sind im entsprechenden Ergebnisteil aufgeführt. *Heatmaps* wurden in GeneSpring GX (V13) erzeugt und hierarchische Clusterings differenzieller Genexpressionen unter Verwendung der *web*-basierten ClustVIS Software (biit.cs.ut.ee/clustvis/) vorgenommen.

2.2.4.5 SMAD2 Linker-Substitution mittels CRISPR/Cas9 (A549L^{sub})

Dieser Teil der Arbeit wurde im Rahmen von DZL-Kooperationen mit der Forschungsgruppe „Molekulare Kanzerogenese“ von Herrn Prof. Georgios Stathopoulos (CPC Helmholtz-Zentrum München) sowie der Forschungsgruppe für „Angeborene Immunität“ unter der Leitung von Prof. Dr. Holger Heine und insbesondere in Zusammenarbeit mit Dr. Tim Vierbuchen am Forschungszentrum Borstel realisiert.

Zur gezielten Genom-Editierung wurde das *clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/ CRISPR associated protein (Cas)*-System verwendet, welches dem erworbenen Immunsystem-Äquivalent verschiedener Prokaryoten entstammt (80) (81) (75). Ziel war die Generierung einer A549-Zelllinie, die in der Linker-Domäne des SMAD2 anstelle von Serinen (Ser) Alanine (Ala) aufwies (Ser245/250/255 → Ala245/250/255). Dadurch wurde eine Phosphorylierung des Serin-Tripletts unterbunden, um dessen Einfluss in malignen Zellen zu untersuchen. Für eine Substitution besteht das System grundlegend aus der molekularen Sonde (*single guide RNA (sgRNA)*), der Genschere (Cas9-Protein) sowie einer DNA-Sequenz mit den veränderten Basenabfolgen (*repair template*) (78). Die sgRNA ist komplementär zur gDNA und wurde so gewählt, dass sich diese nahe der Zielstelle der geplanten Substitution im Genom anlagerte. Durch eine Endonuklease-Aktivität erzeugt das Cas9-Protein nach Erkennung des *protospacer adjacent motif (PAM; hier: 5'-TGG-3')* einen **Doppelstrangbruch (DSB)** der gDNA. DSBs können über zwei unterschiedliche zelluläre Mechanismen repariert werden, dem *non-homologous end joining (NHEJ)* oder alternativ durch *homology-directed repair (HDR)* unter Verwendung eines *repair templates* (76) (77) (Abb. 7).

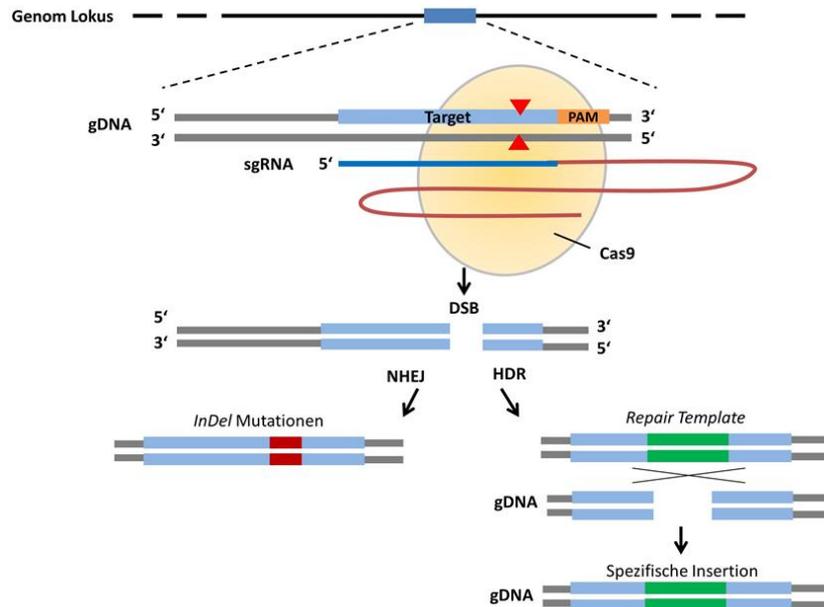


Abb. 7: Prinzip des CRISPR/Cas9-Systems zur Genom-Editierung. Vereinfachte und schematische Abbildung der Genom-Editierung zur Generierung einer A549-Zelllinie mit substituierter Linker-Domäne (A549L^{sub}). Zunächst formt die sgRNA (dunkelblau) einen Komplex mit dem Cas9-Protein (gelb) und leitet dieses zur komplementären Sequenz der gDNA. Nach Bindung von Cas9 wird die gDNA geschnitten, wodurch ein DSB (rote Dreiecke) 3 bp *downstream* des PAM (orange) erzeugt wird. Dieser kann anschließend durch zwei Mechanismen repariert werden: dem NHEJ, was zu InDel Mutationen führt oder durch HDR, wobei ein *repair template* vorhanden ist und eine spezifische Insertion stattfindet (nach (80)). Hinweise: Cas9 = CRISPR associated protein 9; sgRNA = single guide RNA; gDNA = genomische DNA; DSB = Doppelstrangbruch; PAM= *protospacer adjacent motif*; NHEJ = *non-homologous end joining*; InDel = *InsertionDeletion*; HDR = *homology-directed repair*; A549L^{sub} = A549-Zellen mit SMAD2 Linker-Substitution.

2.2.4.5.1 sgRNA & Primer

Zur Erstellung einer geeigneten *single guide RNA* (sgRNA) unter Berücksichtigung des gewählten PX458-Vektors (Addgene), wurde die *web*-basierte Plattform Benchling (benchling.com) verwendet. Die Software kalkuliert durch einen Algorithmus *on*- und *off-target scores* (0 = schlechtester Wert, 100 = bester Wert). Es wurden lediglich sgRNAs berücksichtigt, die Werte von ≥ 50 aufwiesen. Für die ausgewählte sgRNA wurden Primer erstellt und diese um die entsprechenden Überhänge für die Klonierung in den Vektor ergänzt. Diese wurden mit der Benchling-Software erstellt und von der Firma Integrated DNA Technologies (IDT) bezogen (Tab. 14).

Tab. 14: sgRNA- & Primer für die PX458-Plasmid Legierung.

| | |
|-----------------------|--------------------------|
| sgRNA (5' → 3') | GTAGTAGGAGATAGTTCTGC |
| SMAD2-1 FWD (5' → 3') | caccGTAGTAGGAGATAGTTCTGc |
| SMAD2-1 REV (5' → 3') | aaacGCAGAACTATCTCCTACTAC |

Kleine Buchstaben = Vektor Überhänge

2.2.4.5.2 Repair template (HDR)

Die *repair templates* enthielten die veränderten Sequenzabfolgen für den gewünschten Aminosäuren-Austausch innerhalb des SMAD2 Serin-Tripletts in Form von ssDNA. *Up-* und *downstream* der Mutationen wurden Homologie-Arme (100 bp) angefügt, um HDRs zu ermöglichen. Zudem führte die Mutation im ersten Serin-Basentriplett (S245) zu einer neuen Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Haell*. Dies ermöglichte ein späteres Screening zur Eingrenzung putativ substituierter Zellklone. Die *repair templates* wurden sowohl in „sense“ (*forward* = *FWD*) als auch „antisense“ Richtung (*reverse* = *REV*) bezogen (IDT). Zur Verbesserung der Stabilität und Schutz vor zellulären DNasen wurden Phosphothioatbindungen (●) zwischen den ersten und letzten Nukleotiden eingefügt. Ergänzt wurden die *repair templates* durch zwei stille Mutationen, um erneute Anlagerungen der sgRNA nach erfolgreichen Substitutionen zu erschweren und einen erneuten DSB durch Cas9 zu vermeiden (Tab. 15).

Tab. 15: *Repair templates* für die SMAD2-Linker Substitution.

| | |
|---------------------------|--|
| SMAD2mut_FWD (5' → 3') | G●GAAACTTCAATTTATTTTAAATCCTTTGTTTTAGGC <u>GCT</u> CCAGCAGAA <u>TTA</u> <u>GCTCCA</u> ACT TACTCTT <u>G</u> CCCCTGTTAATCATAGCTTGGGTAAGTTGCACATATGTTCC●C |
| SMAD2mut_REV (5' → 3') | G●GGAACATATGTGCAACTTACCCAAGCTATGATTAACAGGGGGCAAGAGTAGT <u>GGAGCTA</u> <u>ATTCTGCTGGAGCGCCT</u> AAAAACAAAAGGATTTAAAAATAAATGAAGTATTC●C |

● = Phosphothioatbindungen; Grau hinterlegt = Basentriplets für Alanin (vorherige Serine); Rot = Veränderte Base; Einfach unterstrichen Blau = Stille Mutationen; Doppelt unterstrichen = Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Haell*.

2.2.4.5.3 Vektortransformation & Plasmid-Isolation

Zur Generierung der gewünschten Zelllinie wurde als Vektor das PX458-Plasmid (Addgene) verwendet. Dieses codiert sowohl für *Cas9* als auch eine Ampicillin-Resistenz und das *green fluorescent protein (GFP)*. Letzteres ermöglichte eine Zellselektion via *fluorescent activating cell sorting (FACS)* bei erfolgreicher Transfektion in den späteren Zielzellen. Dafür wurden die zuvor erstellten Oligonukleotide zunächst phosphoryliert. Die T4-Polynukleotidkinase wurde mit 10 U und Primer (Tab. 15) mit je 10 µM eingesetzt. Eine Inkubation erfolgte im *Thermocycler* (Tab. 16).

Tab. 16: Thermocycler-Programm Phosphorylierung.

| Temperatur | Zeit [min] |
|---------------------------------------|------------|
| 37°C | 30 |
| 95°C | 5 |
| 25°C (Abkühlungsrate max. -0,3°C/sek) | --- |

Anschließend wurden die Proben mit Wasser verdünnt (1:200) und standen für die Klonierung in den Vektor bereit. Die Komponenten des Klonierungsansatzes und das *Thermocycler*-Programm sind in den nachstehenden Tabellen aufgeführt (Tab. 17 + 18).

Tab. 17: Master-Mix Klonierung je Reaktion.

| Komponente | Volumen [µl] |
|--------------------------------|--------------|
| Plasmid DNA (100 ng) | ≤10,5 |
| Oligos (phosphoryliert, 1:200) | 2 |
| Tango Puffer | 2 |
| DTT (10 mM) | 2 |
| ATP (10 mM) | 2 |
| Bbsl (FastDigest) | 1 |
| T7-Ligase | 0,5 |
| ddH ₂ O | ad. 20 |

Tab. 18: Thermocycler-Programm Klonierung.

| Temperatur | Zeit [min] | Zyklen |
|------------|------------|--------|
| 37°C | 5 | } 6 |
| 21°C | 5 | |

Vektortransformationen erfolgten unter Verwendung kompetenter *Escherichia coli* DH5α (New England Biolabs). Die Bakterien wurden nach Herstellerangaben mittels Hitzeschock transformiert. Anschließend wurden diese in SOC-Medium für 60 min bei 37°C schüttelnd inkubiert und auf vorgewärmten (37 °C) Luria-Bertani-Selektionsplatten (Ampicillin 100 µl/ml) ausplattiert. Eine Inkubation erfolgte ü. N. bei 37 °C. Der enthaltene Vektor (PX458-SMAD2) wurde durch Verwendung des HiPure Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben isoliert und die Konzentration mittels eines UV-Spektrophotometer (DeNovix) bestimmt, bevor A549^{WT}-Transfektionen erfolgte.

2.2.4.5.4 Transfektion von A549^{WT}-Zellen & *single cell sorting*

Für Transfektionen erfolgten mittels des Nucleofactor-Systems (Lonza). Dafür wurden 3x10⁶ A549^{WT}-Zellen bei einer Konfluenz von etwa 50-60 % geerntet und gezählt. Die Zellen wurden in ein 15 ml Röhrchen überführt, mit PBS gewaschen und Zellpellets in 300 µl *Nucleofactor*-Lösung (246 µl *Nucleofactor* + 54 µl *Supplement*) resuspendiert. Jedem Transfektionsansatz der sowohl das Plasmid als auch das jeweilige *repair template* enthielt wurden 100 µl der Zellsuspension zugesetzt. Diese wurden resuspendiert und in

Nucleofactor-Küvetten überführt. Es wurden drei Transfektionsansätze durchgeführt (Tab. 19).

Tab. 19: Transfektionsansätze für die SMAD2-Linker Substitution in A549^{WT} Zellen.

| Bezeichnung Ansatz | A549 ^{WT} Zellzahl | Plasmid (PX458-SMAD2) | Repair template (FWD) | Repair template (REV) |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| N1 | 1 x 10 ⁶ | 1,5 µg | 2 µg | --- |
| N2 | 1 x 10 ⁶ | 1,5 µg | --- | 2 µg |
| N3 | 1 x 10 ⁶ | 1,5 µg | --- | 3,5 µg |

Die Zellen wurden mittels Elektroporation transfiziert (*Nucleofactor I*; Lonza), in 500 µl vorgewärmten RPMI⁺ resuspendiert und in 6-Well-Platten überführt. Das Kulturmedium wurde auf insgesamt 3 ml je Well mit RPMI⁺ aufgefüllt, bevor eine Inkubation der Platten bei 37 °C für 48 h erfolgte. Zellsortierungen erfolgten durch die *core facility* für Fluoreszenz-Zytometrie am Forschungszentrum Borstel unter Verwendung des FACS-Aria™ II (Becton & Dickinson; BD). Am Tag der Zellsortierung wurden drei 96-Well Platten mit 100 µl Medium (50 % konditioniertes A549^{WT} Kulturmedium, 30 % frisches RPMI⁺ und 20 % FCS) je Well vorbereitet und auf 37 °C vorgewärmt. Die Zellen wurden aus der 6-Well-Platte mittels einer TE-Lösung abgelöst, mit Medium gewaschen, in 350 µl MACS-Puffer aufgenommen und in 5 ml FACS Röhrchen gegeben. Zellen mit der höchsten GFP-Expression (5-10 % der Gesamtpopulation) wurden als Einzelzellen pro Well in die vorbereiteten 96-Well-Platten sortiert. Die Platten wurden in den folgenden 12 - 48 h unter Verwendung eines Lichtmikroskops auf vorhandene Einzelzellen kontrolliert. Die verbliebenen Einzelzellklone wurden bis zu einer Konfluenz von mind. 50 % (ca. 3-4 Wochen) inkubiert. Mediumwechsel erfolgten zweimal wöchentlich.

2.2.4.5.5 Detektion erfolgreicher Rekombinationsereignisse

Zur Detektion putativ erfolgreicher Rekombinationen (HDR) der Einzelzellkolonien wurde ein Restriktionsverdau nach Amplifizierung der veränderten Zielsequenz durchgeführt. Die erstellten Primer (IDT) sind in der nachstehenden Tabelle hinterlegt (Tab. 20).

Tab. 20: Primer Kolonie-PCR und Sequenzierung.

| Bezeichnung Primer | Sequenzabfolge (5' → 3') |
|--------------------|--------------------------|
| seqSMAD2-a_FWD | CCATCAATGTGGGATCGCGATG |
| seqSMAD2-a_REV | TGTGCCAGCAGAAAAGACTTAA |

Das Primer-Paar erzeugt ein 723 bp Fragment und überspannte die SMAD2 Linker-Domäne mit der neu generierten Schnittstelle für das Restriktionsenzym *HaeII* (New England Biolabs). Im Falle erfolgreicher Rekombination entstanden nach einem *HaeII*-Verdau zwei Fragmente mit 467 bp und 256 bp. Isolationen der gDNAs erfolgte mittels QuickExtract™ DNA Solution 1.0 (Lucigen). Es wurden je 1×10^4 Zellen verwendet. Inkubationen erfolgten in einem *Thermocycler* (Tab. 21).

Tab. 21: gDNA-Isolation.

| Temperatur | Zeit [min] | Zyklen |
|------------|------------|--------|
| 65°C | 15 | 1 |
| 68°C | 15 | 1 |
| 98°C | 10 | 1 |
| 10°C | ∞ | ∞ |

Für die Kolonie-PCRs wurde je 1 µl aus den gDNA-Isolationen eingesetzt und erfolgten unter Verwendung des *OneTaq*® 2x Master-Mix (New England Biolabs). Primer (Tab. 20) wurden mit je 50 pmol eingesetzt. Inkubationen erfolgten mittels eines *Thermocyclers* (Tab. 22).

Tab. 22: *Thermocycler*-Programm Kolonie-PCR.

| Temperatur | Zeit [sek] | Zyklen |
|------------|------------|--------|
| 94°C | 30 | 1 |
| 94°C | 20 | 35 |
| 60°C | 15 | |
| 68°C | 60 | |
| 68°C | 300 | 1 |
| 4°C | ∞ | ∞ |

Die Amplikons (10 µl) wurden in 1x CutSmart Puffer (1:5) aufgenommen und mit 20 U *HaeII* versetzt. Ein Verdau erfolgte für 60 min bei 37 °C. Im Anschluss wurden die Proben in einem mit 5 µl Midori Green Advanced (Biozym Scientific) versetzten Agarosegel (1 %) in 1x TAE-Puffer (80-110 V; 45-60 min) getrennt. DNA-Banden wurden durch UV-Licht sichtbar gemacht und mittels einer CCD-Kamera (Intas) dokumentiert. Es wurden insgesamt ≥ 110 Einzelzellkolonien auf putativ erfolgreiche HDR-Ereignisse geprüft. Davon zeigten zwei Zellklone (N1 #17; N1 #19) die erwarteten Banden (Abb. 21, A).

Für Verifizierungen von SMAD2 Linker-Substitutionen wurden die unverdauten PCR-Produkte mit dem seqSMAD2-a_FWD Primer (Tab. 20) für externe Sanger-Sequenzierungen an die Firma Eurofins übersendet. Ein erfolgreicher Austausch der Serine zu Alaninen wurde nur im Zellklon N1 #17 bestätigt (Abb. 21, B). Die Zellen wurden für nachfolgende

Untersuchungen expandiert und bis zu ihrer Verwendung in Aliquots (je 1×10^6 Zellen) in flüssigem Stickstoff gelagert. Die etablierte A549 SMAD2-Linker substituierte Zelllinie aus dem N1 #17 Ursprungsklon wurde mit A549L^{sub} bezeichnet.

2.2.4.6 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) & cDNA-Gelextraktion

Zur Überprüfung, ob unterschiedliche Proteinniveaus der SMAD2-Spleißvarianten (SMAD2 *full length*; SMAD2 Δ Exon3) auch auf mRNA-Ebene vorlagen, wurden RT-PCRs und anschließend Gelextraktionen der Zielbanden für Sanger-Sequenzierungen durchgeführt. Die Zellen wurden zuvor unter Medium-Bedingungen für 48 h kultiviert und geerntet.

2.2.4.6.1 cDNA-Synthese

Complementary DNAs (cDNAs) wurden unter Verwendung des Maxima™ cDNA-Synthesis Kit (Thermo Fisher) nach dem Herstellerprotokoll synthetisiert. Das Kit nutzt dabei das Enzym **Reverse-Transkriptase (RT)** und ermöglicht die Umschreibung von einzelsträngiger mRNA zu doppelsträngiger cDNA durch den Einsatz von Oligo-desoxythymidin und *random* Hexamer-Nukleotiden. Es wurde 1 µg Gesamt-RNA je Reaktion eingesetzt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 8 µl gebracht. Zur Eliminierung möglicher DNA-Reste wurden 2 µl DNase-Mix (1 µl DNase + 1 µl 10x DNase-Puffer) zugegeben. Die Proben wurden in einem *Thermocycler* inkubiert.

2.2.4.6.2 Primer

Zur Unterscheidung der zwei SMAD2-Spleißvarianten wurden Exon 3 (90 bp) überspannende Primer erstellt. Dadurch entstehen verschieden lange PCR-Produkte beider Varianten, was eine getrennte Detektionen ermöglicht. Die verwendeten Primersequenzen (Eurofins) und erwarteten Basenpaarlängen sind nachstehend aufgeführt (Tab. 23).

Tab. 23: Primer SMAD2-Spleißvarianten und erwartete PCR-Fragmente (bp).

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') | SMAD2 <i>full length</i> [bp] | SMAD2 Δ Exon3 [bp] |
|--------------------|------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| S2_short_long_FWD3 | TGCCTTTGGTAAGAACATGTCG | 362 | 272 |
| S2_short_long_REV4 | TGGAGACGACCATCAAGAGAC | | |

2.2.4.6.3 Master-Mix, PCR-Programm & Agarose-Gelelektrophorese

Für cDNA-Amplifizierungen wurde ein Master-Mix pipettiert, der je 10 µl cDNA-*template* enthielt. Primer (Tab. 23) wurden mit je 0,2 µM und Taq-Polymerase mit 1,25 U je Reaktion

(50 µl) eingesetzt. Anschließend erfolgten die Reaktionen in einem *Thermocycler* mit einer *Annealing*-Temperatur von 60,1° C über 40 Zyklen. Die PCR-Produkte wurden in Ethidium Bromid (20 µl) (Sigma Aldrich; 10 mg/ml) versetzten Agarosegelen (3 %) in 1x TAE-Puffer getrennt (45 min; 80 V). Als Größenstandard wurde pBR322 DNA MspI Digest (New England Biolabs) mitgeführt. Detektionen erfolgten unter Verwendung von UV-Licht und wurden mittels einer CCD-Kamera (Intas) dokumentiert. Die einzelnen Banden wurden unter Verwendung der ImageStudio Software (V4) analysiert.

2.2.4.6.4 Gelextraktion & Sequenzierung

Zur Bestätigung korrekt amplifizierter Banden wurde die RT-PCR mit gepoolter RNA (n = 3) wiederholt. Nach einer kurzen UV-Licht Exposition für Bandenlokalisationen wurden diese mittels eines Skalpells aus dem Gel herausgetrennt. Die Gelblöcke wurden in separate Reaktionsgefäße überführt. cDNA-Extraktionen aus dem Gel erfolgten durch Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) und wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Vor Verwendung des Kits wurde das PE-Waschpufferkonzentrat durch das entsprechende Volumen an EtOH (100 %) ergänzt.

Sanger-Sequenzierungen wurden in Kooperation mit dem Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Mykobakterien am Forschungszentrum Borstel unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Florian Maurer und insbesondere in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Doris Hillemann durchgeführt. Dazu wurde der S2_short_long_FWD3 Primer (Tab. 23) eingesetzt und die erhaltenen Sequenzabfolgen in die Chromas Software (V2.6.6) importiert. Nachdem die Kernsequenzen exportiert wurden, erfolgten *web*-basierte Transkriptidentitätsanalysen unter Verwendung der NCBI **Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide** Datenbank (**BLASTn**) (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

2.2.4.7 Methylome

Epigenetische Modifikationen in Form von differenziellen Methylierungen wurden durch eine DZL-Kooperation mit dem Institut für Humangenetik am UKSH Campus Kiel in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Ole Ammerpohl und technischer Assistenz durch Frau Corinna Waider realisiert. Die extrahierten gDNAs unstimulierter A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen (n = 3) wurden nach Kiel überstellt und mittels Illumina Bead Arrays (Illumina Inc.) analysiert. Die Daten wurden anschließend mit der GenomeStudio Software verarbeitet und

auf die intrinsischen Chip-Kontrollen normalisiert. Alle Experimente wurden parallel im selben *batch* ausgewertet. Anschließende Analysen erfolgten durch die Verwendung verschiedener *web*-basierter Datenbanken wie bspw. GSEA MSigDB oder der **Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 (GEPIA2)**. Weitere Informationen sind im entsprechenden Ergebnisteil angegeben.

2.2.5 *IN SILICO* ANALYSEN

2.2.5.1 *SMAD2* Genexpressionen in Lungenkrebskohorten

Für *in silico* Analysen von *SMAD2*-Gesamtexpressionen wurde die *online* Plattform Kaplan-Meier-Potter (KM-Plotter; [kmplot/lung.com](http://kmplot.lung.com)) verwendet. Diese stellt Microarray-Expressionsdaten (Affymetrix) von NSCLC-Patienten ($n = 3.452$) zur Verfügung, die bspw. auf Datenbanken wie *The Cancer Genome Atlas Program (TCGA)* und *Gene Expression Omnibus (GEO)* hinterlegt sind. Die verfügbaren Datensets ließen ebenfalls Unterscheidungen hinsichtlich weiterer Kriterien wie z. B. Geschlecht, *staging* oder Lungenkrebs Subentitäten zu (82). Die Gruppen wurden anhand des 50. Quartils aller Expressionswerte der *SMAD2*-Sonde (*226563_at*) in *low*- und *high*-Expriemierer unterteilt. Ein Einfluss auf das Gesamtüberleben (*overall survival, OS*) wurde durch Kaplan-Meier-Kurven analysiert. Die erhaltenen p-Werte der Log-Rank-Tests wurden mittels der Bonferroni *multiple testing correction* ($\alpha = 0,05$) im Nachgang und Abhängigkeit der Anzahl durchgeführter Tests alternativ korrigiert (83).

2.2.5.2 Transkriptexpressionen von *SMAD2*-Spleißvarianten und stammzell-assoziierte Gensets

Zur Untersuchung der spezifischen *SMAD2*-Transkriptexpressionen ‚full length‘ (ENST00000262160.11; ENST00000402690.6) und ‚ Δ Exon 3‘ (ENST00000356825.8) in verschiedenen Tumoren und Normalgeweben wurde die *web*-basierte GEPIA2-Datenbank (gepia2.cancer-pku.cn) verwendet. Diese bietet die Möglichkeit Einflüsse ermittelter Gensignaturen auf das OS und *disease free survival (DFS)* in verschiedenen Tumorarten separat oder gemeinsam mittels Log-Rank-Tests zu analysieren. Dabei greift die Datenbank auf TCGA und **Genotype-Tissue Expression (GTEx)** Datensätze zurück. Die Datenbank wurde verwendet, um $S2^{FL}$ - und $S2^{AE3}$ -Expression in NSCLC- und Glioma-Entitäten im Vergleich zu den entsprechenden Normalgeweben zu vergleichen. Im Anschluss wurden die *most*

differential survival genes (MDSGs) in *glioblastoma multiforme* (GBM) und *low grade glioma* (LGG) (n = 500 je Tumorentität; 75. Quartil) aus der Datenbank exportiert, um diese mit den differenziell exprimierten Zielstrukturen (Transkriptome und Methylome) aus dem Vergleich A549^{WT} vs. A549L^{sub} mittels Venn Diagramm abzugleichen. Einflüsse auf das OS und DFS von hoch- und herunterregulierten Gensets wurden mittels Kaplan-Meier-Kurven in den jeweiligen Tumorgruppen abgebildet. Expressionsdaten wurden unter Verwendung des 75. Quartils in *low*- und *high*-Expriemierer unterteilt.

Für einen Abgleich stammzell-assoziiierter Gene wurden die Listen RAMALHO_STEMNESS_UP, RAMALHO_STEMNESS_DN und BHATTACHARYA_EMBRYONIC_STEM_CELL von der GSEA MSigDB (gsea-msigdb.org) exportiert. Die enthaltenen Zielstrukturen wurden zu einer Gesamtliste fusioniert und mit den TGFβ-Signaturen von A549L^{sub}- und A549^{WT}-Zellen verglichen. Anschließend wurden die Einflüsse auf das OS mittels Kaplan-Meier-Kurven unter Verwendung der GEPIA2-Datenbank analysiert. Venn Diagramme wurden *web*-basiert via molbiotools erstellt (molbiotools.com/listcompare.html).

2.2.6 STATISTIK

2.2.6.1 Statistische Auswertung & Datendarstellung

Diagramme wurden mit GraphPad Prism (V6) erstellt und die dargestellten Werten mit der Standardabweichung (*standard deviation*; **SD**) abgebildet. Detaillierte Informationen der statistischen Auswertung sind den Abbildungslegenden zu entnehmen. Wenn nicht anders vermerkt, wurden signifikante Ergebnisse mit einem Sternchen (*) in Abhängigkeit ihres Signifikanzniveaus kenntlich gemacht ($p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$; $p \leq 0,0001 = ****$). Signifikanztests erfolgten stets zweiseitig, wenn nicht anders angegeben. Abbildungen der Western Blot- und IFM-Analysen wurden für eine bessere Visualisierung über die Parameter Helligkeit und Kontrast angepasst.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von *SMAD2*-Gesamtexpressionen auf das Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten

Für eine erste Einschätzung zur Relevanz von *SMAD2* im NSCLC-Kontext wurden *SMAD2*-Gesamtexpressionen auf mRNA-Ebene mit dem Gesamtüberleben (*overall survival, OS*) von Lungenkrebspatienten *in silico* analysiert und in Kaplan-Meier Kurven abgebildet. Die p-Werte und medianen Überlebenszeiten beider Gruppen sind den Abbildungen zu entnehmen (Abb. 8, A-E).

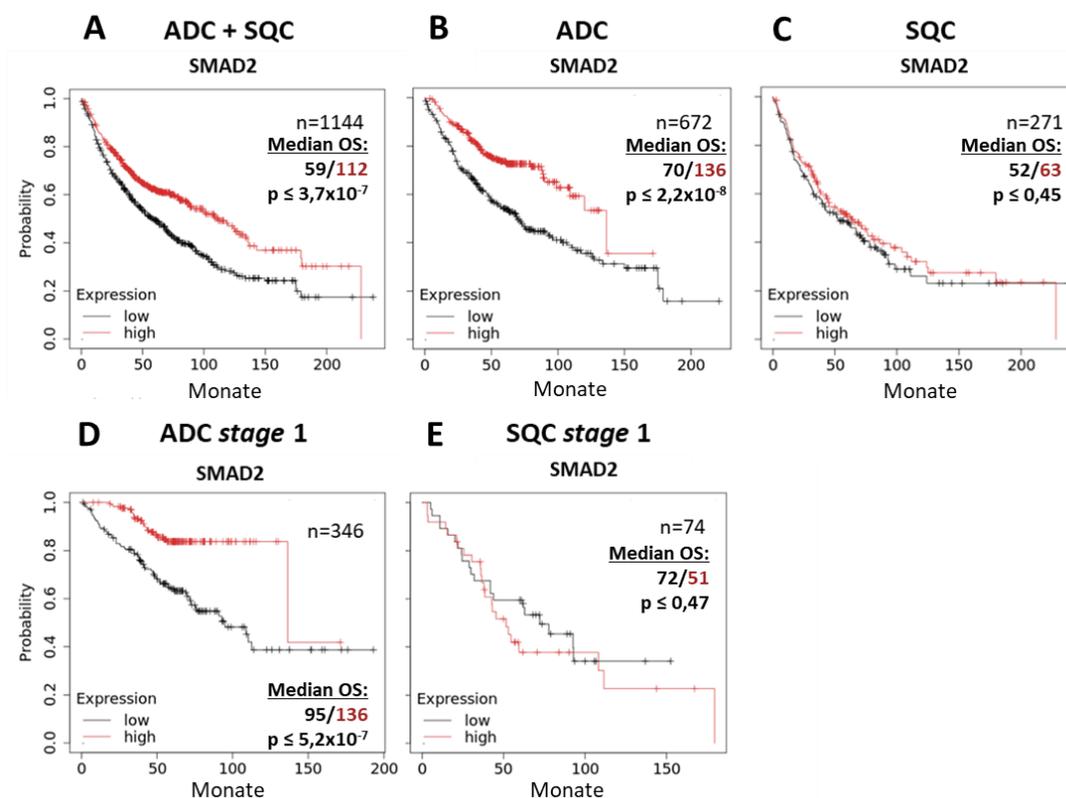


Abb. 8: Einfluss von *SMAD2*-Genexpressionen auf das Gesamtüberleben in NSCLC-Kohorten. *SMAD2*-Genexpressionen wurden *web*-basiert *in silico* mit dem Gesamtüberleben (OS; Monate) von NSCLC-Patienten mittels Kaplan-Meier-Kurven analysiert (KM-Plotter). Anhand des 50. Quartils wurden die Gruppen in *low* und *high* Exprimierer unterteilt und beide Hauptentitäten zusammen (ADC + SQC) (A) und getrennt voneinander analysiert (B-E). Die medianen Überlebenszeiten und korrespondierenden p-Werte der Log-Rank-Tests können den Abbildungen entnommen werden. Nach einer alternativen Bonferroni *multiple testing correction* ($\alpha = 0,05$) wurden p-Werte $\leq 0,01$ als signifikant bewertet.

Hohe *SMAD2*-Genexpressionen haben einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben von ADC-Patienten

Eine Analyse beider NSCLC-Entitäten (ADC + SQC) zeigte ein signifikantes Ergebnis für das Patientenüberleben der *high*-Gruppe mit 112 Monaten im Vergleich zur *low*-Gruppe mit 59 Monaten (Abb. 8, A). Eine deutlichere Auftrennung beider Gruppen erfolgte ab einer

Überlebenszeit von ≥ 50 Monaten. Diese setzte zudem früher ein, wenn nur ADCs berücksichtigt wurden (Abb. 8, B). Dabei betrug die Überlebensdifferenz beider Gruppen 66 Monate und fiel höher aus als bei der Analyse beider Entitäten mit 53 Monaten. Die ADC *stage 1*-Kohorte zeigte eine geringere Differenz der medianen Überlebenszeiten zwischen den Gruppen mit einem Unterschied von 41 Monaten. Dennoch zeigte sich hier ein besserer Verlauf in Bezug auf das OS, wenn hohe *SMAD2*-Genexpressionen vorlagen, da eine deutliche Auftrennung bereits zu einem frühen Zeitpunkt (0 – 40 Monate) im Vergleich zur ADC-Kohorte erfolgte (Abb. 8, D). Hingegen zeigten beide SQC-Analysen keine signifikanten Ergebnisse, weder unter Berücksichtigung aller SQCs noch bei SQC *stage 1*-Patienten (Abb. 8, C + E). Letztere Analyse zeigte im Bereich zwischen 50 - 100 Monaten eine Auftrennung, wobei hier die *low*-Gruppe einen günstigeren Verlauf andeutete (Abb. 8, E).

Die Analysen wiesen auf eine Relevanz der totalen *SMAD2*-Genexpression in ADCs hin, während der Einfluss bei SQCs nicht signifikant war. Dabei stand eine höhere *SMAD2*-Expression mit einem längeren Patientenüberleben im Zusammenhang. Daher wurde zunächst untersucht, wie sich Abundanzen des *SMAD2*-Gesamtproteins sowie C-terminale- und Linker-Phosphorylierungen auf Proteinebene in ADC- und SQC-Zelllinien darstellen.

3.2 *SMAD2* & Phospho-Isoformen in NSCLC-Zelllinien

Für die Untersuchungen wurden vier ADC-Zelllinien (A549, H838, H1650 und H1975) sowie einer SQC-Zelllinie (H520) verwendet. Die Antikörper waren entweder zum Nachweis des *SMAD2*-Gesamtproteins (**S2 total**) gegen ein N-terminales Epitop oder gegen spezifische Phosphorylierungen am C-Terminus (**pS2C**) bzw. der Linker-Domäne (Ser245/250/255; **pS2L**) gerichtet. Dazu wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie (**DFZ**) (Abb. 9) und Western Blot-Analysen untersucht (Abb. 10).

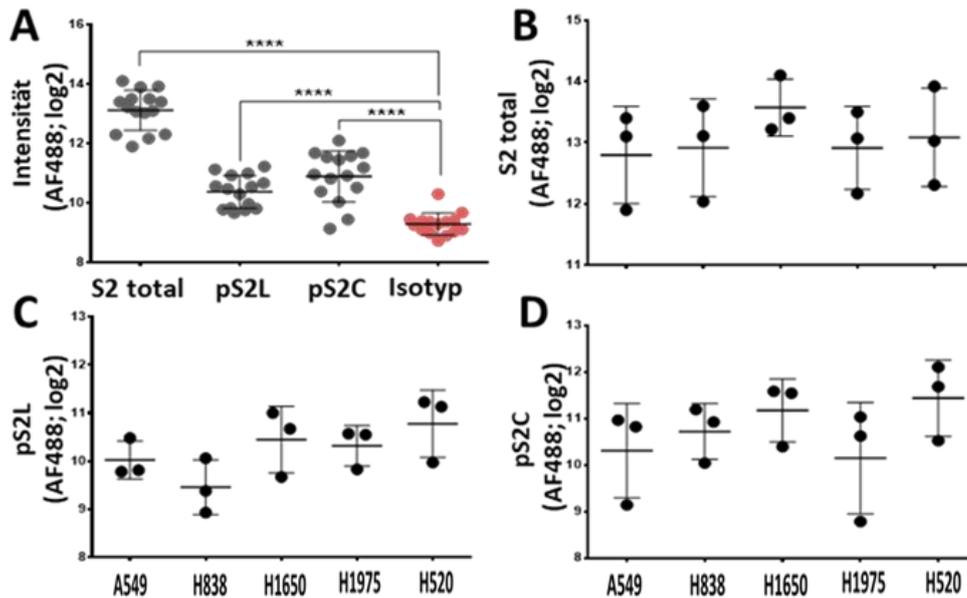


Abb. 9: SMAD2 und Phospho-Isoformen in NSCLC-Zelllinien. (A) Abgebildet wurden die mittleren Intensitätswerte (\pm SD; \log_2) für die Zielstrukturen S2 total, pS2L und pS2C (grau; AF488) der unter Medium-Bedingungen kultivierten Zelllinien A549, H838, H1650, H1975 und H520 ($n = 15$). Ein statistischer Vergleich erfolgte zu den mitgeführten Isotyp-Kontrollen (rot) ($n = 15$) mittels *one-way* ANOVA und Dunnett's *post-hoc* Test ($p \leq 0,001$). (B-D) Die basalen gemittelten Fluoreszenzintensitäten des SMAD2 Gesamtproteins und Phospho-Isoformen (\log_2 ; $n = 3$) wurden mittels *one-way* ANOVA und Tukey's *post-hoc* Test ($p \leq 0,05$) verglichen.

NSCLC-Zelllinien zeigen vergleichbare SMAD2-Gesamtprotein- und Phospho-Isoform Niveaus

Die spezifischen Färbungen für S2 total, pS2L und pS2C zeigten die erwarteten signifikanten Unterschiede zu den mitgeführten Isotyp-Kontrollen (Abb. 12, A). Bei einem Vergleich der Zelllinien waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar, weder bei S2 total noch bei den Phospho-Isoformen (Abb. 12, B-D). Bei pS2L zeigten H838 tendenziell ein geringeres Niveau, die Ergebnisse blieben jedoch nicht signifikant (Abb. 9, C). Insgesamt zeigten sich höhere Proteinniveaus für S2 total im Vergleich zu pS2L und pS2C. Zur Verifizierung der DFZ-Ergebnisse und zum Nachweis von SMAD2-Spleißvarianten wurden Western Blot-Analysen durchgeführt.

S2^{FL} und S2^{ΔE3} sind in NSCLC-Zelllinien nachweisbar und phosphoryliert

Für einen ersten Vergleich der SMAD2-, pS2L- und pS2C- Gesamtniveaus zwischen den Zelllinien wurden die jeweiligen S2^{FL}- und S2^{ΔE3}-Intensitätswerte addiert (Abb. 10; B-C).

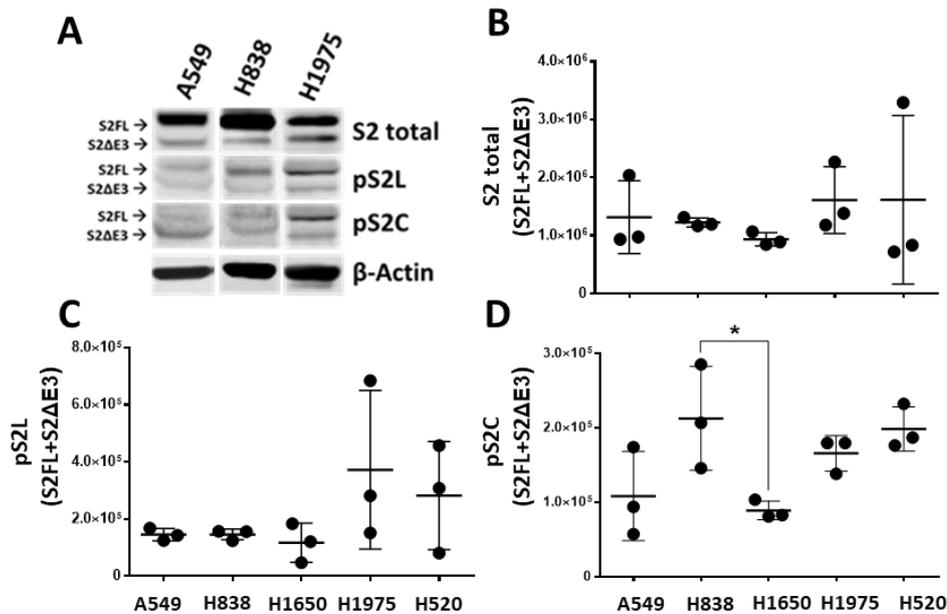


Abb. 10: SMAD2 und Phospho-Isoformen in Proteinlysaten von NSCLC-Zelllinien. (A) Exemplarische Darstellung der Western Blot-Analysen von drei der fünf getesteten Zelllinien (n = 3). (B – D) Die gemittelten Intensitätswerte (\pm SD) beider SMAD2-Spleißvarianten ($S2^{FL} + S2^{\Delta E3}$) wurden für eine Gesamtanalyse addiert. Ein Vergleich der Mittelwerte (n = 3) erfolgte mittels *one-way* ANOVAs und Tukey's *post-hoc* Tests ($p \leq 0,05$).

In allen getesteten NSCLC-Zelllinien waren $S2^{FL}$ und $S2^{\Delta E3}$ nachweisbar. Darüber hinaus waren beide Proteinvarianten sowohl C-terminal als auch innerhalb der Linker-Domäne phosphoryliert (Abb. 10, A). Nach Additionen der Intensitätswerte beider SMAD2-Spleißvarianten ($S2^{FL} + S2^{\Delta E3}$) waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den ADC-Zelllinien oder zur SQC-Zelllinie für das SMAD2-Gesamtprotein nachweisbar (Abb. 10, B). Die mittleren Intensitätswerte beider Phospho-Isoformen lagen etwa 10-fach geringer im Vergleich zum SMAD2-Gesamtprotein vor. Bei C-terminalen Phosphorylierungen wurde ein signifikanter Unterschied zwischen H838 und H1650 ermittelt, wobei H838 ein 2-fach höheres pS2C-Niveau zeigte (Abb. 10, D). Hingegen wurden keine Unterschiede bei der Linker-Phosphorylierung zwischen den Zelllinien analysiert (Abb. 10, C).

$S2^{FL}$ ist die vorherrschende SMAD2-Proteinvariante in ADC-Zelllinien

Im nächsten Schritt wurden die SMAD2-Spleißvarianten anhand der Intensitätswerte getrennt voneinander analysiert und die mittleren Proteinniveaus innerhalb jeder Zelllinie verglichen. Dabei stellte sich $S2^{FL}$ in allen ADC-Zelllinien als die vorherrschende Spleißvariante des SMAD2-Gesamtproteins dar. Mit Ausnahme von H520 zeigten alle

Zelltypen ein signifikantes Ergebnis, tendenziell lag ebenfalls in H520-Zellen eine höhere $S2^{FL}$ -Abundanz im vor (Abb. 11, A).

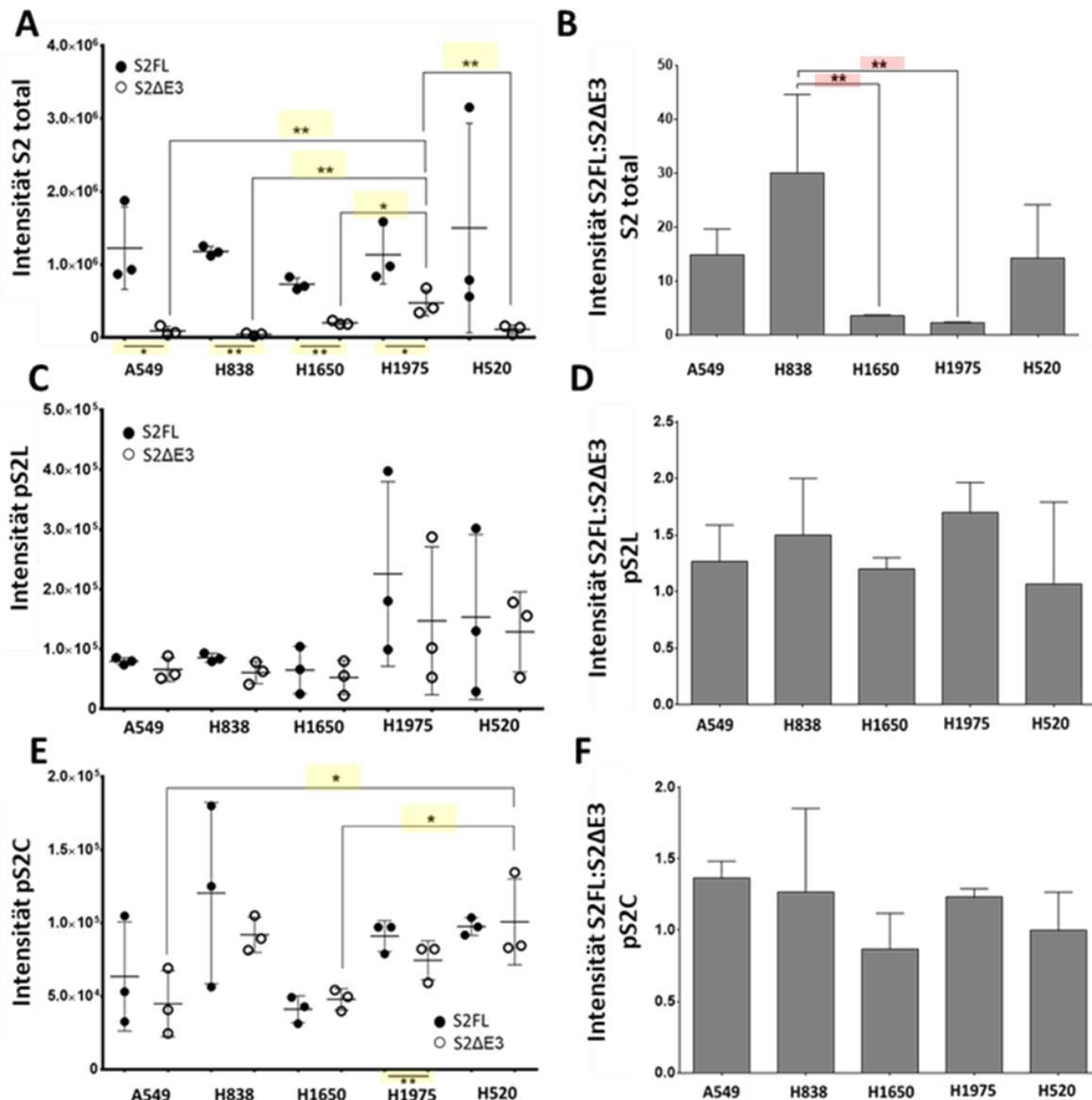


Abb. 11: SMAD2-Spleißvarianten und Phospho-Isoformen in NSCLC-Zelllinien. (A, C, E) Abgebildet wurden die mittleren Intensitätswerte (\pm SD) der Western Blot-Analysen ($n = 3$) der Spleißvarianten $S2^{FL}$ und $S2^{\Delta E3}$ für S2 total, pS2L und pS2C in fünf NSCLC-Zelllinien. Ein Vergleich der Proteinniveaus innerhalb einer Zelllinie erfolgte mittels gepaarter T-Tests ($p \leq 0,05$). Zelllinienübergreifend erfolgte dieser mittels RM *one-way* ANOVA und Sidak's *post-hoc* Test ($p \leq 0,01$). (B, D, F) Abgebildet wurden die Verhältniszahlen der Intensitätsniveaus (\pm SD) der fünf NSCLC-Zelllinien von $S2^{FL}$ zu $S2^{\Delta E3}$ ($n = 3$) für S2 total, pS2L und pS2C. Eine Signifikanzprüfung erfolgte unter Verwendung von RM *one-way* ANOVAs und Tukey's *post-hoc* Tests ($p \leq 0,01$).

Bei einem Vergleich der Spleißvarianten zueinander wies H520 bei $S2^{FL}$ die höchste Standardabweichung des Mittelwerts auf. Es lagen keine Unterschiede in den Niveaus von $S2^{FL}$ zwischen den Zelllinien vor. Hingegen zeigte sich in H1975-Zellen ein Unterschied des

$S2^{\Delta E3}$ -Niveaus, das im Vergleich zu den vier anderen untersuchten Zelllinien signifikant höher vorlag (Abb. 11, A).

Zelllinien mit *EGFR*-Mutationen zeigen geringere Verhältniswerte von $S2^{FL}$ zu $S2^{\Delta E3}$

Die Verhältniswerte von $S2^{FL}$ zu $S2^{\Delta E3}$ hatten abweichende Ausprägungen in den jeweiligen Zelllinien. H838 wies aufgrund des geringsten $S2^{\Delta E3}$ -Niveaus den höchsten Wert von 30,1 ($\pm 11,8$) in Relation zu $S2^{FL}$ auf. Das Verhältnis war signifikant höher im Vergleich zu H1975- und H1650-Zellen. H1975 zeigte den höchsten $S2^{\Delta E3}$ -Anteil am SMAD2-Gesamtprotein. Daher lag der Verhältniswert zu $S2^{FL}$ mit 2,4 ($\pm 0,05$) am niedrigsten vor. Ein ähnlich niedriger Verhältniswert wurde bei H1650 mit 3,6 ($\pm 0,12$) ermittelt (Abb. 11, B).

NSCLC-Zelllinien haben vergleichbare Phospho-Isoform Niveaus von $S2^{FL}$ und $S2^{\Delta E3}$

Unabhängig des SMAD2-Gesamtproteins einer Spleißvariante zeigten sich keine Unterschiede bei den Linker Phospho-Isoformen, weder innerhalb einer Zelllinie noch zu den Mittelwerten der anderen Zelltypen. H520 und H1975 wiesen im Vergleich zu den weiteren Messwerten sowohl bei $S2^{FL}$ als auch bei $S2^{\Delta E3}$ hohe Standardabweichungen auf (Abb. 11, C). Die gemittelten Signalintensitäten der C-terminalen Phospho-Isoform lagen in einem vergleichbaren Bereich wie bei pS2L vor. Hier waren die größten Abweichungen bei $S2^{FL}$ in H838-Zellen zu beobachten. Innerhalb der ADC-Zelllinien gab es keine Unterschiede der gemittelten Signalintensitäten beider SMAD2-Spleißvarianten. Im Vergleich zu H520 zeigten A549 und H1650 signifikant niedrigere C-terminal phosphorylierte $S2^{\Delta E3}$ -Niveaus (Abb. 11, E). Ein signifikanter Einfluss dieser auf die Verhältniswerte von $S2^{FL}$ zu $S2^{\Delta E3}$ blieb jedoch aus (Abb. 11, F). Insgesamt war festzustellen, dass trotz des wesentlich höheren Gesamtproteinniveaus von $S2^{FL}$ beide Phospho-Isoformen der SMAD2-Spleißvarianten in vergleichbaren Anteilen nachweisbar waren (Abb. 11, D + F).

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass $S2^{FL}$ die dominierende Proteinvariante in NSCLC-Zelllinien ist und eine vergleichbare Abundanz in den Zelltypen vorlag. Die Verhältniswerte der SMAD2-Spleißvarianten waren hingegen heterogen aufgrund unterschiedlicher $S2^{\Delta E3}$ -Niveaus. Insbesondere in H1975 und H1650 waren ähnliche und

höhere S2^{ΔE3}-Anteile nachweisbar. Interessanterweise führten diese nicht zu signifikanten Unterschieden im Vergleich zu den anderen Zelllinien, wenn die SMAD2-Gesamt-abundanz (S2^{FL} + S2^{ΔE3}) analysiert wurde (Abb. 10 + 11). Darüber hinaus tragen beide Zelllinien Mutationen im *EGFR*, somit könnte ein spezifischer genetischer Hintergrund möglicherweise Einfluss auf die SMAD2-Spleißvarianten haben. Des Weiteren waren in allen untersuchten Zelllinien beide Proteinvarianten sowohl innerhalb der Linker-Domäne als auch am C-terminalen Motiv phosphoryliert. Weder die grundsätzlich höheren S2^{FL}- noch die höheren S2^{ΔE3}-Niveaus in H1975 und H1650 tangierten dabei pS2L oder pS2C Ausprägungen. Diese lagen in allen untersuchten Zelltypen in vergleichbaren Anteilen vor. Als nächstes wurde untersucht, ob pS2L einen Einfluss auf das Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten hat.

3.3 Einfluss von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen auf das Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten

Um den Einfluss von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen auf das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben (*disease-free survival; DFS*) von NSCLC-Patienten (ADC + SQC) zu untersuchen, wurden die Gewebe mittels mIHC analysiert. Neben Tumor- vs. Stromaarealen wurden bei den Analysen ergänzend Tumorbereiche (Zentrum vs. Rand) berücksichtigt, da eine Wachstumszunahme und Gewebeinvasion von Tumoren in der vitalen Randregion zu vermuten war. Zur Charakterisierung von Tumor- und Immunzellen wurden **pan-Cytokeratin (panCK)**- und CD45-Färbungen mitgeführt. Als Mitose-Marker fungierte **phospho-Histon H3 (pHH3)**. Zunächst wurde die jeweilige Anzahl positiver Zellen je mm² in Tumor vs. Stroma und Tumorzentrum vs. -rand analysiert und verglichen (Abb. 12, A-D).

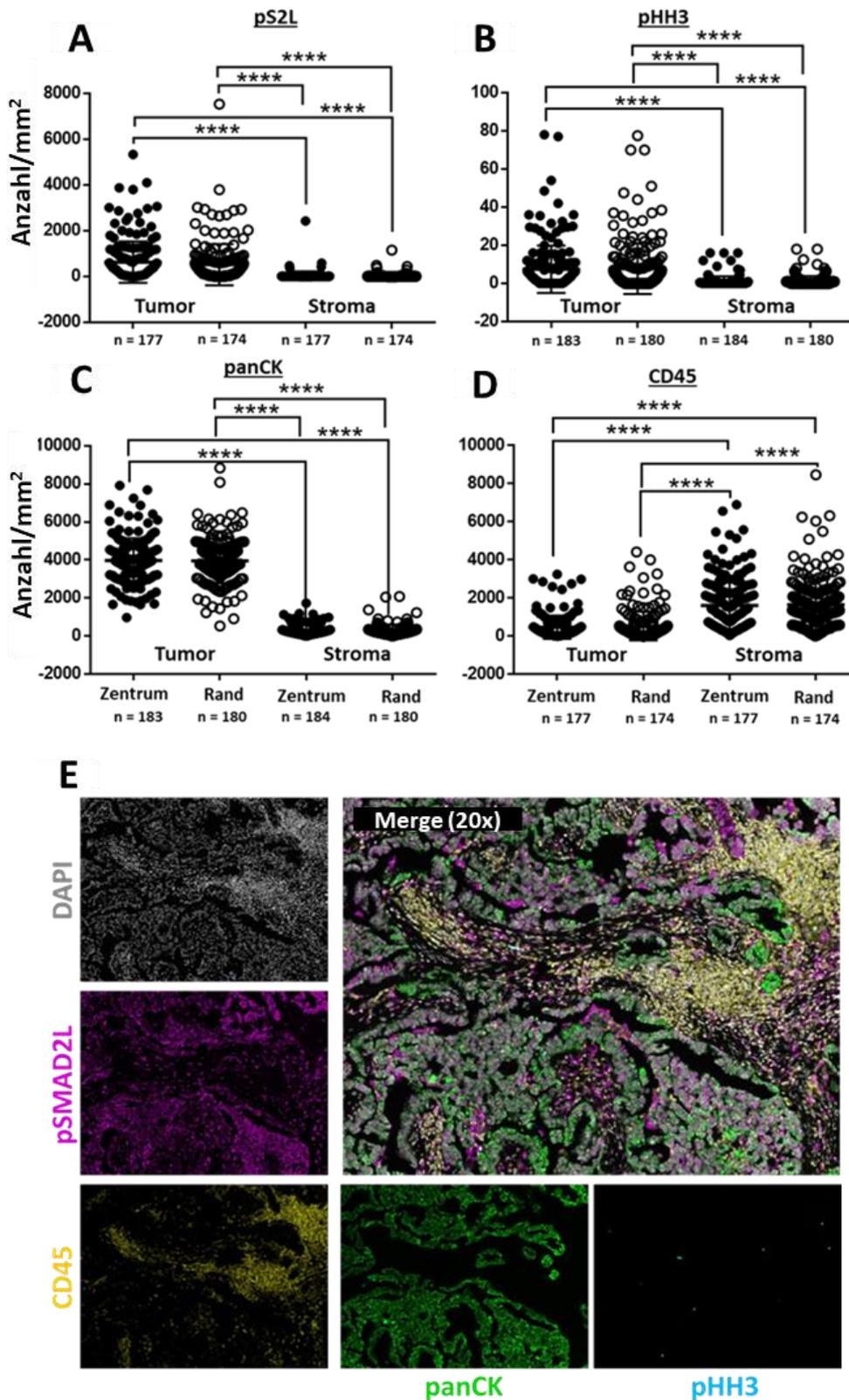


Abb. 12: pS2L-, pHH3-, panCK- und CD45-positive Zellen/mm² in Tumor vs. Stroma und Tumorzentrum- vs. -rand von NSCLC-Geweben. (A-D) Die NSCLC-Gewebe wurden mittels mIHC einer 4-plex-Färbung für phospho-SMAD2 Linker (A), phospho-Histon H3 (B), pan-Cytokeratin (C) und CD45 (D) unterzogen. Es wurden neben Tumor vs. Stroma ebenfalls Tumorbereiche berücksichtigt (Zentrum vs. Rand). Eine Signifikanzprüfung der gemittelten positiven Zellen (\pm SD) erfolgte durch eine *one-way* ANOVA mit Tukey's *post-hoc* Test ($p \leq 0,001$). (E) Repräsentative mIHC-Färbung eines NSCLC-Gewebes des Tumorzentrums (Vergrößerung 20x).

Im Tumorgewebe liegt eine höhere Anzahl pS2L-positiver Zellen im Vergleich zum Stroma vor

Wie erwartet zeigten die Marker zur Zellcharakterisierung im jeweiligen Vergleich eine signifikant höhere Anzahl positiver Zellen für panCK in Tumor- und für CD45 in Stromaarealen. Unterschiede zwischen den Tumorbereichen (Zentrum vs. Rand) waren hingegen nicht feststellbar (Abb. 12, C+D). Des Weiteren lag eine signifikant höhere Anzahl pS2L-positiver Zellen im Tumor vor, wenn diese zum Stroma verglichen wurden. Innerhalb der Tumoreareale gab es keine Unterschiede zwischen Tumorzentrum und -rand (Abb. 12, A). Gleichermäßen verhielt es sich für die Anzahl pHH3-positiver Zellen (Abb. 12, B).

Eine höhere Anzahl pS2L-positiver Tumor- und Immunzellen hat einen negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben

Für OS- und DFS-Analysen wurden konsolidierte Ergebnisse der Färbungen von Tumor vs. Stroma und Tumorzentrum (**Z**) vs. -rand (**R**) berücksichtigt (Abb. 13).

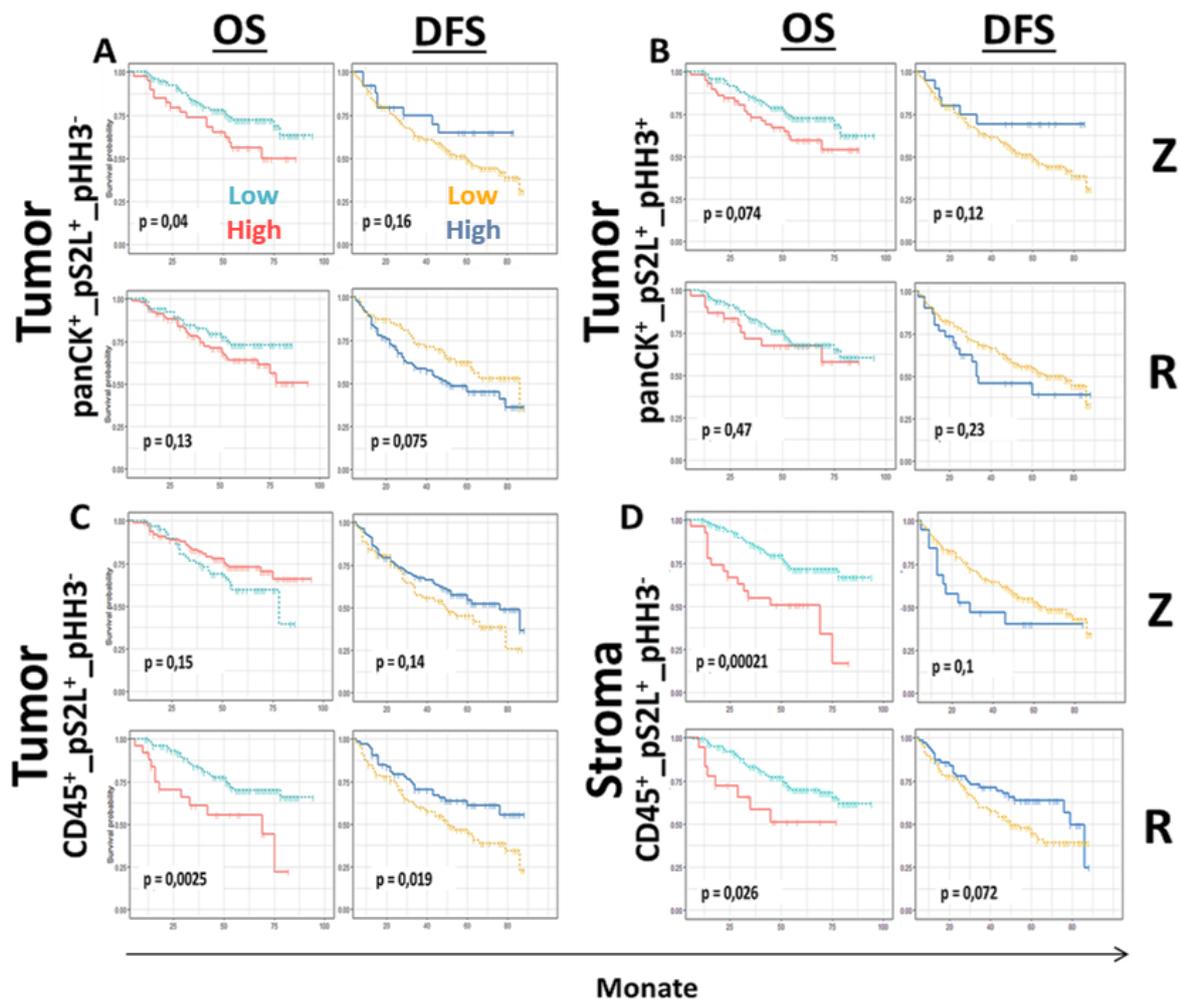


Abb. 13: Einfluss von pS2L-positiven Zellen auf das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben von NSCLC-Patienten. Für das Gesamt (OS)- und krankheitsfreie Überleben (DFS) wurden sowohl konsolidierte Ergebnisse (Y-Achsen) von Tumor vs. Stroma als auch Tumorzentrum (Z) vs. -rand (R) analysiert. Die Berechnung der *cutoffs* erfolgte mittels R (*survminer; optimized cutpoint*). Ergebnisse der Log-Rank-Tests mit $p \leq 0,05$ wurden als signifikant bewertet.

In nicht-mitotischen Tumorzellen (pHH3-negativ) des Zentrums zeigte eine höhere Anzahl pS2L-positiver Zellen einen signifikant negativen Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben. Auf das DFS gab es keinen signifikanten Einfluss. Für pHH3-negative Tumorzellen des Tumorrands blieben signifikante Ergebnisse ebenfalls aus. Es waren lediglich Tendenzen eines schlechteren Einflusses sowohl für das OS als auch DFS erkennbar (Abb. 13, A). In mitotischen Tumorzellen (pHH3-positiv) ergab sich ein ähnliches Gesamtbild. Alle Analysen für das OS und DFS blieben nicht signifikant (Abb. 13, B). Hingegen zeigten tumorinfiltrierende-, nicht-mitotische Immunzellen (CD45-positiv, pHH3-negativ) des Tumorzentrums eine entgegengesetzte Tendenz für das OS zum Tumorrand. Eine höhere Anzahl pS2L-positiver Zellen wirkte sich tendenziell positiv auf das Gesamtüberleben aus, das Ergebnis blieb aber nicht signifikant. Eine höhere Anzahl

pS2L-positiver Zellen im Tumorrand hatte hingegen einen signifikant negativen Effekt auf das OS und DFS. Ferner zeigte sich eine deutlichere Auftrennung der *high*- und *low*-Gruppen beim Gesamt- im Vergleich zum krankheitsfreien Überleben. Eine Vergleichsanalyse unter Berücksichtigung pHH3-positiver Zellen konnte aufgrund einer zu geringen Anzahl nicht erfolgen (Abb. 13, C). Die Analysen des Stromas zeigten, dass nicht-mitotische pS2L-positiv Immunzellen sowohl in Bereichen des Tumorzentrums als auch – rands einen signifikant negativen Effekt auf das Gesamtüberleben hatten. Die Tendenz für das DFS stellte sich von Tumorzentrum und –rand gegensätzlich dar, die Ergebnisse blieben aber nicht signifikant. Eine Analyse panCK-positiver Zellen im Stroma war aufgrund einer zu geringen Zellzahl nicht möglich (Abb. 13, D).

Insgesamt hatte die Anzahl pS2L-positiver Zellen einen stärkeren Effekt auf das Gesamt- als das krankheitsfreie Überleben von NSCLC-Patienten. Alle signifikanten Ergebnisse waren zudem negativ mit dem OS assoziiert. Insbesondere eine hohe Anzahl pS2L-positiver Immunzellen standen in einem negativen Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben. Diese Beobachtungen waren unabhängig davon, ob diese tumorinfiltrierend oder in Stromaarealen auftraten. Die Analysen machten deutlich, dass neben einer *SMAD2*-Gesamtexpression ebenfalls Linker-Phosphorylierungen das Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten beeinflusst. Da insbesondere R-SMAD Linker-Phosphorylierungen in anderen Karzinomen mit dem Zellwachstum in Verbindung stehen (8) (9) (41), wurden diese in Zusammenhang mit dem Zellzyklus näher untersucht.

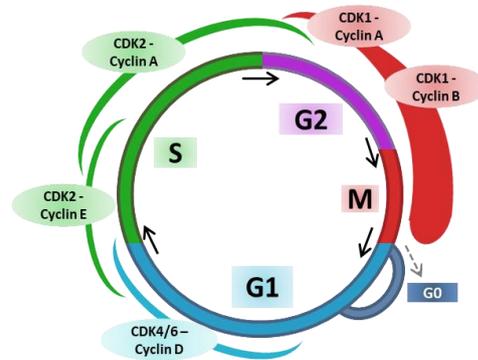
3.4 SMAD2 und Phospho-Isoformen in der Proliferation von NSCLC-Zellen

Ein zentrales Schlüsselmerkmal von Krebszellen ist die Erlangung einer gesteigerten Proliferationsfähigkeit (11). Des Weiteren werden in der Literatur Phospho-Isoformen von R-SMADs mit dem Zellwachstum in Verbindung gebracht (12) (13) (46). Daher wurde näher untersucht, ob und inwieweit SMAD2 Linker-Phosphorylierungen in NSCLC-Zellen mit der Zellteilung assoziiert sind. Dafür wurden fünf NSCLC-Zelllinien vor den DFZ-Analysen mit verschiedenen **CDK-Inhibitoren (CDK-I.)** oder **Pirfenidon (PIRF)** stimuliert. Bei letzterem handelt es sich um ein zugelassenes Medikament, das bei der **idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF)** Anwendung findet. Erst kürzlich wurde durch unsere Forschungsgruppe nachgewiesen, dass eine Behandlung von NSCLC-Zellen einen

Zellarrest in der G₀/G₁-Phase sowie eine Reduktion von SMAD2, -3-Niveaus bewirkt (30). CDKs sind hingegen Schlüsselregulatoren von Serin/Threonin-Kinasen, die ein Fortschreiten der Zellteilung im Zusammenspiel mit den zyklisch exprimierten Cyclinen regulieren und kontrollieren (Abb. 14).

Abb. 14: Zellzyklusphasen in somatischen Zellen.

Die Abbildung stellt schematisch und vereinfacht die Hauptzellzyklusphasen in somatischen Zellen dar. CDKs bilden mit den zyklisch auftretenden Cyclinen aktive Komplexe, um einen Übertritt von einer Zellzyklusphase in die Nächste zu gewährleisten (Abb. nicht anschließend; nach (81)). Hinweise: CDKs = *Cyclin dependent kinases*; G₁ = *Gap 1*; S = DNA-Synthese; G₂ = *Gap 2*; M = Mitose; G₀ = Ruhephase.



Spezifische Cyclin/CDK-Komplexe ermöglichen eine Transition von Restriktionspunkten und somit den Übergang von einer Zellzyklusphase in die Nächste. Dabei werden die Hauptzellzyklusphasen in **Gap 1** (G₀/G₁), DNA-Synthese (S), **Gap 2** (G₂) und **Mitose** unterteilt. In der vorliegenden Arbeit wurden Inhibitoren gegen CDK1, CDK2 und CDK4/6 eingesetzt, um mögliche Einflüsse auf die SMAD2 Linker-Phosphorylierung zu untersuchen. Letztere ermöglichen den Übergang von der G₁- in die S-Phase. Kombinierte CDK4/6-Inhibitoren werden bspw. als ergänzendes Medikament (z. B. Palbociclib) für die Behandlung bei metastasiertem Brustkrebs eingesetzt. CDK2 tritt hingegen von der späten G₁- über die S-Phase bis hin zur frühen G₂-Phase auf und interagiert insbesondere mit Cyclin A und –E. Im Gegensatz dazu interagiert CDK1 insbesondere mit Cyclin B ab der späten G₂- bis zum Ende der M-Phase (Abb. 14) (84).

3.4.1 Effekte von CDK-Inhibitoren und PIRF auf den Zellzyklus von NSCLC-Zellen

Um sicherzustellen, dass CDK-Inhibitoren bzw. PIRF einen ausreichenden Effekt auf den Zellzyklus von NSCLC-Zelllinien hatten, wurden zunächst die prozentualen Zellanteile in den Zellzyklusphasen bestimmt (Abb. 5). Anschließend wurden die Werte zu den korrespondierenden Lösungsmittelkontrollen verglichen. Ergänzend wurden Medium-Kontrollen zur Orientierung der basalen Zellzyklusverteilung mitgeführt (Abb. 15).

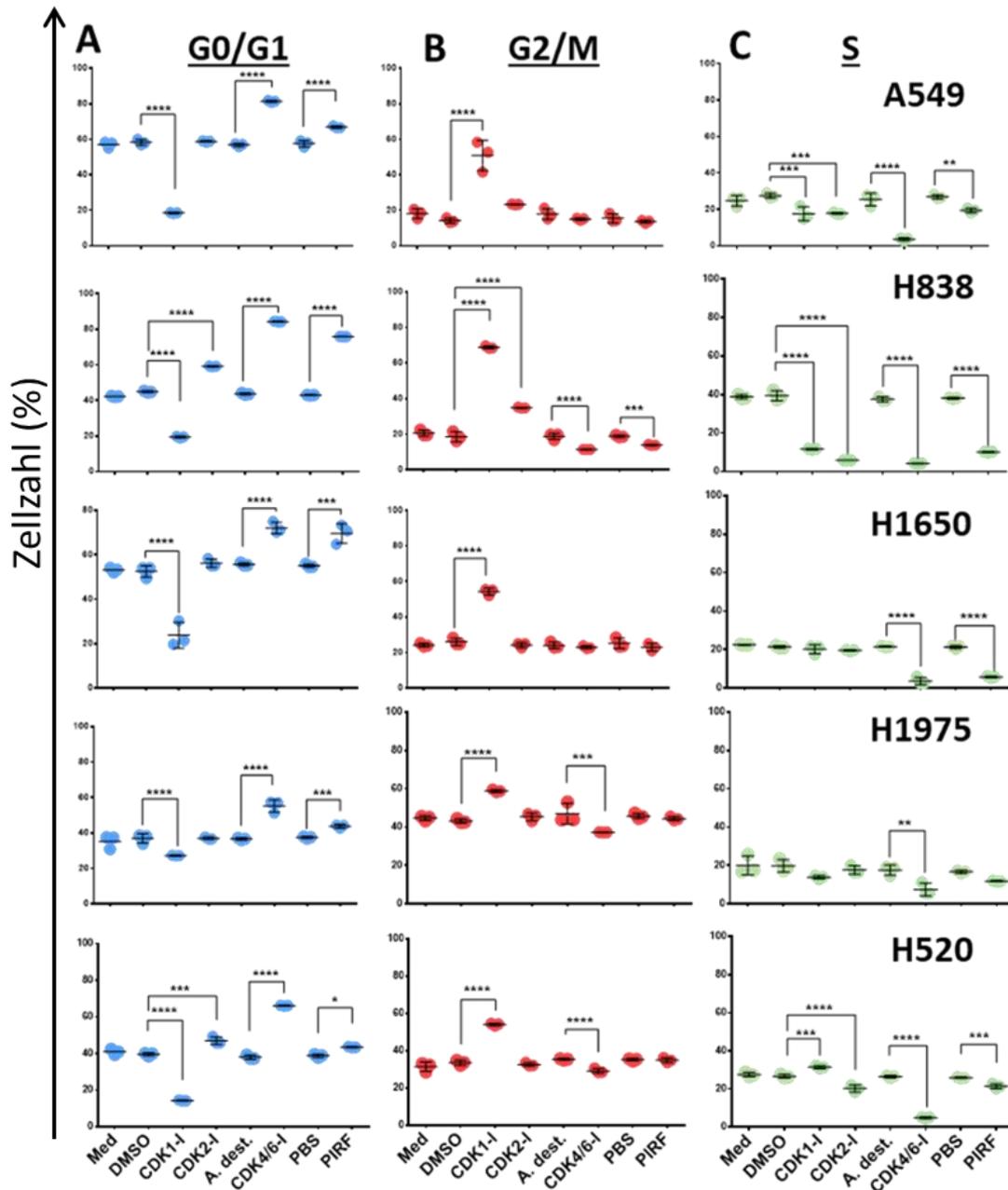


Abb. 15: Effekte von CDK-Inhibitoren und PIRF auf den Zellzyklus von NSCLC-Zellen. Fünf NSCLC-Zelllinien wurden für 24 h mit Inhibitoren gegen CDK1, -2 oder -4/6 (10 μ M) bzw. PIRF (1,5 mg/ml) stimuliert. Als Kontrollen wurden die entsprechenden Lösungsmittel der Substanzen in den gleichen Volumina mitgeführt. Es wurden die prozentualen Anteile (\pm SD) der Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1 (A), G2/M (B) und S (C) von je drei biologischen Replikaten ermittelt, die sich aus jeweils drei gemittelten technischen Replikaten ergaben. Vergleiche erfolgten paarweise mittels RM *one-way* ANOVA und Sidak's *post-hoc* Test ($p \leq 0,01$).

CDK-Inhibitoren und PIRF beeinflussen Zellpopulationen in den Zellzyklusphasen

Wie erwartet führten die verschiedenen Behandlungen zu Verschiebungen der Zellanteile in den entsprechenden Zyklusphasen. Eine Stimulation mit dem CDK1-Inhibitor resultierte in allen Zelllinien in einen signifikanten G2/M-Arrest. Dies führte ebenfalls zu signifikanten Abnahmen von Zellen innerhalb der G0/G1-Phase (Abb. 15, A + B). A549,

H838 und H520 zeigten zudem signifikante Veränderungen in der S-Phase im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (Abb. 15, C). Ein ebenfalls einheitliches Ergebnis über alle Zelllinien hinweg ergab sich nach Stimulationen mit dem CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib). Die Behandlungen führten zu gegenteiligen Effekten im Vergleich zum CDK1-Inhibitor. Demnach kam es zu signifikanten Zellarresten in der G0/G1-Phase, der einen Rückgang von Zellen innerhalb der S-Phase nach sich zog, ebenfalls mit signifikanten Veränderungen bei allen Zelltypen (Abb. 15, A + C). H838, H1975 und H520 zeigten überdies signifikante Abnahmen von Zellen in der G2/M-Phase (Abb. 15, B). Eine Behandlung mit dem CDK2-Inhibitor führte zu heterogenen Ergebnissen. Bei H838 und H520 kam es bspw. zu einem Anstieg von Zellen in der G0/G1-Phase (Abb. 15, A.). In A549 und H838 wurden hingegen signifikante Zunahmen von Zellen innerhalb der G2/M-Phase beobachtet (Abb. 14, B) und bei A549, H838 und H520 waren signifikante Reduktionen von Zellen in der S-Phase nachweisbar (Abb. 15, C). Hingegen blieben bei H1650 und H1975 signifikante Beobachtungen aus. Nach PIRF Stimulationen bestätigte sich ein erwarteter G0/G1-Arrest in allen Zelllinien (Abb. 15, A). Außer bei H1975 zeigten sich zudem signifikant geringere Zellanteile in der S-Phase (Abb. 15, C) und bei H838 zudem in der G2/M-Phase (Abb. 15, B).

Insgesamt machten die Ergebnisse deutlich, dass die getesteten NSCLC-Zellen sensitiv auf Stimulationen mit CDK-Inhibitoren und PIRF reagierten. Die gewählten Konzentrationen sowie die Behandlungsdauer zeigten ausreichende Effekte in allen Zelllinien. Insbesondere A549, H838 und H520 zeigten bei allen Behandlungen mindestens eine signifikante Veränderung der prozentualen Zellanteile innerhalb einer Zellzyklusphase im Vergleich zur entsprechenden Kontrollstimulationen.

3.4.2 Zellzyklusunabhängige Analysen stimulierter NSCLC-Zellen

Die stimulierten NSCLC-Zellen wurden unabhängig vom Zellzyklus analysiert, um mögliche Auswirkungen auf SMAD2-Gesamtprotein- und Phospho-Isoform-Niveaus zu untersuchen. Wie beschrieben, wurden die Mittelwerte der Gesamtfluoreszenzintensitäten aus den Histogrammen jeder Zelllinie extrahiert (Abb. 5) und zu den mitgeführten Kontrollen verglichen (Abb. 16).

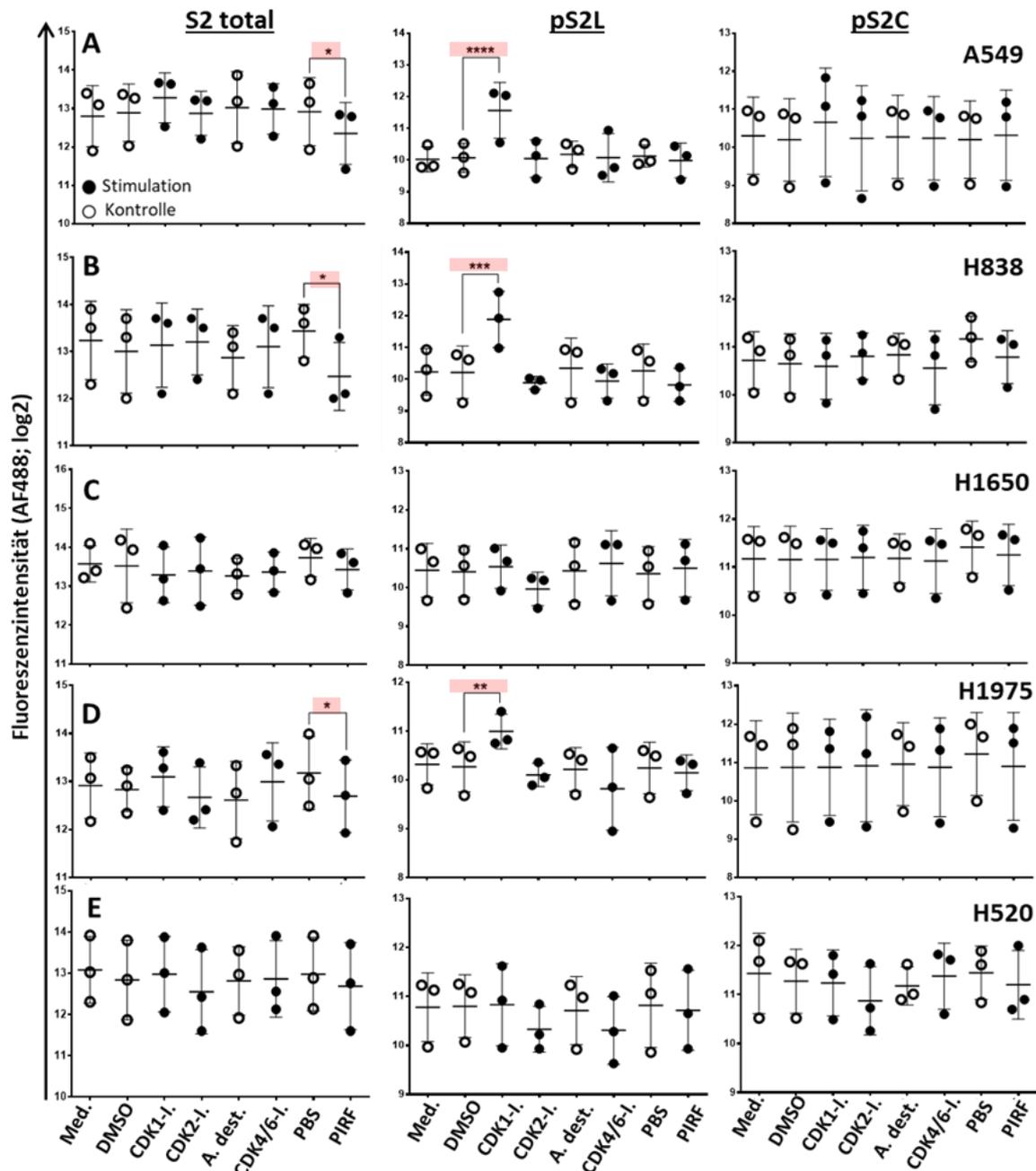


Abb. 16: SMAD2 und Phospho-Isoformen in stimulierten NSCLC-Zelllinien. Abgebildet wurden die mittleren Gesamtfluoreszenzintensitäten (\pm SD) für S2 total, pS2L und pS2C von fünf NSCLC-Zelllinien nach einer Stimulation mit CDK-Inhibitoren (10 μ M) oder PIRF (1,5 mg/ml) ($n = 3$). Ein Vergleich erfolgte mittels RM *one-way* ANOVA und Sidak's *post-hoc* Test ($p \leq 0,05$) paarweise zur entsprechenden Kontrollbehandlung.

CDK1-Inhibitor- und PIRF-Stimulationen beeinflussen S2 total bzw. SMAD2 Linker-Phosphorylierungen

Wie bereits bekannt (2), zeigte sich ein signifikant geringeres SMAD2-Gesamtproteinniveau nach PIRF-Behandlungen im Vergleich zu den Kontrollen in drei von fünf NSCLC-Zelllinien (Abb. 16, A, B + D; li.). Für H1650 und H520 ergaben sich gleiche Tendenzen, die Unterschiede blieben jedoch nicht signifikant (Abb. 16, C + E; li.). Alle

weiteren Stimulationen führten in keiner Zelllinie zu signifikanter Veränderung der SMAD2-Gesamtproteinabundanz. In A549, H838 und H1975 ergab sich nach Stimulationen mit dem CDK1-Inhibitor ein signifikanter Anstieg der SMAD2 Linker-Phosphorylierung (Abb. 16, A, B + D; mittig). H1650 und H520 wiesen hingegen keine Veränderungen auf (Abb. 16, C + E; mittig). Des Weiteren hatte kein Stimulanz Einfluss auf die C-terminale Phospho-Isoform, unabhängig des Zelltyps (Abb. 16, A-E; re.).

Die Ergebnisse zeigten, dass eine Behandlung mit PIRF in drei Zelllinien zu einer Abnahme des SMAD2-Gesamtproteins führte. Einflüsse auf die Phospho-Isoformen waren hingegen nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu führte ein induzierter G2/M-Arrest (CDK1-Inhibitor) in den gleichen Zelltypen zu einem Anstieg von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen. Unter basalen Bedingungen befindet sich lediglich ein geringer Anteil an Zellen in der Mitose. Daher wurde anscheinend erst durch den G2/M-Arrest eine mögliche Assoziation von pS2L-Ereignissen mit der Mitose in NSCLC-Zellen ersichtlich. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden detailliertere Zellzyklus-basierte Analysen durchgeführt.

3.4.3 Zellzyklusabhängige Analysen unstimulierter und stimulierter NSCLC-Zellen

Aufgrund signifikant höherer SMAD2 Linker-Phosphorylierungen nach einem induzierten G2/M-Arrest wurden die Daten aus den NSCLC-Stimulationen nochmals in Abhängigkeit des Zellzyklus analysiert. Dazu wurde die *gating*-Strategie angepasst, um Intensitätswerte in der G0/G1- und G2/M-Phase getrennt voneinander zu analysieren (Abb. 5, E-F). Um zu prüfen, ob unter basalen Bedingungen verschiedene Niveaus von SMAD2-Zielstrukturen vorlagen wurden die Fluoreszenzintensitäten von der G0/G1- zur G2/M-Phase in fünf NSCLC-Zelllinien analysiert und verglichen (Abb. 17, A+B).

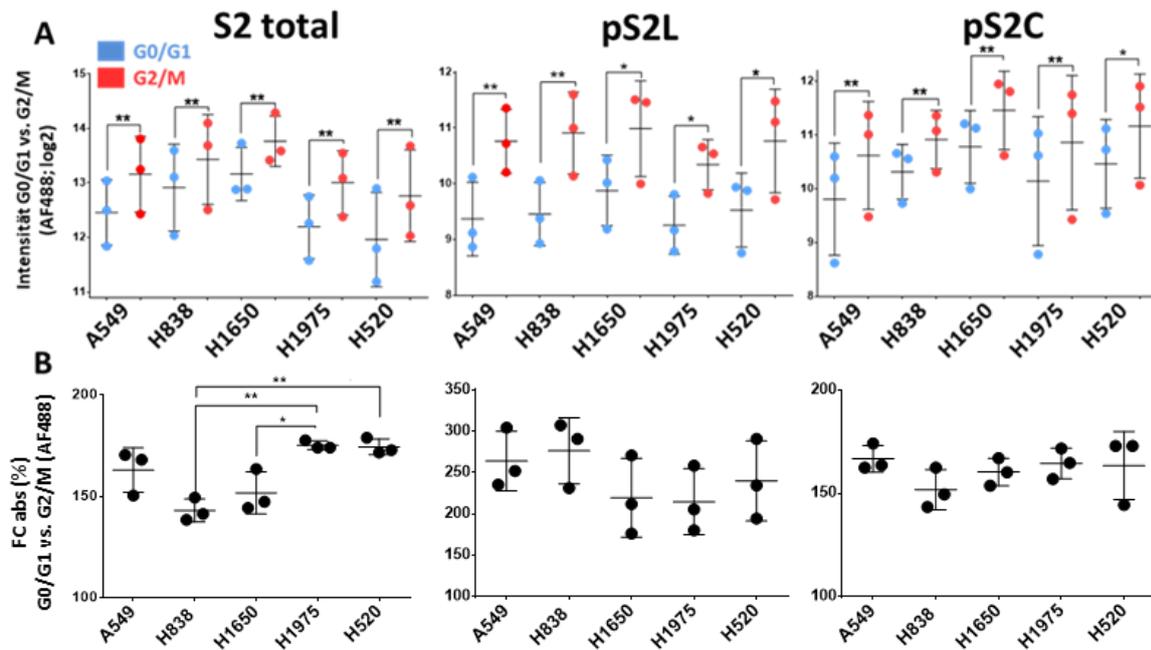


Abb. 17: SMAD2 und Phospho-Isoformen in der G0/G1- und G2/M-Phase unstimulierter NSCLC-Zellen. (A) Abgebildet wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (\pm SD; log₂) innerhalb der G0/G1- bzw. G2/M-Phase aus den DFZ-Analysen von fünf NSCLC-Zelllinien (n = 3) für S2 total, pS2L und pS2C (AF488). Signifikanzprüfungen erfolgte mittels gepaarter T-Tests ($p \leq 0,05$). (B) Die absoluten FC-Werte (G0/G1 vs. G2/M) der fünf NSCLC-Zelllinien (n = 3) wurden als prozentuale Mittelwerte (\pm SD) abgebildet und mittels RM *one-way* ANOVA mit Tukey's *post-hoc* Test ($p \leq 0,05$) zueinander verglichen.

SMAD2 und Phospho-Isoformen unterliegen dynamischen Veränderungen während des Zellzyklus

Die Analysen der Signalintensitäten von der G0/G1- zur G2/M-Phase unstimulierter NSCLC-Zelllinien ergaben ein einheitliches Bild für das SMAD2-Gesamtprotein und beide Phospho-Isoformen. Die Niveaus für alle drei SMAD2-Zielstrukturen nahmen von der G0/G1- zur G2/M-Phase signifikant zu. Diese Beobachtungen wurden unabhängig des Zelltyps gemacht. Darüber hinaus war dies auch der Fall, wenn das SMAD2-Gesamtprotein *per se* niedriger vorlag, wie bei H1975 und H520 (Abb. 17, A; li.). Die gemittelten Prozentwerte der Signalzunahmen von der G0/G1- zur G2/M-Phase unter Berücksichtigung aller Zelllinien ergaben 61,6 % ($\pm 12,6$ %) für das SMAD2-Gesamtprotein und 61,3 % ($\pm 5,2$ %) für die C-terminale Phosphorylierung. Ferner ergaben sich für das SMAD2-Gesamtprotein signifikante Unterschiede zwischen H838 und H1975 bzw. H520 sowie zwischen H1650 und H1975. Hier zeigten H838 und H1650 die geringsten und H1975 und H520 die höchsten Zunahmen von der G0/G1- zu G2/M-Phase (Abb. 16, B; li.). Die gemittelte prozentuale Zunahme der SMAD2 Linker-Phosphorylierung lag mit +143 % ($\pm 24,1$ %) im Vergleich zu S2 total und pS2C 2,3-fach höher vor. Signifikante Unterschiede

beider Phospho-Isoformen zwischen den Zelllinien blieben hingegen aus (Abb. 17, B; mittig + re.).

Die Ergebnisse der analysierten Proteinniveaus in den G0/G1- und G2/M-Phasen zeigten, dass sowohl das SMAD2-Gesamtprotein als auch beide Phospho-Isoformen dynamische Veränderungen während der Proliferation erfahren. Dabei kam es in allen untersuchten Zelllinien und bei allen drei SMAD2-Zielstrukturen zu Zunahmen. Die höchsten Zunahmen konnten in allen untersuchten Zelltypen bei der SMAD2 Linker-Phosphorylierung beobachtet werden. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden pS2L-Niveaus in A549-Zellen mittels IFM in der Interphase und Mitose untersucht.

SMAD2 Linker-Phosphorylierungen liegen in den Mitose-Phasen erhöht vor

Die Untersuchungen unstimulierter A549-Zellen zeigten in der Interphase geringe pS2L-Signale, die als distinkte Punkte (ein bis zwei, selten auch drei) im Nukleus lokalisiert waren (Abb. 17, A). Wie zuvor aus den zellzyklusabhängigen DFZ-Analysen hervorging, bestätigten sich höhere pS2L-Niveaus in den Mitose-Phasen. Dabei lag das Intensitätssignal nach Eintritt in die Prophase höher vor. In der Meta- und zur Anaphase waren die höchsten pS2L-Niveaus detektierbar. Im Vergleich dazu zeigten Zellen die sich in der Telophase befanden geringere SMAD2 Linker-Phosphorylierungen (Abb. 18, B).

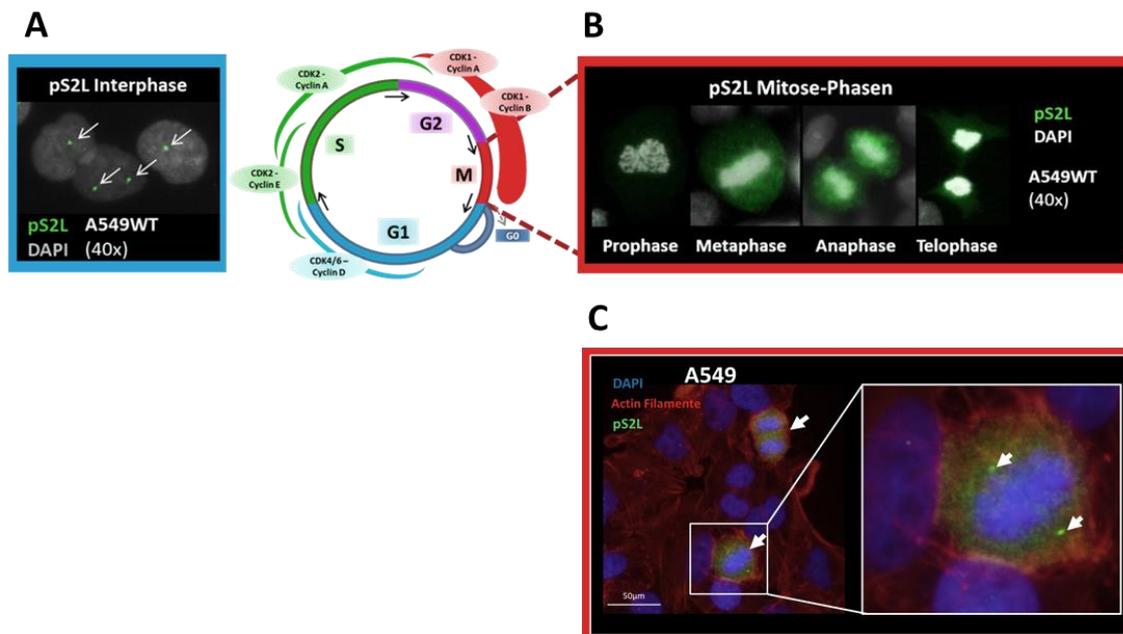


Abb. 18: SMAD2 Linker-Phosphorylierungen in der Interphase und Mitose von A549-Zellen. (A) A549-Zellen in der Interphase und schematische Abbildung der Zellzyklusphasen. pS2L-Signale (AF488; grün) waren als distinkte Punkte im Nucleus (DAPI; grau) lokalisiert. **(B)** pS2L-Signale innerhalb der Mitose-Phasen mit den höchsten Intensitäten in der Meta- und Anaphase. **(C)** A549-Zellen in Interphase und Mitose. Erhöhte pS2L-Signale in Meta- und Telophase (weiße Pfeile, li.). Vergrößerung (weißer Kasten) zeigt Metaphase mit punktueller pS2L-Detektion (weiße Pfeile, re.) neben der kondensierten DNA (DAPI, blau). Actin Filamente wurden mittels Rhodamin-Phalloidin (TRIC; rot) dargestellt. Hinweise: Maßstabsbalken = 50 µm.

Die punktuellen Strukturen, die bereits in der Interphase beobachtet wurden blieben auch während der Mitose ersichtlich und erinnerten an die Mitosespindel und Spindelpole (Centrosomen) (Abb. 18, C). Insgesamt legten die Analysen ein zellzyklusabhängiges Auftreten von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen nahe, die insbesondere in den Mitose-Phasen deutlich erhöht vorlagen.

SMAD2 Linker-Phosphorylierungen sind mit Pericentrin und phospho-Histon H3 kolokalisiert

Aufgrund der observierten punktuellen pS2L-Strukturen in direkter Nähe der kondensierten DNA wurden simultane Färbungen von A549-Zellen mit Pericentrin durchgeführt. Bei Pericentrin handelt es sich um ein zentrales Protein der Centrosomen, das an der Ausbildung der mitotischen Spindel beteiligt ist (85). Die detektierten Signale zeigten eine Kolokalisation mit pS2L (hier: Metaphase) in A549-Zellen (Abb. 19, A). Im gleichen Zuge wurden ebenfalls Doppelfärbungen mit dem Mitose-Marker phospho-Histon H3 (Ser10) (pHH3) durchgeführt (86) (87). Während für diesen wie erwartet ausschließlich spezifische DNA-Regionen innerhalb der Mitose-Phasen (hier: Anaphase)

detektiert wurden, war pS2L in der gesamten Zelle nachweisbar. Darüber hinaus zeigte sich ebenfalls eine partielle Kolokalisation von pS2L- und pHH3-Strukturen an den kondensierten DNA-Regionen (Abb. 19, B).

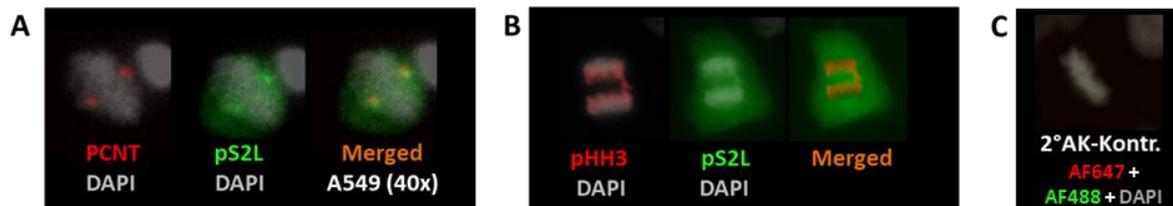


Abb. 19: Kolokalisationen von Pericentrin und pHH3 mit pS2L in mitotischen A549-Zellen. (A) Unstimulierte A549-Zellen ($n = 3$) zeigten eine Kolokalisation von Pericentrin (PCNT; rot; TRITC) und pS2L (grün; AF488) als punktuelle Strukturen neben der kondensierten DNA (grau; DAPI). Hier gezeigt innerhalb der Metaphase. **(B)** A549-Zellen ($n = 3$) zeigten eine Kolokalisation von pS2L (AF488; grün) mit pHH3 (TRITC; rot) während der Mitose. Hier dargestellt innerhalb der Anaphase. **(C)** Repräsentative Sekundärantikörper-Kontrolle der IFM-Färbungen mit TRITC (rot) und AF488 (grün) sowie der DNA (DAPI; grau) einer A549-Zelle in der Metaphase.

Phospho-Histon H3 positive Zellen zeigen besonders hohe pS2L-Intensitäten

Eine nähere Untersuchung der DFZ-Daten zeigte ausschließlich bei pS2L eine Subpopulation von Zellen mit vielfach höheren pS2L-Signalintensitäten ($\geq 4 \times 10^3 = \text{pS2L}^+$) innerhalb der G2/M-Phase. Diese lagen unter Medium-Bedingungen in allen fünf Zelllinien in einem vergleichbaren prozentualen Anteil zur Gesamtpopulation vor. Für pHH3 waren ebenfalls ähnlich große Zellpopulationen innerhalb der G2/M-Phase nachweisbar (Abb. 20).

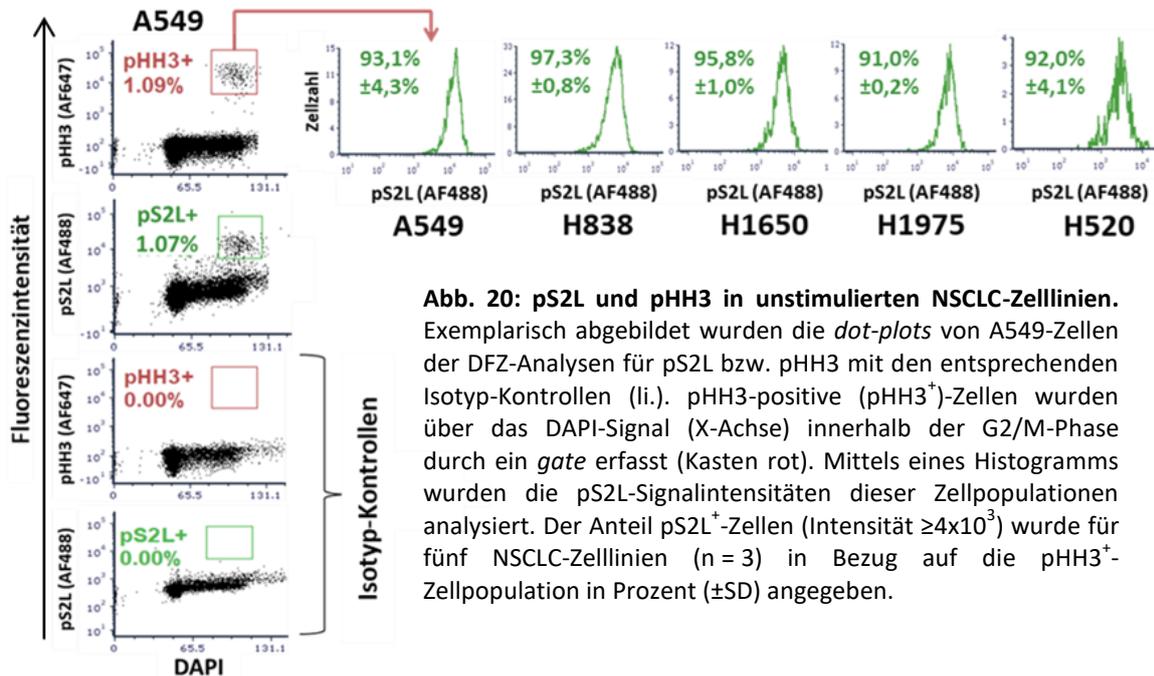


Abb. 20: pS2L und pHH3 in unstimulierten NSCLC-Zelllinien. Exemplarisch abgebildet wurden die *dot-plots* von A549-Zellen der DFZ-Analysen für pS2L bzw. pHH3 mit den entsprechenden Isotyp-Kontrollen (li.). pHH3-positive (pHH3⁺)-Zellen wurden über das DAPI-Signal (X-Achse) innerhalb der G2/M-Phase durch ein *gate* erfasst (Kasten rot). Mittels eines Histogramms wurden die pS2L-Signalintensitäten dieser Zellpopulationen analysiert. Der Anteil pS2L⁺-Zellen (Intensität $\geq 4 \times 10^3$) wurde für fünf NSCLC-Zelllinien (n = 3) in Bezug auf die pHH3⁺-Zellpopulation in Prozent (\pm SD) angegeben.

Simultane Färbungen der DFZ-Analysen wurden zur Prüfung einer pHH3/pS2L-Doppelpositivität genutzt. Dafür wurden pHH3⁺-Zellen durch ein *gate* erfasst und mittels eines Histogramms pS2L-Fluoreszenzintensität analysiert. pHH3⁺-Populationen zeigten alle eine positive Verschiebung nach rechts mit Signalintensitäten für die SMAD2 Linker-Phosphorylierung $\geq 4 \times 10^3$ (pS2L⁺) (Abb. 20, re.). Die Analysen verdeutlichten eine Doppelpositivität von Histon H3- und SMAD2 Linker-Phosphorylierungen während der Mitose in unstimulierten Zellen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden die Einflüsse der CDK-Inhibitoren und PIRF auf pS2L⁺- und pHH3⁺-Zellen innerhalb der G2/M-Phase näher untersucht.

SMAD2 Linker-Phosphorylierungen korrelieren mit phospho-Histon H3 auch unter Stimulationsbedingungen

Stimulationen mit dem CDK1-Inhibitor und der daraus resultierende G2/M-Arrest führten zu signifikant gesteigerten Zellzahlen von pHH3⁺- und pS2L⁺-Populationen. Dies stellte sich bei einer Behandlung der Zellen mit dem CDK2- und CDK4/6-Inhibitor gegensätzlich dar. Stimulationen verhinderten sowohl Phosphorylierungen an den Serinresten der SMAD2 Linker-Domäne als auch am Histon H3. Infolgedessen kam es bei beiden Zellpopulationen zu signifikanten Rückgängen in der G2/M-Phase. Behandlungen mit PIRF zeigten leichte Abnahmen beider Phosphorylierungsereignisse im Vergleich zu PBS. Diese waren jedoch nicht signifikant (Abb. 21, A+B).

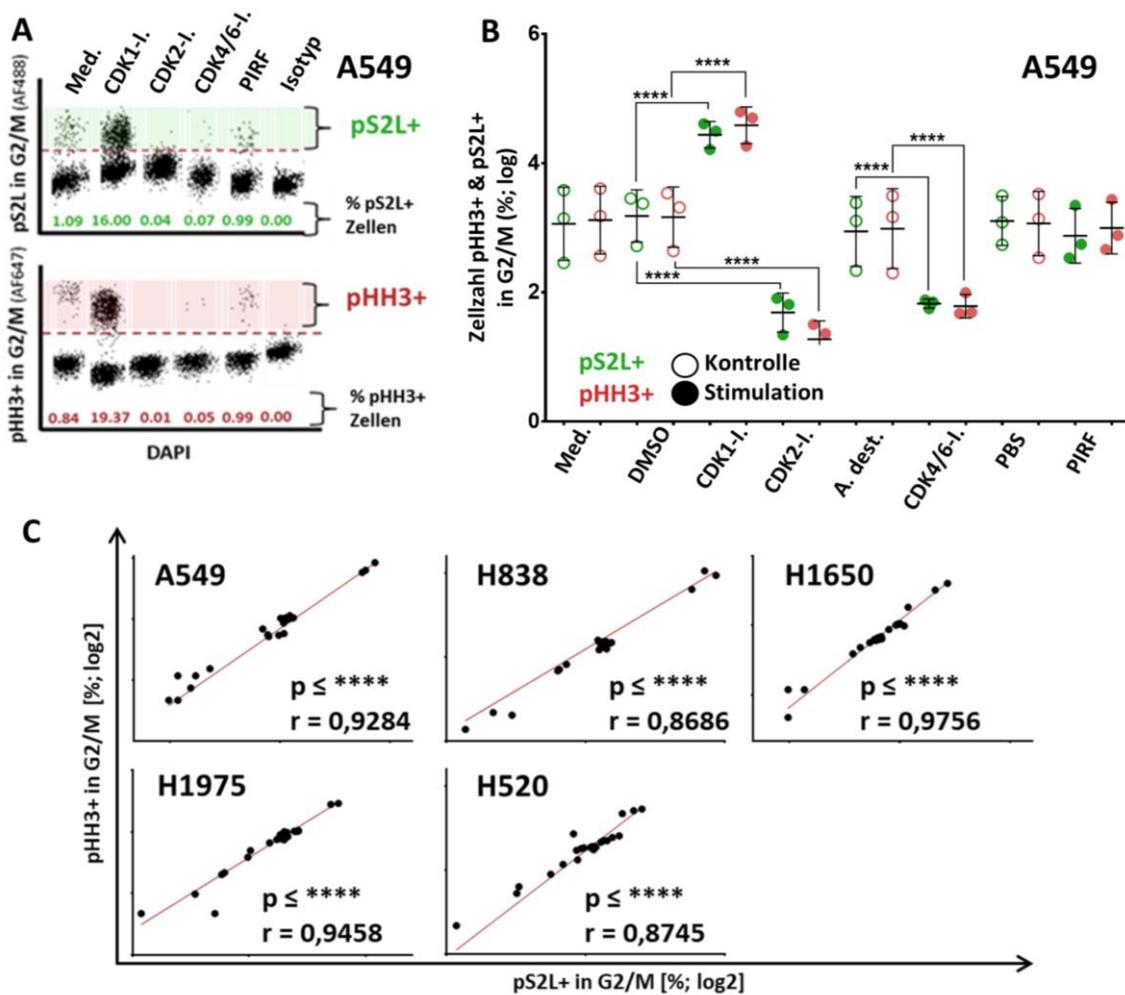


Abb. 21: Korrelation von pS2L⁺- und pHH3⁺-Zellpopulationen stimulierter NSCLC-Zellen. (A) Exemplarisch abgebildet wurden die prozentualen Anteile pS2L⁺ (grün)- und pHH3⁺ (rot)-Zellpopulationen in der G2/M-Phase nach Stimulationen mit CDK1-, -2, und 4/6-Inhibitoren bzw. PIRF für A549-Zellen. (B) Die Zellzahlen von pS2L⁺ und pHH3⁺ wurden mittels RM *one-way* ANOVA und Sidak's *post-hoc* Test ($p \leq 0,05$) von den Stimulationen zu den jeweiligen Kontrollen verglichen ($n = 3$). (C) Die prozentualen Anteile von pS2L⁺- und pHH3⁺-Zellen der Stimulationen und Kontrollen ($n = 24$) wurden einer Spearman Korrelation ($p \leq 0,01$; zweiseitig) unterzogen. Hinweise: pS2L⁺ = Zellpopulation mit pS2L-Intensitäten $\geq 4 \times 10^3$; pHH3⁺ = Positive Zellpopulation für den Mitose-Marker phospho-Histon H3.

Um festzustellen, ob sich diese Beobachtungen insgesamt in allen fünf stimulierten Zelllinien darstellten, wurden die prozentualen pS2L⁺- und pHH3⁺-Anteile einer Spearman Korrelation unterzogen. Die Korrelationskoeffizienten wiesen einen starken und positiven Zusammenhang beider Populationen auf und waren für alle Zelllinien signifikant. Der gemittelte Wert aller Zelllinien betrug $r = 0,9186 \pm 0,0413$ (Abb. 21, C).

Zusammenfassend zeigten die zellzyklusabhängigen DFZ-Analysen, dass sowohl SMAD2 als auch die Phospho-Isoformen mit der Proliferation assoziiert sind und Veränderungen der Niveaus während dieser erfahren. Davon waren insbesondere SMAD2 Linker-

Phosphorylierungen betroffen, für die sich eine Subpopulation mit vielfach höheren Signalintensitäten innerhalb der G2/M-Phase zeigte (pS2L⁺). Inhibierungen Zellzyklus-relevanter Kinasen beeinflussten überdies die Anzahl pS2L⁺-Zellen in den G2/M-Phasen. Darüber hinaus zeigten alle unstimulierten Zelllinien eine hohe pS2L⁺/pHH3⁺-Doppelpositivität von $\geq 91\%$. Des Weiteren korrelierten pS2L⁺/pHH3⁺-Populationen ebenfalls in stimulierten NSCLC-Zellen. Dabei war es unerheblich, ob Stimulationen pS2L⁺ bzw. pHH3⁺ in der G2/M-Phase negativ oder positiv beeinflussten. Diese Beobachtungen legten nahe, dass CDK1 oder nachgeschaltete Kinasen nicht bei einer Phosphorylierung der Linker-Domäne involviert sind. Den Ergebnissen zur Folge schienen demnach CDK2 und CDK4/6 bzw. deren Zielproteine an der Linker- als auch Histon H3 Phosphorylierung beteiligt zu sein.

3.5 Substitution des SMAD2-Linker Serin-Triplets in A549-Zellen (A549L^{sub})

Durch die bisherigen Analysen konnte ein erster Überblick über die SMAD2-Spleißvarianten und deren Phospho-Isoformen im NSCLC-Kontext gewonnen werden. Darüber hinaus stellte sich ein negativer Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben dar, wenn eine hohe Anzahl pS2L-positiver Zellen in NSCLC-Gewebe vorlag. Des Weiteren waren durch zellzyklusabhängige Analysen höhere pS2L-Niveaus in den Mitose-Phasen nachweisbar. Die Etablierung einer Modell-Zelllinie mit einer SMAD2-Linker Substitution stellte daher eine zentrale Zielsetzung dieser Arbeit dar, um pS2L-abhängige Einflüsse auf funktionelle zelluläre Prozesse wie bspw. Proliferation, Invasion und TGF β -Signalprozessierungen zu untersuchen. Dieses Vorhaben wurde in einer DZL-Kooperation mit den Forschungsgruppen „Molekulare Kanzerogenese“ von Herrn Prof. Georgios Stathopoulos (CPC, Helmholtz-Zentrum München) und „Angeborene Immunität“ am Forschungszentrums Borstel unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Holger Heine und insbesondere in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Tim Vierbuchen realisiert. Da A549-Zellen durch eine *KRAS*-Mutation mit dem MAPK-Signalweg verknüpft sind und Kinasen dieser Signalkaskade wiederum zur Ausführung von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen befähigt sind (9), wurde diese Zelllinie für eine Substitution ausgewählt. Darüber hinaus zeigten A549-Zellen ein gutes Ansprechen bei Stimulationen mit CDK-Inhibitoren bspw. in Form von Zu- oder Abnahmen von pS2L⁺-Zellpopulationen innerhalb der G2/M-Phase.

3.5.1 Verifizierung erfolgreicher SMAD2 Linker-Substitutionen in A549-Zellen

Einen wesentlichen Schritt innerhalb dieses Prozesses stellte die Verifizierung erfolgreicher Substitutionen dar. Erste *Screening*-Analysen der Einzelzell-Kolonien zur Ermittlung putativ erfolgreicher HDR-Ereignisse wurden durch eine eingefügte stille Mutation ermöglicht. Diese erzeugte eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Heall*. Dadurch konnten zwei potenzielle Zellklone (N1 #17; N1 #19) ermittelt werden, die auf eine erfolgreiche HDR vermuten ließen. Beide zeigten eine unverdaute Restbande sowie die beiden erwarteten kürzeren PCR-Fragmente (Abb. 22, A). Zur Bestätigung der PCR-Ergebnisse wurden Sanger-Sequenzierungen durchgeführt. Eine erfolgreiche Substitution konnte nur für den Zellklon N1 #17 bestätigt werden, der weiterführend mit A549L^{sub} bezeichnet wurde (Abb. 22, B).

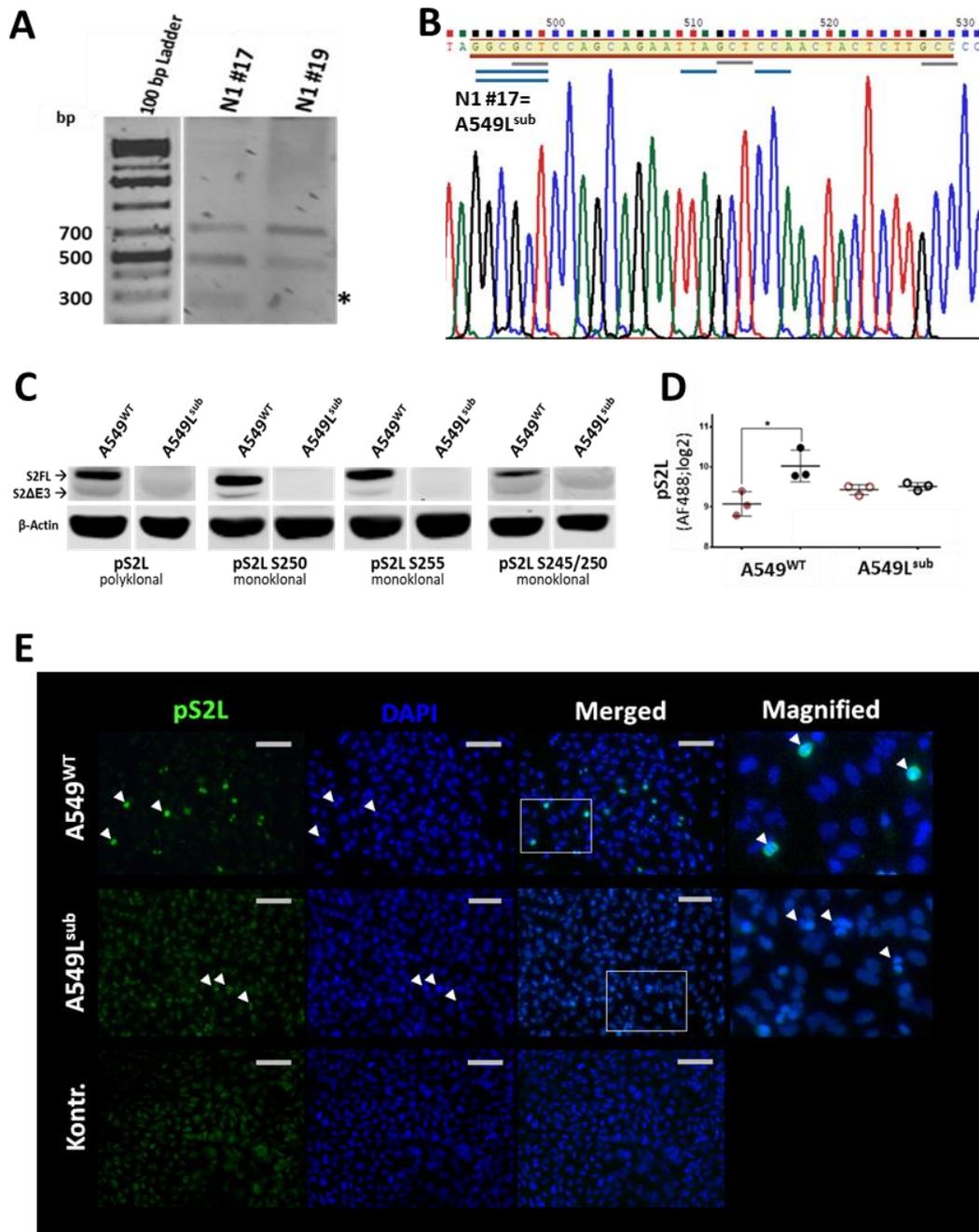


Abb. 22: Verifizierung erfolgreicher SMAD2-Linker Substitutionen in A549-Zellen. (A) Abgebildet wurden zwei potenzielle Zellklone nach einem *HaeIII*-Verdau des Kolonie-PCR Fragments und anschließender Trennung im Agarosegel (1 %) ($n = 1$). Beide Zellklone wiesen die erwarteten Banden von 467 bp und 256 bp auf. Darüber hinaus war eine unverdaute Restbande (723 bp) ersichtlich. Die Höhe schlecht sichtbarer Banden wurde mit einem „*“ markiert. **(B)** Zum Nachweis einer Insertion des *repair templates* wurden beide Zellklone (A) einer Sanger-Sequenzierung unterzogen ($n = 1$). Nur im Zellklon N1 #17 wurde der erfolgreiche Austausch bestätigt (gelb hinterlegt). Der Zellklon wurde mit A549L^{sub} bezeichnet (grau unterstrichen = Alanin-Triplett (vorherige Serine)); blau unterstrichen = stille Mutationen; blau doppelt unterstrichen = stille Mutation und neue *HaeIII*-Schnittstelle). **(C)** Western Blot-Analysen ($n = 3$) von A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen. Für die Phospho-SMAD2-Linker Detektion wurden der polyklonale pS2L- und drei monoklonale Primärantikörper verwendet. Als Ladekontrolle wurde β -Actin mitgeführt. **(D)** DFZ-Analysen von pS2L (AF488) in A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen ($n = 3$). Die gemittelten Intensitätswerte (\pm SD) spezifischer Färbungen (schwarz) wurden zu den jeweiligen Isotyp-Kontrollen (rot) mittels RM *one-way* ANOVA und Sidak's *post-hoc* Test ($p \leq 0,05$) verglichen. **(E)** IFM-Analysen von pS2L in A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen (weiße Dreiecke= Mitosen) ($n = 1$). Abgebildet wurde ebenfalls die korrespondierende A549^{WT} 2°AK-Kontrolle (Kontr.); Maßstabsbalken = 100 μ m.

Zum Nachweis fehlender SMAD2 Linker-Phosphorylierungen auf Proteinebene wurden A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen unter Medium-Bedingungen kultiviert und mittels Western Blot-, IFM-, und DFZ-Analysen untersucht. Im Laufe der vorliegenden Arbeit waren weitere monoklonale Antikörper gegen zwei einzelne Phosphorylierungsstellen (pS2L S250; pS2L S255) und eine duale Phosphorylierung (pS2L S245/250) der SMAD2 Linker-Domäne kommerziell verfügbar. Die monoklonalen Primärantikörper wurden zeitgleich genutzt, um die Spezifität der zuvor erhobenen Western Blot-Daten unter Verwendung des polyklonalen pS2L-Antikörpers zu verifizieren. Alle verwendeten Antikörper zeigten einheitliche Ergebnisse und stark reduzierte Linker-Phosphorylierungen in A549L^{sub}-Zellen (Abb. 22, C). Ergänzend dazu wurden ebenfalls DFZ-Analysen durchgeführt. Die extrahierten Gesamtsignale aus den pS2L- und Isotyp-Histogrammen von A549^{WT} und A549L^{sub} wurden miteinander verglichen. Während das Ergebnis für A549^{WT} im Vergleich zum Isotyp signifikant erhöht war ergab sich kein Unterschied bei A549L^{sub}-Zellen. Des Weiteren lagen beide Messwerte etwas höher vor als in A549^{WT}. Dies könnte auf unspezifische Bindungen schließen lassen (Abb. 22, D). Eine IFM-Analyse beider Zelltypen zeigte ebenfalls einen erwarteten Unterschied der pS2L-Intensitäten. Dieser wurde insbesondere bei mitotischen Zellen ersichtlich. Wie bei den DFZ-Analysen waren ebenfalls, wenn auch deutlich schwächer, pS2L-Signale in A549L^{sub} detektierbar (Abb. 22, E).

Zusammenfassend konnte von einer erfolgreichen Substitution ausgegangen werden. Die durchgeführten Analysen auf Molekularebene lieferten klare Ergebnisse für den Zellklon N1 #17 (= A549L^{sub}). Dies war ebenfalls auf Proteinebene der Fall, wenn diese zuvor denaturiert wurden (Western Blot-Analysen). Erwartete Unterschiede zwischen A549^{WT} und A549L^{sub} waren auch mittels DFZ und IFM detektierbar. Es traten jedoch deutlich schwächere unspezifische Bindungen in Erscheinung. Diese standen möglicherweise mit der Prozessierung in Zusammenhang, da beide Methoden keine Proteindenaturierungen vorsahen. Die etablierten A549L^{sub}-Zellen wurden daher für weitere Analysen expandiert.

3.6 SMAD2 und Phospho-Isoformen in A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen

Um mögliche Veränderungen aufgrund einer fehlenden SMAD2 Linker-Phosphorylierung näher zu untersuchen, wurden beide Zelllinien mit CDK-Inhibitoren und PIRF stimuliert.

Für eine basale Analyse wurden ebenfalls unstimulierte Zellen mitgeführt. Die Untersuchungen erfolgten mittels Western Blots, um ebenfalls mögliche Auswirkungen auf SMAD2-Spleißvarianten zu berücksichtigen.

Fehlende Linker-Phosphorylierungen führen zu erhöhten $S2^{\Delta E3}$ -Niveaus

Die statistische Auswertung zeigte nach einer Addition der Intensitätswerte beider Spleißvarianten ein signifikant höheres SMAD2-Gesamtproteinniveau in $A549L^{sub}$ -Zellen. Im Vergleich zu $A549^{WT}$ -Zellen nahm die Gesamtproteinabundanz um 48,2 % ($\pm 19,5$ %) zu (Abb. 23, B).

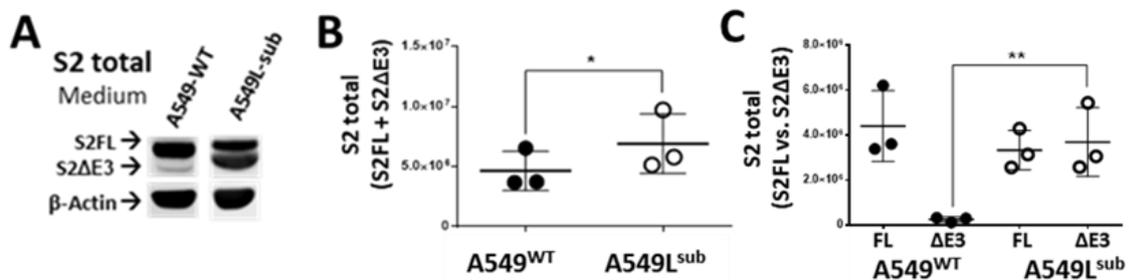


Abb. 23: Abundanzen des SMAD2-Gesamtproteins und -Spleißvarianten in $A549^{WT}$ - und $A549L^{sub}$ -Zellen. (A) Exemplarische Abbildung der S2 total Western Blot-Analysen ($n = 3$) von $A549^{WT}$ und $A549L^{sub}$. β -Actin wurde als Ladekontrolle mitgeführt. (B) Abgebildet wurden die addierten und gemittelten $S2^{FL}$ - und $S2^{\Delta E3}$ -Intensitätswerte ($\pm SD$) von $A549^{WT}$ und $A549L^{sub}$ ($n = 3$). Eine Signifikanzprüfung erfolgte durch einen gepaarten T-Test ($p \leq 0,01$). (C) Dargestellt wurden die mittleren Intensitätswerte der $S2^{FL}$ - und $S2^{\Delta E3}$ -Spleißvarianten ($n = 3$). Die statistische Analyse erfolgte mittels RM one-way ANOVA und Sidak's post-hoc Test ($p \leq 0,01$).

Bei einer Betrachtung beider Spleißvarianten zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied von $A549^{WT}$ zu $A549L^{sub}$ bei der kürzeren SMAD2-Spleißvariante, wobei diese in $A549L^{sub}$ -Zellen höher vorlag (Abb. 23, A). In Relation zum jeweiligen Gesamtprotein lagen in $A549^{WT}$ Anteile von 94,6 % (± 2 %) für $S2^{FL}$ und 5,4 % (± 2 %) für $S2^{\Delta E3}$ vor. Im Gegensatz dazu ergaben sich für $A549L^{sub}$ Anteile von 48,2% ($\pm 2,9$ %) für $S2^{FL}$ und 51,8 % ($\pm 2,9$ %) für $S2^{\Delta E3}$. Im Vergleich zu $A549^{WT}$ -Zellen halbierte sich das $S2^{FL}$ -Niveau, während die $S2^{\Delta E3}$ -Abundanz 10-fach erhöht war, wenn SMAD2 Linker-Phosphorylierungen unterbunden wurden (Abb. 23, C).

pS2C wird durch eine fehlende Linker-Phosphorylierung nicht beeinflusst

Die Analysen ergaben ein signifikant vermindertes pS2L-Niveau in $A549L^{sub}$ im Vergleich zu $A549^{WT}$ (Abb. 24, A), während C-terminale Phospho-Isoformen durch fehlende Linker-

Phosphorylierungen nicht beeinflusst wurden. Diese waren in A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen vergleichbar ausgeprägt (Abb. 24, B).

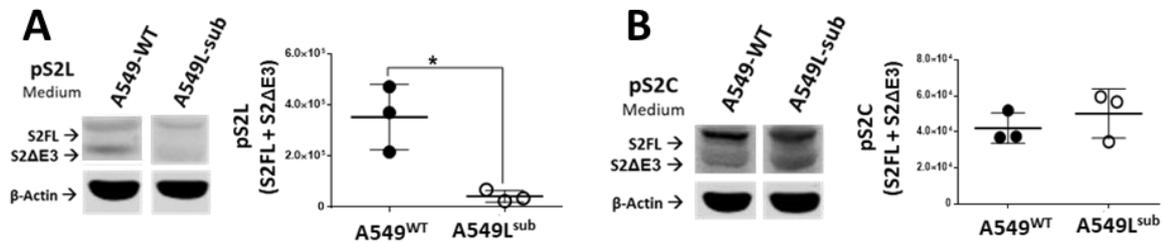


Abb. 24: Phospho-Isoform Niveaus in unstimulierten A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen. Abgebildet wurden exemplarisch die Western Blot-Analysen der Phospho-Isoformen für die Linker-Domäne (A) und das C-terminale Motiv (B) von A549^{WT} und A549L^{sub} (n = 3). Die addierten mittleren Intensitätswerte (±SD) wurden statistisch mittels eines gepaarten T-Tests (p ≤ 0,05) verglichen.

Die höhere S2^{ΔE3}-Abundanz in A549L^{sub} wirkte sich nicht auf die C-terminale Phosphorylierung der einzelnen Spleißvarianten aus. Wie bereits in den vorangegangenen Analysen verschiedener NSCLC-Zelllinien waren die Banden beider Phospho-Isoformen im Vergleich zu S2 total schwächer ausgeprägt (Abb. 24, B).

Insgesamt zeigten die Analysen, dass Zellen mit einer fehlenden SMAD2 Linker-Phosphorylierung ein vielfach höheres S2^{ΔE3}-Niveau aufwiesen. Es zeigte sich eine Zunahme des SMAD2-Gesamtproteins, wenn die Intensitätswerte der Spleißvarianten addiert wurden. Die C-terminale Phospho-Isoform war unverändert und wies zeitgleich auf einen weiterhin intakten kanonischen TGFβ-Signalweg hin. In den vorangegangenen Analysen verschiedener NSCLC-Zelllinien zeigte sich insbesondere ein Einfluss auf pS2L-Niveaus, wenn diese mit CDK-Inhibitoren stimuliert wurden. Des Weiteren waren SMAD2 Linker-Phosphorylierungen mit der Mitose assoziiert. Zudem konnte bei einer Behandlung mit PIRF ein Einfluss auf das SMAD2-Gesamtprotein nachgewiesen werden. Ob sich dies gleichermaßen in A549L^{sub}-Zellen darstellte, wenn keine Linker-Phosphorylierungen erfolgen konnten wurde anhand weiterer Western Blot-Analysen untersucht. Zeitgleich dienten diese als Validierung der DFZ-Daten.

CDK-Inhibitoren und PIRF beeinflussen Spleißvarianten in A549^{WT}, aber nicht in A549L^{sub}

Die Western Blot-Analysen zeigten überraschenderweise ein konstant erhöhtes Niveau der S2^{ΔE3}-Spleißvariante in A549L^{sub}-Zellen, unabhängig von Stimulationen. Bei A549^{WT} kam es

zu einer Zunahme von $S2^{\Delta E3}$, wenn diese mit dem CDK4/6-Inhibitor behandelt wurden. Hingegen führten PIRF-Stimulationen zu stark reduzierten $S2^{\Delta E3}$ -Banden (Abb. 24, A).

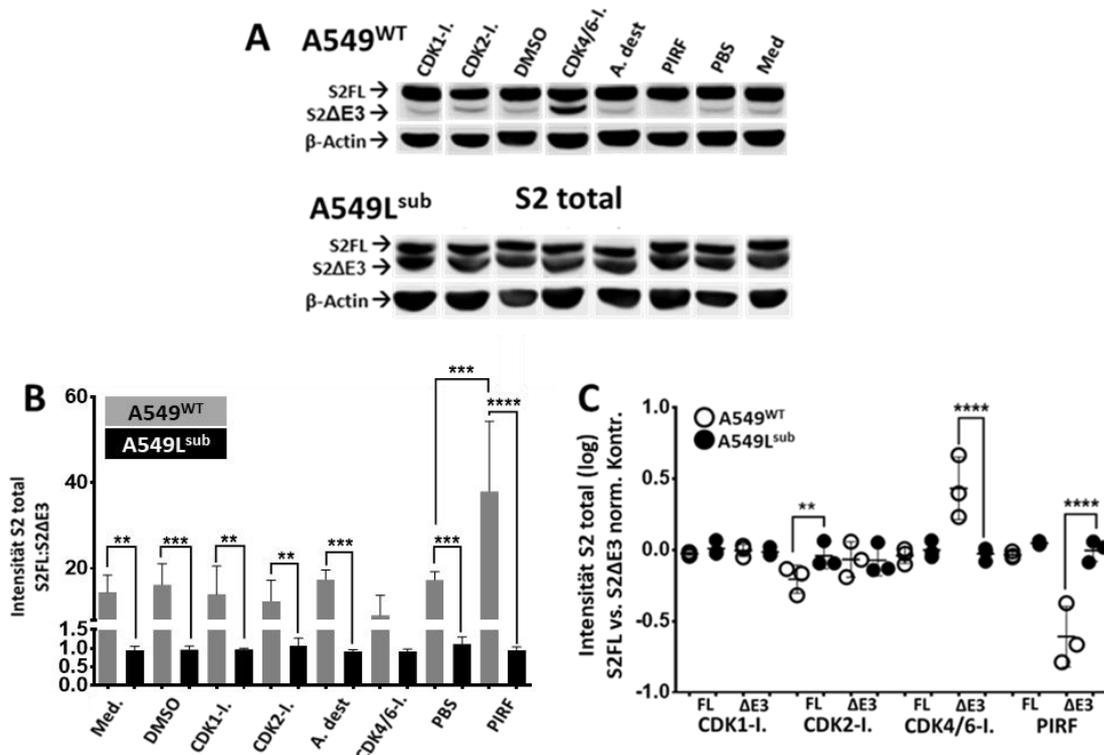


Abb. 25: SMAD2-Spleißvarianten in stimulierten A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen. Exemplarisch abgebildet wurden die Western Blot-Analysen von A549^{WT} und A549L^{sub} (n = 3) mit den entsprechenden Stimulationen und Kontrollen für S2 total. **(B)** Gemittelte Verhältniszerte (\pm SD) von S2^{FL} zu S2 ^{$\Delta E3$} sitmulierter A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen (n = 3). Die statistischen Prüfungen erfolgten paarweise mittels eines *multiple* T-Test und Sidak-Holm Korrektur ($\alpha = 0,05$) bzw. mittels RM *one-way* ANOVA und Sidak's *post-hoc* Test ($p \leq 0,05$) zwischen den Stimulationen und Kontrollen. **(C)** Dargestellt wurden die gemittelten, zu den Kontrollen normalisierten S2 total Intensitätswerte (\pm SD; log) der Western Blot-Analysen für S2^{FL} und S2 ^{$\Delta E3$} in A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen (n = 3). Statistische Prüfungen der jeweiligen Stimulationen erfolgten paarweise mittels *one-way* ANOVA und Sidaks *post-hoc* Test ($p \leq 0,05$).

Statistisch bestätigten sich signifikante Unterschiede zwischen A549^{WT} und A549L^{sub} bei den jeweiligen Verhältniszerten von S2^{FL} zu S2 ^{$\Delta E3$} . Bei allen Bedingungen lag dieser in A549^{WT}-Zellen im Vergleich zu A549L^{sub} signifikant höher vor, außer wenn A549^{WT}-Zellen mit dem CDK4/6-Inhibitor stimuliert wurden. Eine Behandlung führte in A549^{WT}-Zellen zu einer S2 ^{$\Delta E3$} -Zunahme. Infolgedessen kam es zu einem geringeren Verhältniszert, der nicht länger unterschiedlich zu A549L^{sub}-Zellen war. Bei einem Vergleich der Stimulationen zu den korrespondierenden Kontrollen innerhalb einer Zelllinie ergab sich ein signifikanter Unterschied in A549^{WT}, wenn die Zellen mit PIRF stimuliert wurden. Der erhöhte Verhältniszert war auf einen Rückgang der S2 ^{$\Delta E3$} -Spleißvariante zurückzuführen. Für A549L^{sub}-Zellen wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt, unabhängig von

Stimulationen (Abb. 24, A + B). Bei einem direkten Vergleich der Stimulationseinflüsse auf die jeweiligen SMAD2-Spleißvarianten stellte sich in A549^{WT} ein leichter, aber signifikanter Rückgang von S2^{FL} nach einer Stimulation mit dem CDK2-Inhibitor dar. Diese hatte jedoch keinen Einfluss auf S2^{ΔE3}. Im Gegensatz dazu war eine Abnahme von S2^{ΔE3} nach Behandlungen mit PIRF nachweisbar. Hingegen führte eine Stimulation mit dem CDK4/6-Inhibitor zu signifikanten S2^{ΔE3}-Zunahmen. S2^{FL} war weder nach CDK4/6-Inhibitor- noch PIRF-Stimulationen von Veränderungen betroffen (Abb. 24, C).

CDK-Inhibitoren beeinflussen pS2L-Niveaus in A549^{WT}

Ein direkter Vergleich von pS2L war aufgrund fehlender Linker-Phosphorylierungen in A549L^{sub}-Zellen nicht möglich. Da insgesamt sehr schwache S2^{ΔE3}-Banden vorlagen, wurden die Intensitätswerte zu einem Gesamtsignal addiert (Abb. 26, A + B).

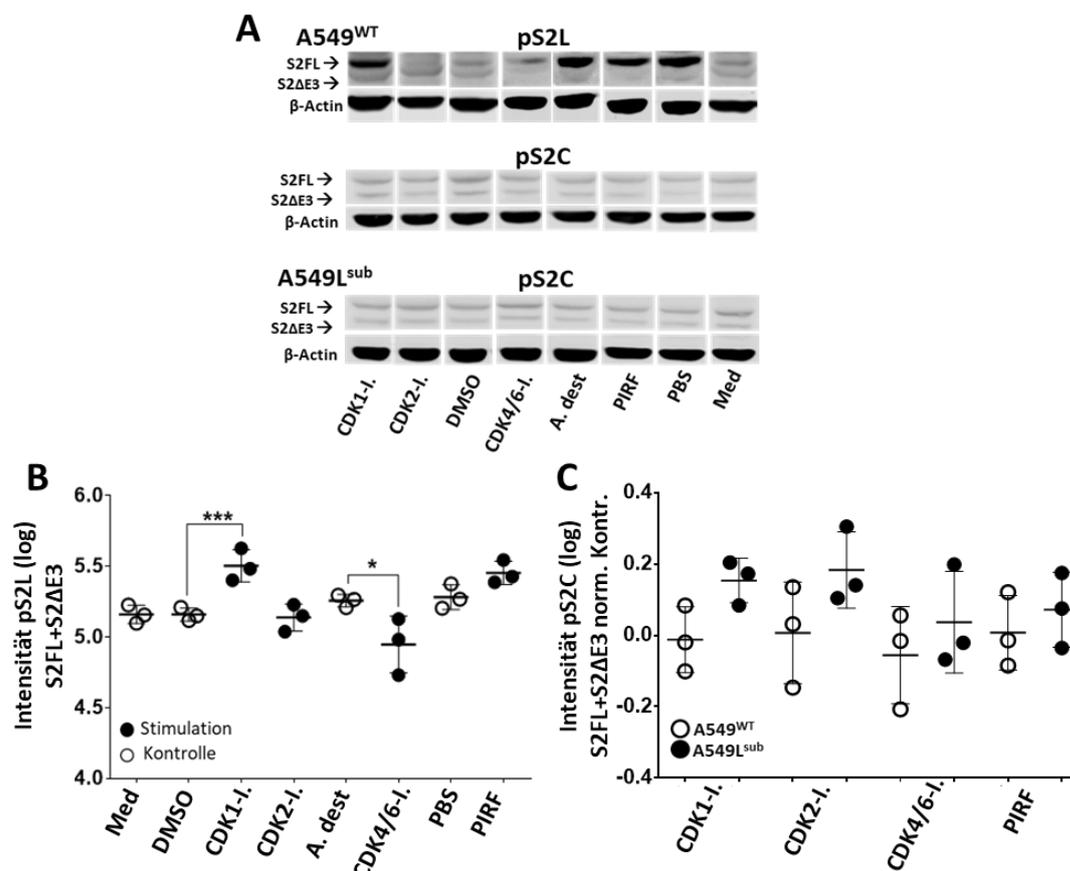


Abb. 26: SMAD2 Phospho-Isoformen in stimulierten A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen. (A) Exemplarisch abgebildet wurden die Western Blot-Analysen stimulierter A549^{WT} (pS2L) und A549L^{sub} (pS2L & pS2C) mit den Kontrollen (n = 3). Als Ladekontrolle fungierte β-Actin. **(B)** Addierte und gemittelte pS2L-Intensitätswerte (±SD; log) der Western Blots in A549^{WT}-Zellen (n = 3). Statistische Vergleiche erfolgten paarweise mittels *one-way* ANOVA und Sidak's *post-hoc* Test (p ≤ 0,05) zu den entsprechenden Kontrollen. **(C)** Auswertung der gemittelten normalisierten pS2C Intensitätswerte (±SD) der Western Blot-Analysen in A549^{WT} und A549L^{sub} (n = 3). Statistische Prüfungen erfolgten paarweise mittels *one-way* ANOVA und Sidak's *post-hoc* Test (p ≤ 0,05).

Es zeigten sich signifikante Zunahmen von pS2L nach Stimulationen mit dem CDK1-Inhibitor. Bei Stimulationen mit dem CDK4/6-Inhibitor stellten sich im Vergleich zu den Kontrollen hingegen signifikante Abnahmen von pS2L-Signalintensitäten dar. Behandlungen mit dem CDK2-Inhibitor zeigten einen tendenziellen Rückgang- und Behandlungen mit PIRF tendenzielle Zunahmen von pS2L. Beide Ergebnisse blieben jedoch nicht signifikant (Abb. 26, B).

pS2C bleibt nach Stimulationen in A549^{WT} und A549L^{sub} unverändert

Insgesamt waren beide SMAD2-Spleißvarianten auch unter Stimulationsbedingungen unabhängig von einer Linker-Phosphorylierung in A549^{WT} und A549L^{sub} vergleichbar ausgeprägt (Abb. 26, A). Signifikante Beobachtungen zwischen den Zelltypen blieben für die C-terminale Phosphorylierung bei allen Stimulationen aus (Abb. 26, C).

Zusammenfassend ergaben die Western Blot-Analysen vergleichbare Ergebnisse zu den DFZ-Analysen stimulierter A549^{WT}-Zellen. Ergänzend wurde bei dem Nachweis des SMAD2-Gesamtproteins festgestellt, dass S2^{ΔE3} bei einer Behandlung mit PIRF im Gegensatz zur PBS-Kontrolle stark reduziert war. S2^{FL} war hingegen nicht von Veränderungen betroffen. Im Kontrast dazu nahm das S2^{ΔE3}-Niveau nach einer Stimulation mit dem CDK4/6-Inhibitor zu. Auch hier ergaben sich keine Veränderungen bei S2^{FL} im Vergleich zur Kontrolle. Dies stellte sich bei Stimulationen mit dem CDK2-Inhibitor anders dar. Hier kam es zu einer geringen, aber signifikanten S2^{FL}-Abnahme in A549^{WT}-Zellen. Für die S2^{ΔE3}-Spleißvariante waren hingegen keine Veränderungen ersichtlich. Bei den SMAD2 Linker-Phosphorylierungen traten durch Stimulationen mit dem CDK1- bzw. CDK4/6-Inhibitor konträre Ergebnisse auf. Wenn A549^{WT}-Zellen mit dem CDK1-Inhibitor stimuliert wurden, kam es zu einer Zunahme von pS2L, während sich bei Stimulationen mit dem CDK4/6-Inhibitor reduzierte Niveaus darstellten. Bei Stimulationen mit dem CDK2-Inhibitor und PIRF kam es zu keinen signifikanten Veränderungen von pS2L-Signalintensitäten. Dies zeigte sich ebenfalls bei den C-terminalen Phosphorylierungen, hier blieben die Niveaus bei allen Stimulationen vergleichbar bestehen.

Überraschenderweise zeigte sich bei A549L^{sub}-Zellen ein manifestiert höheres S2^{ΔE3}-Niveau im Vergleich zu A549^{WT}. Die Verhältnisse beider Spleißvarianten setzten sich in

A549L^{sub}-Zellen annähernd unverändert mit 1:1 zusammen, unhanhängig von Stimulationen. Für C-terminale Phosphorylierungen ergaben sich trotz einer höheren S2^{ΔE3}-Abundanz keine Unterschiede bei den Stimulationen bzw. zu A549^{WT}. Aus den Analysen wurde deutlich, dass sich durch Stimulationen mit dem CDK4/6-Inhibitor in A549^{WT}-Zellen ähnliche Verhältnisse der SMAD2-Spleißvarianten zu A549L^{sub}-Zellen abbildeten. Darüber hinaus ließ sich daraus ableiten, dass Beeinflussungen von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen nicht alleine ausschlaggebend für erhöhte S2^{ΔE3}-Niveaus sein konnten. Diese traten bspw. in den DFZ-Analysen sowohl bei Stimulationen mit dem CDK2- als auch CDK4/6-Inhibitor in A549^{WT}-Zellen auf. Die Ergebnisse legten nahe, dass spezifische Zielstrukturen durch PIRF bzw. CDK4/6 aktiviert oder inhibiert wurden und sich dadurch entsprechend höhere oder geringere S2^{ΔE3}-Niveaus ergaben. Als Nächstes wurde daher untersucht, ob sich insbesondere die unterschiedlichen S2^{ΔE3}-Niveaus in A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen ebenfalls auf mRNA-Ebene abbildeten. Ergänzend wurde *in silico* analysiert, ob SMAD2-Transkriptexpressionen der langen bzw. kurzen SMAD2-Spleißvariante einen unterschiedlichen Einfluss auf das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben haben.

Hohe S2^{ΔE3}-Expressionen haben einen negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben in ADCs

Aufgrund stark unterschiedlicher Proteinniveaus der kurzen SMAD2-Spleißvariante in A549L^{sub}- im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen wurde untersucht, ob die spezifischen Transkriptexpressionen einen unterschiedlichen Einfluss auf das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben in NSCLC-Patienten haben. Zu diesem Zweck wurde die GEPIA2-Datenbank verwendet (Abb. 27).

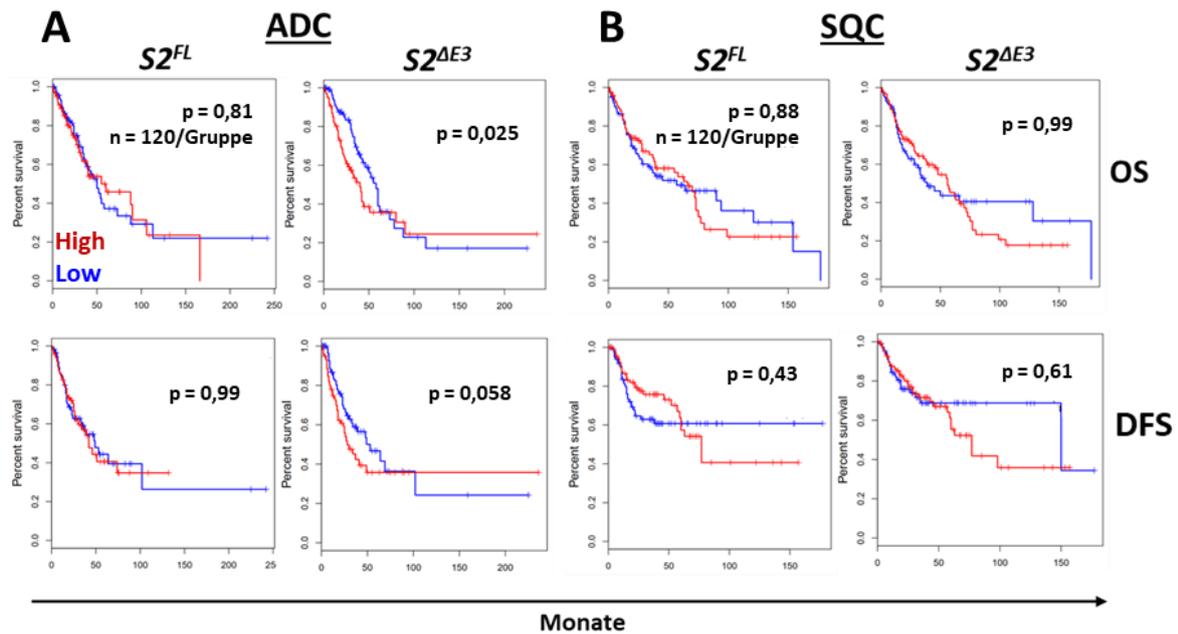


Abb. 27: Einfluss von $S2^{FL}$ - und $S2^{\Delta E3}$ -Expressionen auf das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben von NSCLC-Patienten. Unter Verwendung der GEPIA2-Datenbank wurden die Einflüsse von $S2^{FL}$ und $S2^{\Delta E3}$ -Expressionen auf das Gesamt (OS)- und krankheitsfreie Überleben (DFS) in ADC- (A) und SQC-Patienten (B) *in silico* analysiert und mittels Kaplan-Meier Kurven abgebildet. Eine Trennung der *high*- und *low*-Gruppen erfolgte anhand des 75. Quartils. Ergebnisse der Log-Rank-Tests mit $p \leq 0,05$ wurden als signifikant bewertet und sind in den Abbildungen hinterlegt. Hinweise: $S2^{FL} = SMAD2$, *full length*'; $S2^{\Delta E3} = SMAD2$, *delta Exon 3*'.

Die Analysen ergaben einen signifikant negativen Einfluss hoher $S2^{\Delta E3}$ -Expressionen in ADCs bis etwa 60 Monate, während $S2^{FL}$ -Transkriptniveaus keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben hatten. Für das krankheitsfreie Überleben zeichnete sich die gleiche Tendenz in ADCs ab, das Ergebnis blieb aber nicht signifikant. Hingegen zeigten sich in ADCs ebenfalls keine signifikanten Einflüsse von $S2^{FL}$ -Expressionen auf das DFS (Abb. 27, A). Bei den SQCs blieben insgesamt alle Analysen nicht signifikant, die Kurvenverläufe stellten sich jedoch im Vergleich zu ADCs heterogener dar. Insbesondere beim DFS zeigten die Kurven eine deutlichere Auftrennungen zwischen 10-50 Monate, wobei geringere $S2^{FL}$ -Expressionen einen negativen Einfluss zeigten. Ähnlich heterogen stellte sich dies für das OS und DFS ab etwa 50 Monate dar, wenn hohe Transkriptexpressionen der kurzen Spleißvariante $S2^{\Delta E3}$ vorlagen (Abb. 27, B).

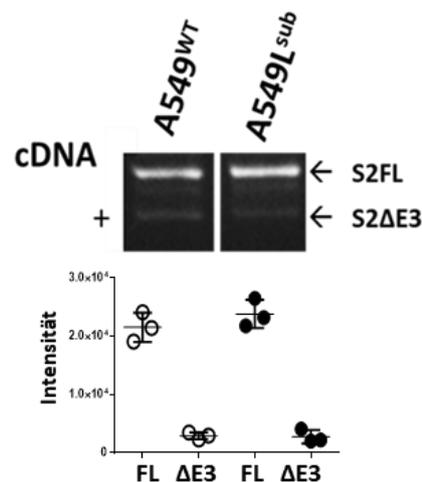
Die Analysen machten deutlich, dass es insbesondere für das Gesamtüberleben bei ADC-Patienten einen signifikanten Unterschied gibt, je nachdem welche *SMAD2*-Spleißvariante exprimiert wird. Dabei wurde ein negativer Einfluss hoher Expressionen der kurzen $S2^{\Delta E3}$ -Transkriptvariante bei ADCs festgestellt. Darüber hinaus verdeutlichte dies, dass *SMAD2*-

Spleißvarianten möglicherweise unterschiedliche Funktionen erfüllen und nicht als redundant angesehen werden können. Da die Niveaus der SMAD2-Spleißvarianten auf Proteinebene in unstimulierten A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen stark unterschiedlich vorlagen, wurde geprüft, ob sich dies gleichermaßen auf mRNA-Ebene darstellte.

SMAD2-Spleißvarianten sind posttranskriptionell reguliert

Aufgrund stark erhöhter S2^{ΔE3}-Proteinniveaus in A549L^{sub}- im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen wurden Exon 3 (E3)-überspannende Primer erstellt. Dadurch wurde eine Unterscheidung beider Transkripte anhand der Basenpaarlängen ermöglicht (Abb. 3, C). Die E3-Struktur innerhalb der MH1-Domäne weist eine Länge von 90 bp auf. Infolgedessen wurde für S2^{FL} ein Amplikon mit 362 bp und für S2^{ΔE3} ein kürzeres mit einer Länge von 272 bp erwartet (Abb. 28; oben).

Abb. 28: Transkripte von SMAD2-Spleißvarianten in A549^{WT}- vs. A549L^{sub}-Zellen. Exemplarisch wurden die Ergebnisse der RT-PCR zur Transkriptidentifizierung von S2^{FL} und S2^{ΔE3} in A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen abgebildet (n = 3) (oben). Eine statistische Analyse der gemittelten Intensitätswerte (±SD) erfolgte durch eine RM *one-way* ANOVA mit Sidak's *post-hoc* Test (p ≤ 0,05) (unten).



Die Amplikons zeigten die erwarteten Doppelbanden und entsprechenden Fragmentgrößen (bp) in beiden Zelllinien (Abb. 28, oben). Entgegen der Erwartung gab es keine Unterschiede in den Intensitätswerten der Transkripte. Trotz eines wesentlich höheren S2^{ΔE3}-Proteinniveaus in A549L^{sub}-Zellen waren die Expressionen beider Transkriptvarianten vergleichbar mit A549^{WT} (Abb. 28; unten).

Zur Verifizierung korrekter Transkripte wurden die Banden aus dem Agarosegel extrahiert und sequenziert. Die Gelextraktionen der gepoolten cDNAs auf entsprechender Bandenhöhe bestätigen nach einem Abgleich der Sequenzen korrekt amplifizierte Transkripte. Für die kurze S2^{ΔE3}-Bande lag sowohl für A549^{WT} als auch A549L^{sub} ein 10 % höherer *query coverage* (QC)-Wert vor als für S2^{FL}. Bei den längeren PCR-Fragmenten war

der QC-Wert noch deutlicher von dem des $S2^{\Delta E3}$ -Transkripts getrennt. Dies traf ebenfalls für beide Zelllinien zu (Tab. 24).

Tab. 24: Ergebnisse NCBI BLASTn der SMAD2-Transkriptidentitäten.

| Zelllinie | Bande extrahiert [bp] | QC-Wert mRNA 1+2 ($S2^{FL}$) [%] | QC-Wert mRNA 3 ($S2^{\Delta E3}$) [%] |
|----------------------|--------------------------|---------------------------------------|--|
| A549L ^{sub} | 272 | 89 | 99 |
| A549L ^{sub} | 362 | 98 | 61 |
| A549 ^{WT} | 272 | 79 | 89 |
| A549 ^{WT} | 362 | 91 | 57 |

QC = Query coverage

Die Analysen ließen auf posttranskriptionelle Regulationen von SMAD2-Spleißvarianten schließen. Trotz eines vielfach höheren $S2^{\Delta E3}$ -Proteinniveaus in A549L^{sub} ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu A549^{WT}, wenn Transkriptexpressionen verglichen wurden. Ähnlich abweichende Beobachtungen wurden bereits zuvor in Mausgeweben beschrieben (15). Als nächstes sollte geprüft werden, ob sich Unterschiede zu tumorfreien AECII und T-Zellen gesunder Spender auf Proteinebene zu A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen zeigten.

3.7 SMAD2 und Phospho-Isoformen in Primärzellen (AECII und T-Zellen)

Die bisher gewonnenen Ergebnisse entstammten ausschließlich einem malignen Zellkontext. Daher wurden Niveaus des SMAD2-Gesamtproteins und Phospho-Isoformen ebenfalls in Alveolarepithelzellen Typ II (*alveolar epithelial cells type II*; **AECII**) untersucht, die aus tumorfreien Lungengeweben gewonnen wurden. Des Weiteren wurde das Spektrum durch eine Extraktion von T-Zellen gesunder Spender erweitert. Dies diente zum einem dem Vergleich von malignen und tumorfreien Epithelzellen der Lunge. Zum anderen konnten die epithelialen Ergebnisse zu gesunden T-Zellen verglichen werden, die einem anderen Keimblatt entstammen. Wie bereits aus den mIHC-Analysen deutlich wurde, hatte eine höhere Anzahl pS2L-positiver Immunzellen einen negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten (Abb. 13). Darüber hinaus konnten die gewonnenen T-Zellen durch eine CD3/CD28-Aktivierung expandiert werden. Letzteres ermöglichte es nochmals ein besonderes Augenmerk in benignen Zellen auf SMAD2 Linker-Phosphorylierungen während der Zellteilung zu legen.

AECII zeigen im Vergleich zu A549^{WT} und A549L^{sub} geringere C-terminale S2^{FL}-Phosphorylierungen

AECII zeigten ähnliche S2^{FL}- und S2^{ΔE3}-Niveaus im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen. Beide Zelltypen unterschieden sich lediglich signifikant im Vergleich zu A549L^{sub} aufgrund geringerer S2^{ΔE3}-Niveaus (Abb. 29, A + B).

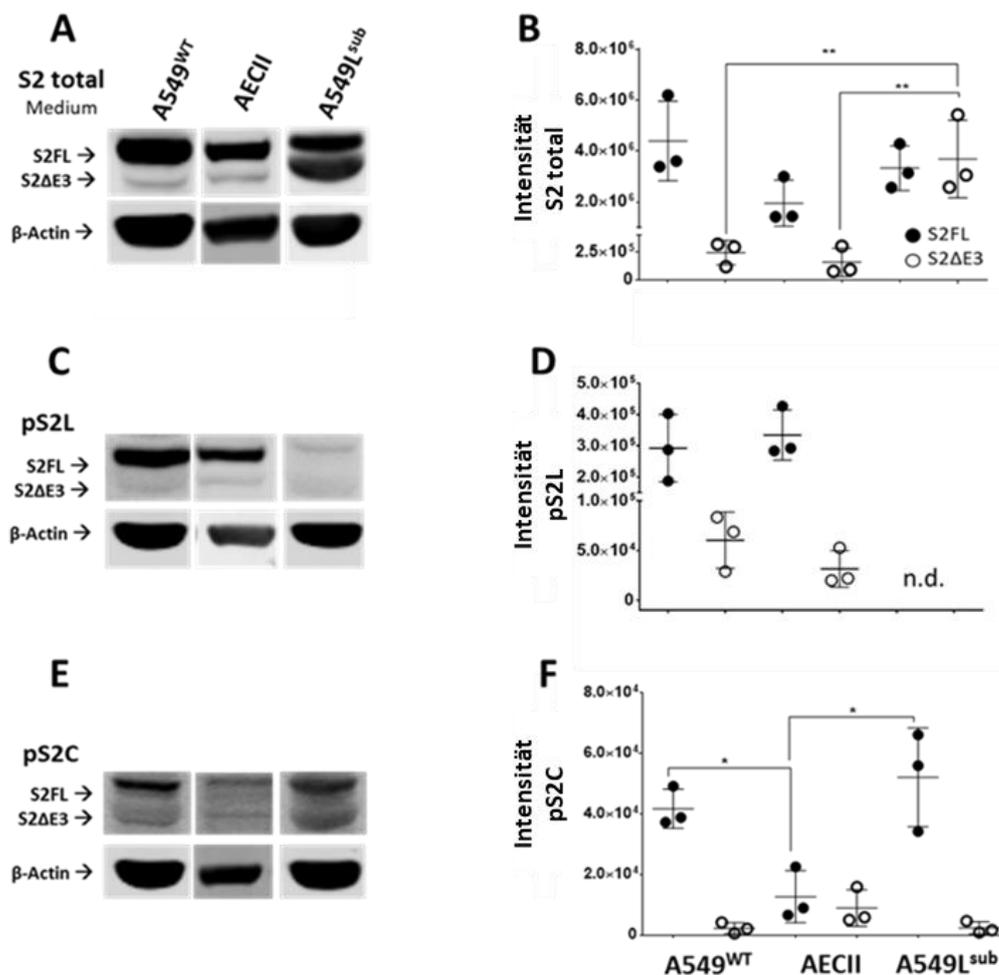


Abb. 29: SMAD2-Spleißvarianten und Phospho-Isoformen in AECII. (A, C + E) Exemplarisch abgebildet wurden die Ergebnisse der Western Blot-Analysen von AECII, A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen (n = 3) für S2 total, pS2L und pS2C. Als Ladekontrolle wurde β-Actin verwendet. (B, D + F) Die gemittelten Intensitätswerte (±SD; n = 3) der SMAD2-Spleißvarianten wurden mittels *one-way* ANOVAs und Tukey's *post-hoc* Tests (p ≤ 0,05) verglichen. Hinweise: n.d. = Nicht detektiert.

Es konnten unabhängig von den Spleißvarianten keine signifikanten Unterschiede in AECII im Vergleich zu A549^{WT} ermittelt werden (Abb. 29, C+D). Hingegen waren C-terminale Phosphorylierungen an S2^{FL} in AECII signifikant geringer ausgeprägt als in A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen. Bei S2^{ΔE3} lagen hingegen vergleichbare pS2C-Niveaus in allen Zelltypen vor (Abb. 29, E + F).

SZ^{AE3} ist in T-Zellen nicht nachweisbar

Nachdem T-Zellen aus gesunden Spendern extrahiert und expandiert wurden, erfolgten zunächst CD3/CD45 Doppelfärbungen durchgeführt, um die Reinheit der Zellpopulationen zu überprüfen. Sowohl nicht-aktivierte als auch aktivierte T-Zellen zeigten eine Doppelpositivität von $\geq 92\%$. Zudem waren deutliche Verschiebungen in den Histogrammen der spezifischen Färbungen im Vergleich zu den Kontrollen ersichtlich (Abb. 30, A).

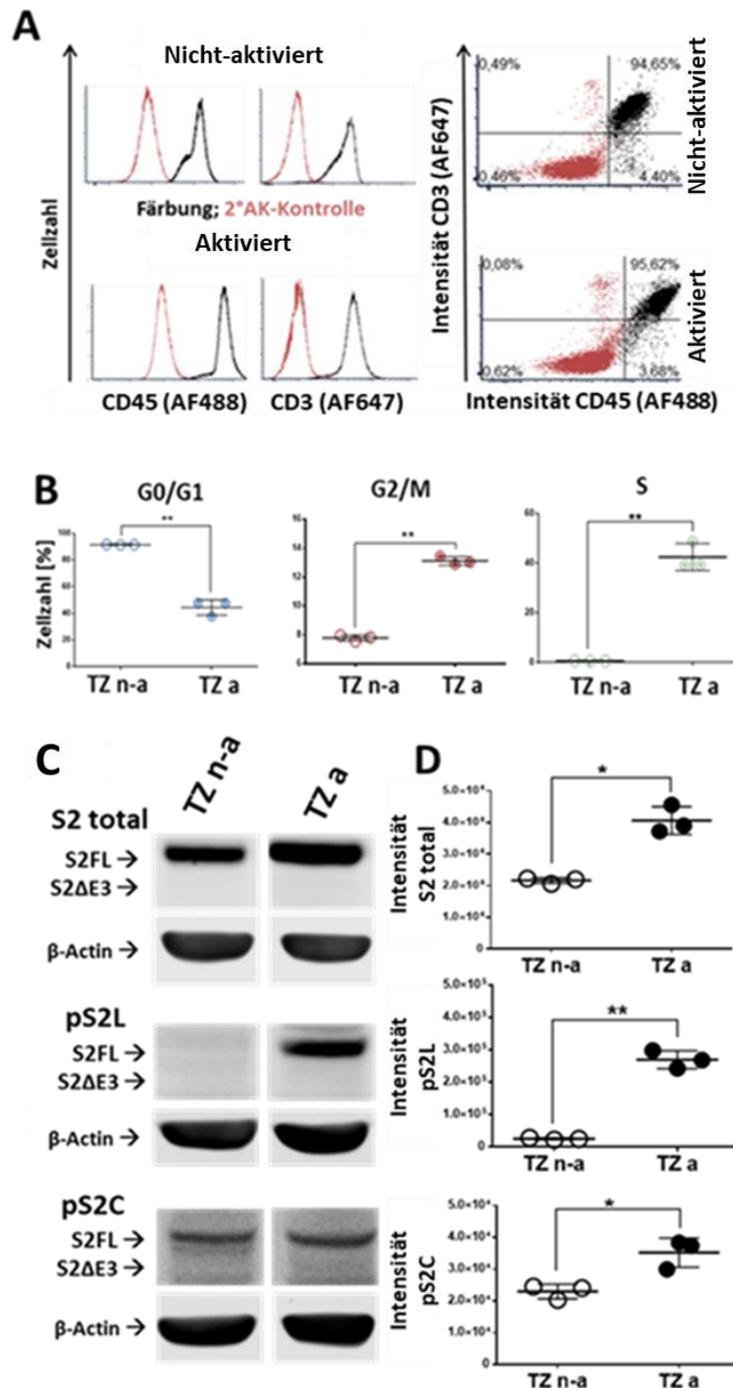


Abb. 30: Reinheit, Zellzyklusanalysen sowie SMAD2-Spleißvarianten und Phospho-Isoformen aktivierter und nicht-aktivierter T-Zellen gesunder Spender. (A) Repräsentative DFZ-Analysen der CD3 (AF647)/CD45 (AF488)-Doppelfärbungen ($n = 3$) zur Bestimmung der Reinheit extrahierter T-Zellen. **(B)** Abgebildet wurden die gemittelten prozentualen Anteile (\pm SD) aktivierter und nicht-aktivierter T-Zellen ($n = 3$) in den Zellzyklusphasen G0/G1, G2/M und S. Signifikanzprüfungen erfolgten anhand gepaarter T-Tests ($p \leq 0,01$). **(C)** Exemplarisch abgebildet wurden die Western Blot-Analysen für S2 total, pS2L und pS2C in nicht-aktivierten und aktivierten T-Zellen ($n = 3$). Als Ladekontrolle wurde β -Actin verwendet. **(D)** Statistische Auswertung der gemittelten Intensitätswerte (\pm SD) der Western Blot-Analysen (C) ($n = 3$). Signifikanzprüfungen erfolgten mittels gepaarter T-Tests ($p \leq 0,05$). Hinweise: TZ = T-Zellen; n-a = Nicht-aktiviert; a = Aktiviert.

Zum Nachweis erfolgreicher CD3/CD28-Aktivierungen wurden die prozentualen Anteile innerhalb der Zellzyklusphasen ermittelt. T-Zell-Aktivierungen führten zu signifikant reduzierten Zellzahlen in der G0/G1- und zu signifikanten Zunahmen in der G2/M- und S-Phase (Abb. 30, B). Auffällig war, dass in T-Zellen unabhängig erfolgter Aktivierungen keine S2^{ΔE3}-Niveaus nachweisbar waren. Gleiches konnte in nicht-aktivierten T-Zellen für die SMAD2 Linker-Phosphorylierung festgestellt werden (Abb. 30, C). Darüber hinaus nahmen alle drei Niveaus der analysierten SMAD2-Zielstrukturen in Folge von CD3/CD28-Aktivierungen signifikant zu (Abb. 30, D). Insbesondere Signalintensitäten von aktivierten T-Zellen lagen in vergleichbaren Bereichen wie bspw. in A549^{WT}-Zellen vor.

Insgesamt zeigten die Analysen, dass in T-Zellen von gesunden Spendern unabhängig einer Aktivierung die kürzere Spleißvariante S2^{ΔE3} nicht nachweisbar war. Für das SMAD2-Gesamtprotein und die C-terminale Phosphorylierung ergaben sich Zunahmen der bereits unter nicht-aktivierten Bedingungen vorliegenden Niveaus nach einer CD3/CD28-Aktivierung. Dies zeigte sich für die Linker-Phosphorylierung insoweit gegensätzlich, dass diese unter nicht-aktivierten Bedingungen nicht nachweisbar war. Hingegen stieg das pS2L-Signal nach einer CD3/CD28-Aktivierung an. Dabei erfolgten SMAD2 Linker-Phosphorylierungen ebenfalls ausschließlich an S2^{FL}. Ob ein alleiniger Rückschluss von pS2L-Ereignissen auf die Proliferation zulässig war, sollte anhand der folgenden funktionellen Assays von A549L^{sub} vs. A549^{WT} überprüft werden.

3.8 Funktionelle Zellanalysen von A549^{WT} vs. A549L^{sub}

Für eine erste Annäherung, ob und inwieweit SMAD2 Linker-Phosphorylierungen in zentrale funktionelle Zellprozesse involviert sind, wurden verschiedene vergleichende Analysen zu A549^{WT}-Zellen vorgenommen. Neben einer Bestimmung der Proliferationsrate und Zellzyklusphasen wurden ebenfalls Experimente zur Beurteilung von Migration, Invasion sowie zum Kloniebildungspotenzial durchgeführt (Abb. 31).

A549L^{sub} - proliferieren langsamer als A549^{WT}-Zellen

Durch die bisherigen Ergebnisse wurde deutlich, dass SMAD2 Linker-Phosphorylierungen in malignen und benignen Zellen mit dem Zellzyklus assoziiert war. Daher wurden sowohl

Zellzyklusanalysen als auch Untersuchungen zur Proliferationsrate mittels simultaner DAPI- und CellTrace™-Fluoreszenzfärbungen durchgeführt (Abb. 30, A-C).

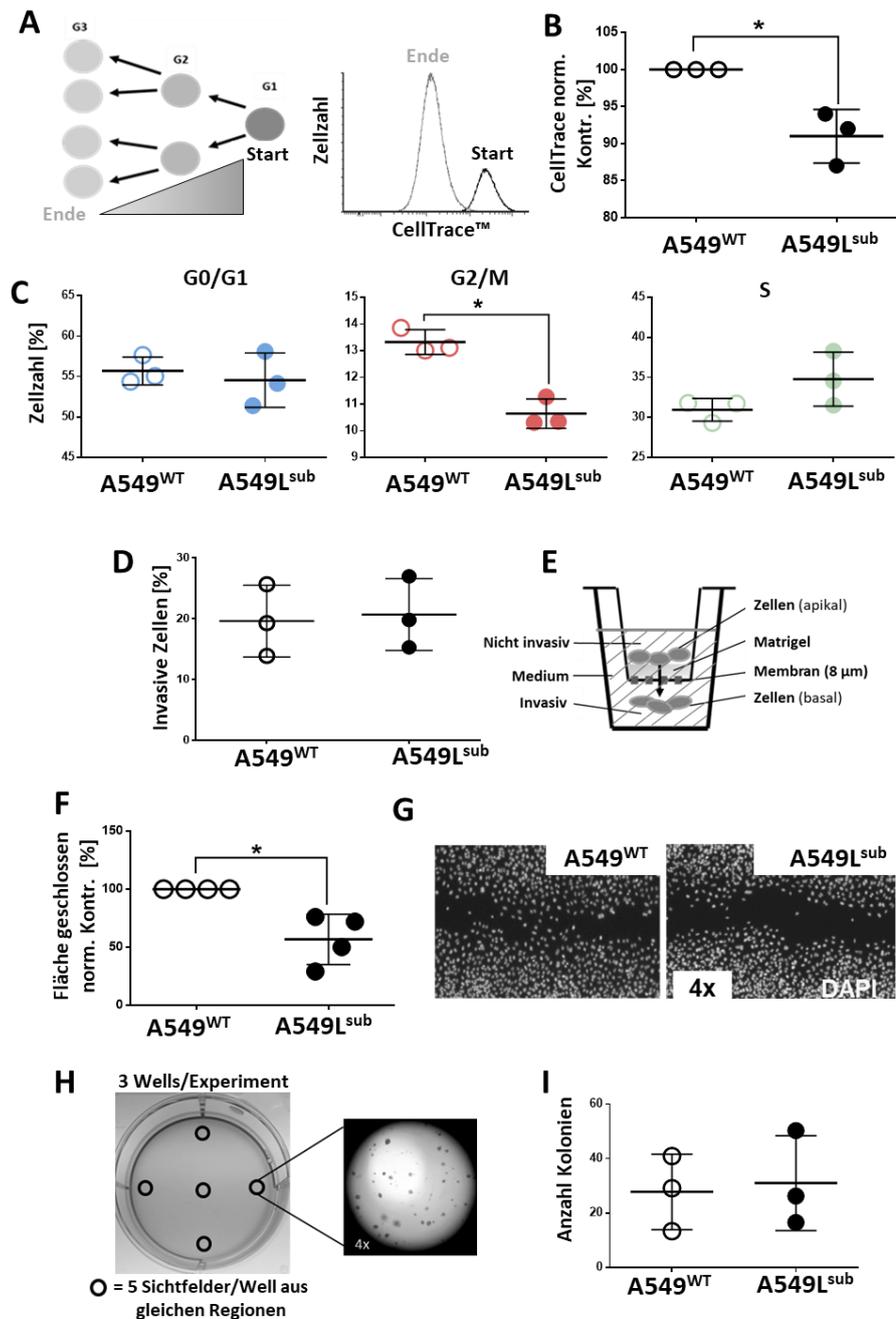


Abb. 31: Funktionelle Zellanalysen von A549L^{sub} vs. A549^{WT}. Die Zellen wurden für alle Analysen unter Medium-Bedingungen kultiviert. **(A)** Schematische Abbildung des CellTrace™ Proliferations-Assay Prinzips mit abnehmender Farbstoffintensität je Zellgeneration (G1-3). Dargestellt wurden repräsentative A549^{WT} Histogramme (*overlay*) eines Start- und Endzeitpunktes der Fluoreszenzmessungen. **(B)** Gemittelte normalisierte CellTrace™-Fluoreszenzintensitäten (\pm SD) in Prozent für A549L^{sub} und A549^{WT}. Letztere fungierten als Kontrolle (= 100 %). **(C)** Vergleichende Zellzyklusanalysen mittels DFZ der simultanen DAPI-Färbungen aus dem Proliferations-Assay (B) von A549L^{sub}- und A549^{WT}-Zellen. **(D)** Prozentuale Mittelwerte invasiver Zellen (\pm SD) des mit Matrigel (ECM) erweiterten Transwell-System (E). **(E)** Schematisch abgebildet wurde das Transwell-System mit Matrigel (ECM) zum Vergleich der Invasionsfähigkeit. **(F)** Gemittelte normalisierte Daten des Wundheilungs-Assays in Prozent (\pm SD). Als Kontrolle fungierte A549^{WT} (= 100%). **(G)** Repräsentative Darstellung der DAPI-Färbungen (hellgrau) aus den Wundheilungs-Assays zur Ermittlung der freien Flächen nach 24 h. **(H)** Schematische Abbildung zur Ermittlung des Koloniebildungspotenzials in Soft-Agar. Die schwarzen Kreise zeigen die zuvor festgelegten Well-Regionen aus denen die Aufnahmen erfolgten (li.). **(I)** Vergleich der Anzahl gebildeter Kolonien in Soft-Agar (H) von A549L^{sub} vs. A549^{WT}. Hinweise: Alle Vergleiche der Mittelwerte (\pm SD) erfolgten mittels eines gepaarten T-Test ($p \leq 0,05$) von drei bzw. vier biologischen Replikaten.

Es zeigte sich eine Reduktion der Proliferationsrate von 9 % ($\pm 2,9$ %), wenn SMAD2 Linker-Phosphorylierungen in A549L^{sub}-Zellen ausblieben (Abb. 31, B). Signifikante Veränderungen zeigten sich ebenfalls bei den prozentualen Zellanteilen innerhalb der G2/M-Phase, die im Vergleich zu A549^{WT} signifikant reduziert waren. Des Weiteren lagen tendenziell mehr Zellen in der S-Phase vor, eine Signifikanz blieb jedoch aus (Abb. 31, C).

A549L^{sub} zeigen Aufrechterhaltung der Invasions- bei herabgesetzter Migrationsfähigkeit

Die Fähigkeit zur Invasion ermöglicht es Zellen, die ECM zu durchdringen und ist ein entscheidendes Merkmal von Krebszellen. Dadurch wird eine Ausbreitung über die Lymph- und Blutgefäße zur Kolonisierung benachbarter Gewebe und anderer Organe erreicht. Der grundlegende Prozess wird als karzinogene EMT bezeichnet und trägt zur Metastasierung und Malignität bei. Auch wenn die Invasion dem grundlegenden Prozess der Migration entspringt, ist dieser davon abzugrenzen. Migration findet ebenfalls in benignen Zellen bspw. während der Embryonalentwicklung oder Wundheilung statt. Dennoch gehen oftmals beide Prozesse in Krebszellen einher (88) (89). Zum Vergleich der Invasionsfähigkeit wurde zur Nachbildung einer ECM Matrigel verwendet, das zwei Kompartimente in Form eines apikalen- und basalen Wells voneinander trennte (Abb. 31, E). Die statistische Auswertung ließ keine Unterschiede bei der Invasionsfähigkeit erkennen. Beide Zellentypen hatten eine ähnliche Invasionsrate von 19,6 % ($\pm 4,8$ %) und 20,7 % ($\pm 4,8$ %), unabhängig einer SMAD2 Linker-Phosphorylierung (Abb. 31, D). Im Gegensatz dazu war die Migration von A549L^{sub} - im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen um 43,3 % ($\pm 18,8$ %) signifikant herabgesetzt (Abb. 31, F + G).

A549L^{sub}-Zellen behalten ihr Koloniebildungspotenzial

Ein weiteres Merkmal transformierter Zellen ist die Fähigkeit von Teilpopulationen Kolonien unabhängig einer festen Oberfläche zur Adhärenz auszubilden (70). Daher wurden beide Zelllinien auf Soft-Agar beschichteten Platten ausgebracht (Abb. 31, H). Es zeigten sich vergleichbare Mittelwerte für die Koloniebildung. A549^{WT}- bildeten 27,8 ($\pm 11,7$) und A549L^{sub}-Zellen 31,0 ($\pm 14,2$) Kolonien aus (Abb. 31, I).

Die funktionellen Zellanalysen zeigten eine verminderte Proliferationsrate und reduzierte Zellzahl innerhalb der G2/M-Phase, wenn keine SMAD2 Linker-Phosphorylierung erfolgte.

Darüber hinaus zeigte sich eine deutlich verlangsamt Migration, wenn SMAD2 Linker-Phosphorylierungen konstitutiv unterbunden wurden. Im Gegensatz dazu waren Invasions- und Koloniefomationseffizienzen im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen unverändert. Eine Abnahme der Malignität war somit lediglich partiell ersichtlich. Ableitend aus diesen Ergebnissen ergab sich die Frage nach pS2L-assoziierten regulatorischen Einflüssen in NSCLC-Zellen. Daher wurden weiterführend Array-Analysen auf verschiedenen biologischen Ebenen durchgeführt.

3.9 Untersuchungen zu regulatorischen Einflüssen von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen mittels Array-basierter Verfahren

Basierend auf den Ergebnissen der funktionellen Zellanalysen sollte untersucht werden, welche Zielstrukturen von fehlenden SMAD2 Linker-Phosphorylierungen betroffen bzw. mit welchen zellulären Prozessen diese assoziiert sind und darüber hinaus, auf welchen biologischen Ebenen diese erfolgen. Daher wurden verschiedene Array-basierte Verfahren zur Untersuchung eingesetzt, um ein möglichst weites Spektrum abzudecken und verschiedene zelluläre Ebenen zu berücksichtigen. Die differenziellen Ergebnisse der Array-Analysen wurden als *heatmaps* abgebildet (Abb. 32, B-D) und im weiteren Verlauf einer **Gene Ontology Biological Process (GO_BP)**-Anreicherungsanalyse unterzogen. Die Ergebnisse differenzieller Proteinexpressionen und Zielstrukturen von Kinaseaktivitäten wurden aufgrund der gleichen Analyseebene zusammengefasst (Abb. 32, A+D).

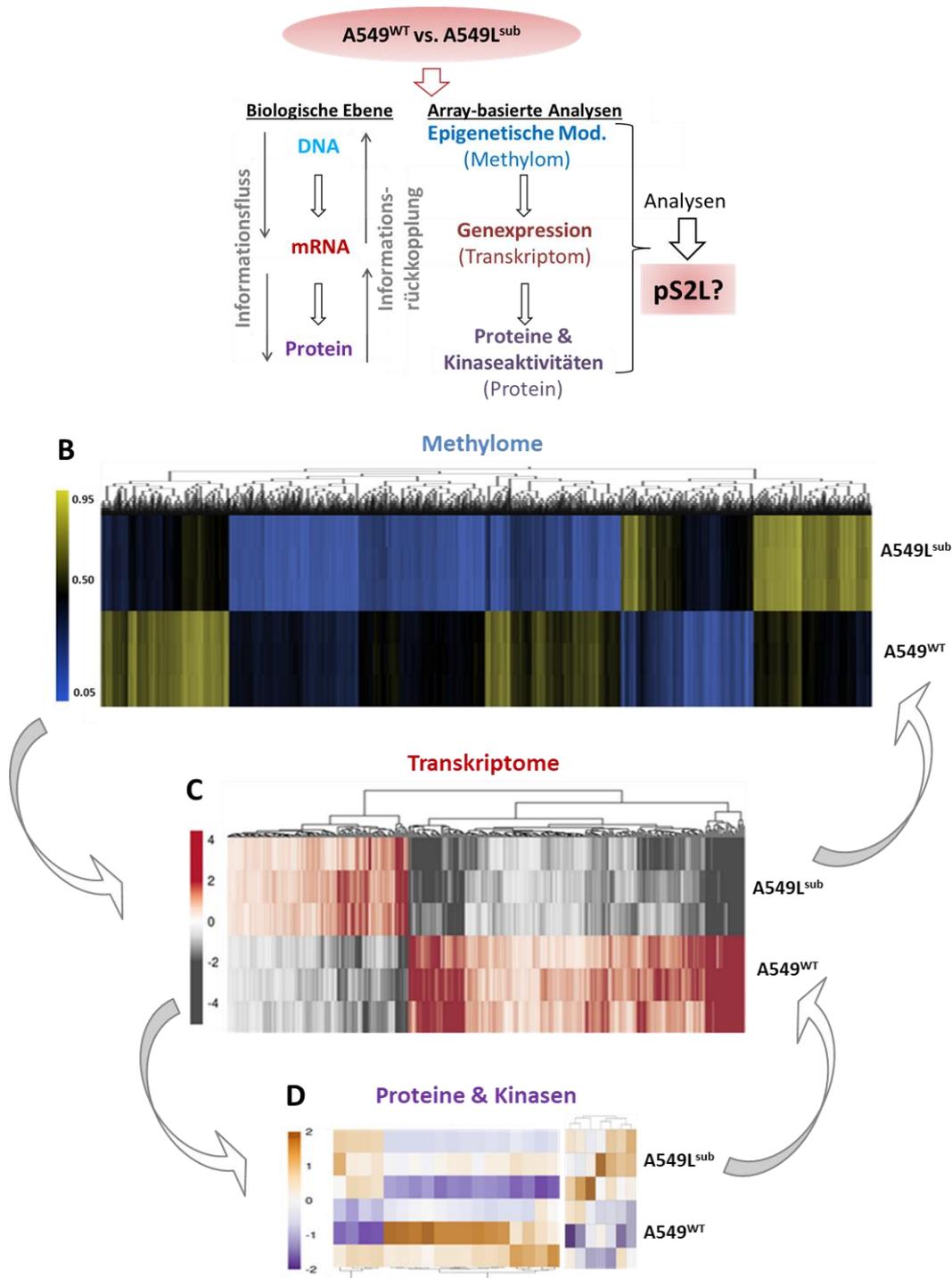


Abb. 32: Heatmaps Array-basierter Analysen verschiedener biologischer Ebenen von A549^{WT} vs. A549L^{sub}. (A) Die schematische Abbildung gibt Aufschluss über die untersuchten biologischen Ebenen mit den korrespondierenden Array-basierten Verfahren von A549^{WT} vs. A549L^{sub} zur Ermittlung phospho-SMAD2-Linker assoziierter Regulationen. (B) Differenzielle Methylierungen wurden mittels eines gepaarten T-Tests ($p \leq 0,0001$) mit einer BH *multiple testing correction* ($FDR \leq 0,05$; $\delta \geq 0,25$) ermittelt und hierarchisch geclustert. (C) Differenziell exprimierte Gene wurden mittels eines *moderated* T-Test ($p \leq 0,05$) und einer BH *multiple testing correction* ($FDR \leq 0,05$; $FC \geq 2$) ermittelt. Die normalisierten Signale wurden anschließend hierarchisch geclustert und abgebildet. (D) Differenzielle Kinaseaktivitäten (li.) und Proteinexpressionen (re.) wurden jeweils mittels eines gepaarten *multiple* T-Test ($p \leq 0,05$; $FDR \leq 0,05$) statistisch geprüft und hierarchisch geclustert. Die grauen Pfeile deuten auf den Informationsfluss als auch Mechanismen zellulären Rückkopplungen hin. Hinweise: FC = *Fold change*.

Fehlende pS2L-Ereignisse führen zu differentiellen Methylierungen und Genexpressionen sowie zu Veränderungen von Proteinniveaus und Kinaseaktivitäten

Epigenetische Modifikationen gehören zu den grundlegenden Mechanismen von Genregulationen, die nicht in einer direkten Veränderung der DNA-Sequenz begründet sind. Hierbei kommt es zu Methylierungen von Cytosinen (C) innerhalb sog. CpG-Inseln. Hypomethylierungen können bspw. zu einer Reaktivierung reprimierter Gene führen, während Hypermethylierungen einen gegenteiligen Effekt bewirken. Veränderte Methylierungsmuster können somit neben anderen Mechanismen (z. B. miRNAs) Genexpressionen und infolgedessen regulatorische Prozesse beeinflussen (90) (91) (92). Die Methyloanalysen ergaben 5186 differentielle Methylierungen von CpG-Loci, wenn keine SMAD2 Linker-Phosphorylierungen erfolgten. Davon waren 1677 Loci hyper- und 3507 Loci hypomethyliert (Abb. 32, B). Darüber hinaus wurden durch Transkriptomanalysen 342 signifikant differentielle Genexpressionen bei einem Vergleich von A549L^{sub}- zu A549^{WT}-Zellen ermittelt. Davon waren 115 hoch- und 227 herunterreguliert (Abb. 32, C). Des Weiteren ergaben Untersuchungen von 84 krebsassoziierten Proteinen sieben erhöhte Proteinniveaus ($\geq 25\%$), wenn in Zellen keine Linker-Phosphorylierung am SMAD2 erfolgte. Hingegen wurden keine signifikant verminderten Proteinniveaus detektiert (Abb. 32, D; re.). In komplexen Prozessen ist oftmals nicht nur die bloße Anwesenheit eines Proteins ausreichend, sondern benötigt für eine biologische Aktivität spezifische posttranslationale Modifikationen wie bspw. Phosphorylierungen (93) (94). In Folge einer unterbundenen Linker-Phosphorylierung waren lediglich veränderte Protein-Tyrosin-Kinase (PTK)-Aktivitäten feststellbar, die in einem Bereich von 20-40% lagen. Im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen waren drei Zielstrukturen höher- und 13 geringer phosphoryliert (Abb. 32, D; li.). Hingegen blieben Zielproteine von Serin/Threonin-Kinasen von signifikanten Veränderungen ausgenommen.

Deutlich wurde durch das breite Spektrum Array-basierter Verfahren, dass fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen Veränderungen auf verschiedenen zellulären Ebenen nach sich ziehen. Für eine Untersuchung phospho-SMAD2 Linker-abhängiger Prozesse wurden die Daten GO_BP-Anreicherungsanalysen unterzogen.

3.9.1 Datenfusion und Anreicherungsanalysen differenzieller Zielstrukturen Array-basierter Experimente

Aufgrund einer geringeren Anzahl untersuchter Zielmoleküle auf den Protein- und Kinase-Arrays im Vergleich zu den Methylom- und Transkriptom-Experimenten wurden signifikante Ergebnisse mit direkten und indirekten Interaktoren angereichert. Zu diesem Zweck wurde die STRING Datenbank verwendet. Darüber hinaus visualisiert die Datenbank Netzwerke der eingefügten als auch erweiterten Listen und stellt diese zum *download* zur Verfügung. Das expandierte Netzwerk wurde für die folgende GO_BP-Analyse verwendet (Abb. 33).

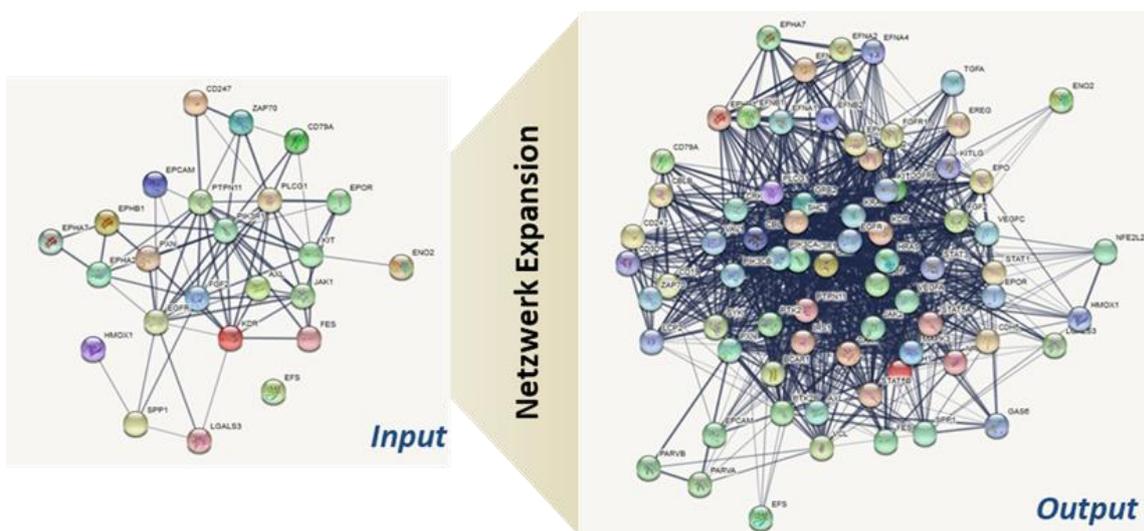


Abb. 33: Expansion signifikant differenzieller Zielmoleküle der Protein- und Kinase-Arrays von A549^{WT} - vs. A549L^{sub}-Zellen mittels STRING DB. Abgebildet wurde das mittels STRING DB erstellte Netzwerk signifikant unterschiedlicher Zielstrukturen aus den Protein- und Kinase-Arrays (li.) von A549^{WT} vs. A549L^{sub}. Für die Erweiterung des Netzwerks wurde ein *confidence score* von 0,5 gewählt. Insgesamt wurden in erster Ebene (1^{st shell}) 50 und in zweiter (2^{nd shell}) weitere 10 Interaktoren zugelassen. Die *output*-Liste (re.) wurde exportiert und für die GO_BP-Anreicherungsanalyse verwendet. Die Verbindungsstärken innerhalb der Netzwerke spiegeln den Daten-*support* wider.

SMAD2 Linker-Phosphorylierungen beeinflussen Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse

Die Datenanalysen erfolgten mittels der GSEA MSigDB unter Berücksichtigung von GO_BP *terms*. Die jeweils signifikanten „top 50 hits“ wurden anschließend in einem Venn Diagramm überlagert. Dadurch wurde ersichtlich auf welchen biologischen Ebenen spezifische Veränderungen auftraten und ob es Überschneidungen gab. Anschließend wurden die GO_BP *terms* aus dem Venn Diagramm exportiert und mit den entsprechenden FDR q-Werten abgeglichen. Korrespondierende FDR q-Werte der drei biologischen Ebenen wurden als *heatmaps* dargestellt. Darin abgebildet wurden die

anteilig signifikant angereicherten GO_BP *terms* aus den Analysen (k) zur annotierten Anzahl (K) als Quotient (k/K) (Abb. 34).

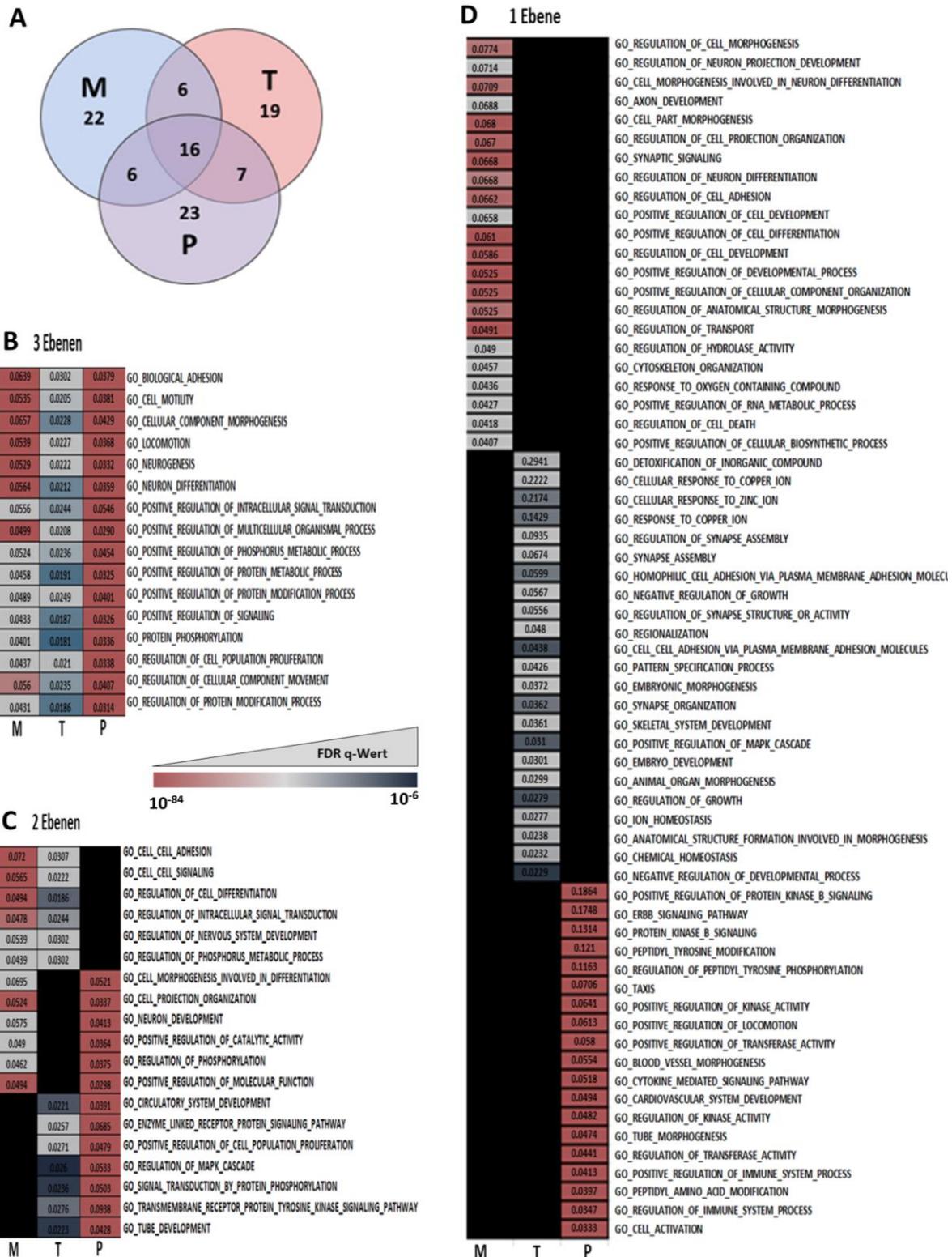


Abb. 34: GO_BP-Anreicherungsanalysen differenzieller Zielstrukturen von A549^{WT} vs. A549L^{sub} verschiedener biologischer Ebenen. (A) Venn Diagramm differenzieller GO_BP terms aus den Methylo (M)-, Transkriptom (T)- und Protein (P)-Daten Array-basierter Verfahren (vergl. Abb. 32) von A549^{WT} vs. A549L^{sub}. (B-C) Farblich im Hintergrund dargestellt wurden die signifikanten FDR q-Werte ($\leq 0,05$) der GO_BP terms. Darin abgebildet wurden die Quotienten (k/K) der anteilig am gesamten GO_BP Set angereicherten terms aus den jeweiligen Analysen. Die Spalten beziehen sich auf das Venn Diagramm, die Ebenen darüber geben Aufschluss in wie vielen und aus welchen Analysen die Ergebnisse resultierten (vergl. (A)). Hinweise: k = Anzahl signifikant angereicherter GO_BP terms der Analysen; K = Gesamtanzahl annotierter GO_BP terms.

Signifikant angereicherte GO_BP terms aus den Methylom (M)-, Transkriptom (T)- und Protein (P)-Daten zeigten 16 Übereinstimmungen (Abb. 34, A). Diese beinhalteten überwiegend regulatorische Prozesse (9/16) wie bspw. „*regulation of metabolic process*“, „*regulation of protein phosphorylation process*“ und „*regulation of phosphorous metabolic process*“. Ebenfalls fanden sich die GO_BP terms „*neurogenesis*“ und „*neuron differentiation*“ sowie zur „*biological adhesion*“, „*locomotion*“ und „*cell motility*“ in allen drei untersuchten biologischen Ebenen wieder (Abb. 34, B). Letzteres war mit den Beobachtungen einer herabgesetzten Migrationsfähigkeit von A549L^{sub} konform (Abb. 31, F + G). Bei den Übereinstimmungen aus 2 Ebenen zeigten sich insgesamt 19 Überschneidungen, die sich mit M vs. T = 6, M vs. P = 6 und T vs. P = 7 gleichmäßig verteilt darstellten. Hier fanden sich vermehrt angereicherte GO_BP terms zur neuronalen Entwicklung wie „*regulation of nervous system development*“ und „*neuron development*“. Ebenfalls traten signifikante Ergebnisse für Signalwege in Erscheinung wie bspw. „*regulation of MAPK cascade*“ und „*transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway*“ (Abb. 34, C). Die exklusiv signifikanten GO_BP terms aus M, T oder P beinhalteten ebenfalls Entwicklungs-, Differenzierungs- und morphogenetische Prozesse. Auf Transkriptebene gab es zudem Unterschiede, die auf embryonale Entwicklung und -Morphogenese schließen ließen. Zudem traten signifikante GO_BP terms der Detoxifikation, anorganischen Verbindungen und zelluläre Reaktionen auf Zink und Kupfer auf (Abb. 34, D). Die k/K-Quotienten waren über die gesamte Analyse relativ konstant, der geringste Wert betrug 0,02 und der höchste 0,29. Durchschnittlich ergab sich für alle untersuchten Ebenen ein k/K-Quotient von 0,052 ($\pm 0,02$) und entsprach damit 5,2 % (± 2 %).

Die Ebenen übergreifenden Analysen ließen insbesondere eine Assoziation von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen mit Prozessen der neuronalen Morphogenese, -Differenzierung und -Entwicklung zu. Darüber hinaus waren die differenziellen Ergebnisse der Array-Daten für GO_BP terms der zellulären Adhäsion, Zellmotilität und Wachstum signifikant angereichert. Dies stand in Einklang mit den vorherigen Ergebnissen funktioneller Untersuchungen hinsichtlich einer beobachteten Veränderung der Migration und Proliferation, wenn keine Linker-Phosphorylierungen erfolgen konnten. Des Weiteren zeigten die differenziellen Transkriptom-Daten signifikante Ergebnisse für embryonale

Entwicklung und Morphogenese. Insbesondere die Spleißvariante S2^{ΔE3} steht mit der Embryogenese in einem engen Zusammenhang (15) (57), daher waren die Ergebnisse in an betracht des manifestiert erhöhten S2^{ΔE3}-Niveaus in A549L^{sub}-Zellen plausibel. Die differenziellen Zielstrukturen waren ebenfalls signifikant angereichert für GO_BP terms des MAPK-Signalwegs, der im Besonderen KRAS assoziiert ist. Zur Überprüfung der Datenkosistenz wurden die Array-Daten zusammengeführt und einer KEGG-Signalweganalyse unterzogen.

Differenzielle Zielstrukturen sind mit EGFR-TKI Resistenz assoziiert

Für eine Signalweganalyse wurden alle signifikanten differenziellen Zielstrukturen von A549L^{sub} vs. A549^{WT} zu einer Gesamtliste fusioniert (Abb. 34, A). Eine Abfrage erfolgte web-basiert mittels STRING DB, wobei Daten verschiedener Plattformen zur Verfügung gestellt werden. Für eine Signalweg-Anreicherungsanalyse wurde auf die **Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)**-Datenbank zurückgegriffen.

Die differenziellen interagierenden Zielstrukturen waren insgesamt für 24 Ergebnisse der KEGG-Datenbank signifikant angereichert (Abb. 34, B). Darunter befanden sich bspw. der MAPK-, RAS- und HIF1-Signalweg sowie Zielstrukturen, die mit einer endokrinen- und EGFR-TKI Resistenz in Verbindung standen. Für letztere ergaben sich durch eine Überlagerung im Venn Diagramm 7 herunter- und 9 hochregulierte Zielstrukturen in A549L^{sub} - im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen (Abb. 34, C).

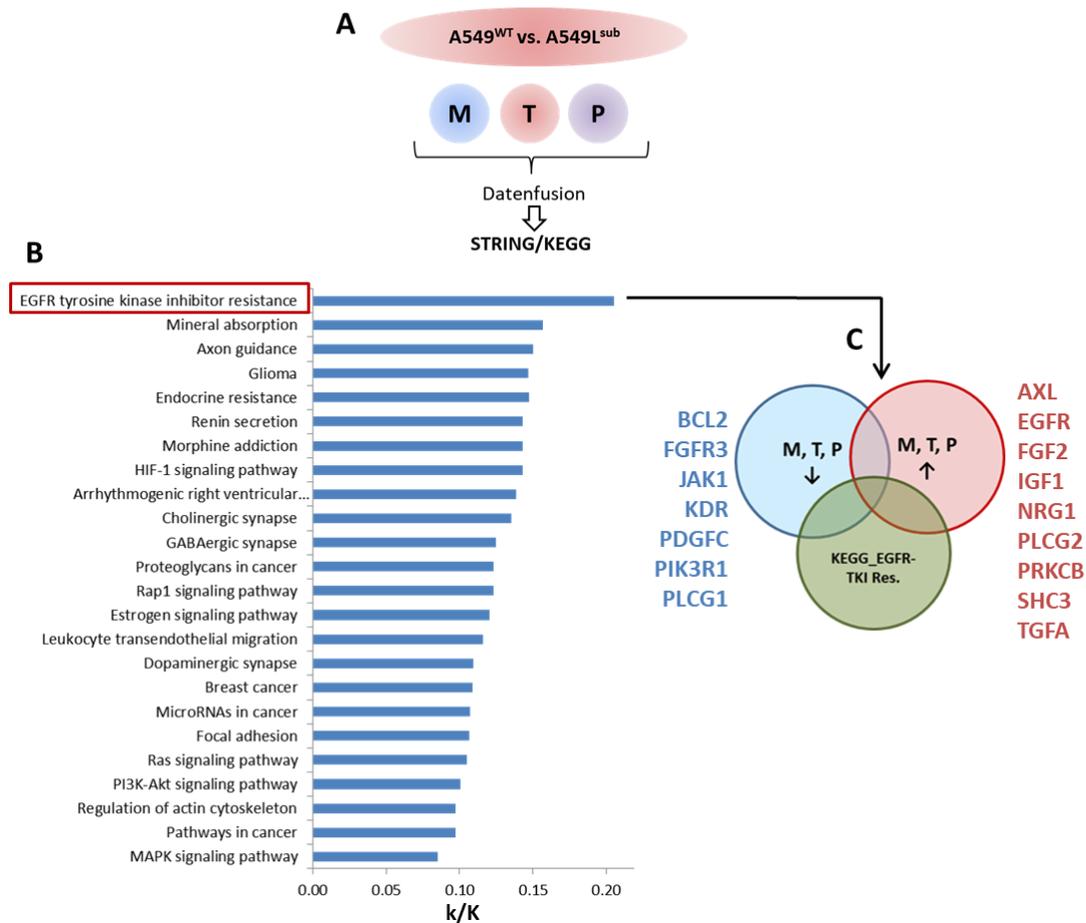


Abb. 35: KEGG-Analyse differenziell interagierender Zielstrukturen von A549L^{sub} vs. A549^{WT}. (A) Schematische Abbildung zur Datenfusion Array-basierter Ergebnisse (A549L^{sub} vs. A549^{WT}) für eine KEGG-Analyse (FDR ≤ 0,05) mittels STRING DB. Bei der Abfrage wurden keine weiteren Interaktoren zugelassen und ein *confidence score* von 0,5 gewählt. (B) Signifikante KEGG-Ergebnisse wurden anhand der k/K-Quotienten absteigend sortiert und abgebildet. (C) Venn Diagramm zur Ermittlung differenziell regulierter Zielstrukturen der KEGG-Annotationen zur EGFR-TKI Resistenz (grün). Angegebene Regulationen (blau ↓; rot ↑) beziehen sich auf A549L^{sub} im Vergleich zu A549^{WT}. Hinweise: k = Anzahl differenziell regulierte Zielstrukturen der Array-Analysen; K = Gesamtanzahl annotierter Zielstrukturen im KEGG-*pathway*; M = Methylom; T = Transkriptom; P = Protein.

Grundsätzlich ist bekannt, dass *KRAS*-Mutationen in A549^{WT} zu EGFR-TKI Resistenzen wie bspw. gegen Gefitinib führen, da EGFR-unabhängig eine konstitutive Aktivierung des RAS/RAF/MAPK-Signalwegs vorliegt (95). Darüber hinaus waren ebenfalls signifikante Anreicherungen von Zielstrukturen vorhanden, die mit Tumoren des Zentralnervensystems (Glioma) assoziiert waren. Diese Ergebnisse standen in Einklang mit signifikant angereicherten GO_BP *terms* wie bspw. zur Neurogenese.

Insgesamt zeigte die KEGG-Analyse parallelen zu den signifikant angereicherten GO_BP *terms* insbesondere in Bezug auf neuronale Prozesse, dem MAPK- und Tyrosin-Kinase Signalweg. Eine Aktivierung und Etablierung von *bypass tracks* wie bspw. durch eine

Überexpression von AXL, TGFA oder FGFs sind bekannte EGFR-unabhängige Mechanismen einer erworbenen Resistenz bei Behandlungen EGFR-TKI sensitiver NSCLCs (96). Andererseits fanden sich ebenfalls herabgesetzte Regulierungen wie bspw. für BCL2. Wobei hohe Expressionen in ADCs mit einer längeren Überlebenszeit in Zusammenhang stehen (97). Darüber hinaus ist bekannt, dass $S2^{\Delta E3}$ als vorherrschende SMAD2-Spleißvariante in Hirngewebe von Mäusen vorliegt und während der Gehirnentwicklung differenziell exprimiert wird (98). Aufgrund eines signifikanten Ergebnisses zu Gliomen und neuronalen Prozessen wurden die Expressionen von $S2^{FL}$ - und $S2^{\Delta E3}$ -Transkripten *in silico* analysiert.

$S2^{\Delta E3}$ -Transkripte sind in Gliomen signifikant höher exprimiert

Für eine Untersuchung der Expressionen von $S2^{FL}$ und $S2^{\Delta E3}$ wurden *in silico* Analysen mittels der GEPIA2-Datenbank durchgeführt. Die NSCLC (ADC + SQC)-Analysen ergaben weder eine signifikant differenzielle Expression der langen noch der kurzen SMAD2-Variante im Vergleich zu Normalgewebe. Die beiden verfügbaren Datensätze der Gliom-Entitäten *glioblastoma multiforme (GBM)* und *low grade glioma (LGG)* zeigten hingegen eine signifikant höhere $S2^{\Delta E3}$ -Expression (Abb. 35, A).

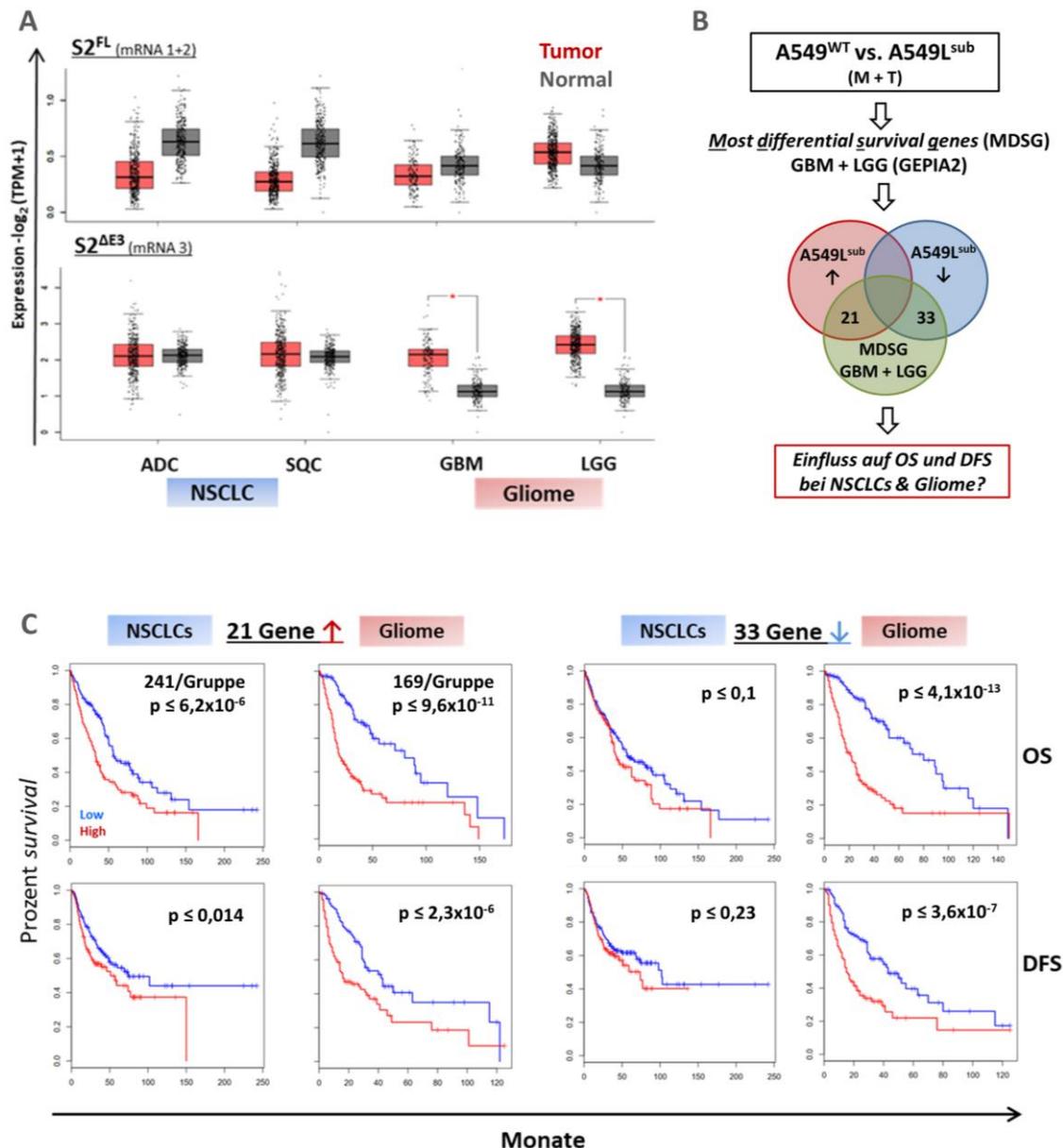


Abb. 36: Einfluss differenziell exprimierter Gene von A549^{WT} vs. A549^{L^{sub}} und deren Einfluss auf das OS und DFS von NSCLC- und Gliom-Kohorten. Die Datenanalysen erfolgten *in silico* mittels der GEPIA2-Datenbank. **(A)** $S2^{FL}$ - und $S2^{\Delta E3}$ -Transkriptexpressionen in NSCLCs (ADC + SQC) und Gliomen (GBM + LGG) im Vergleich zu den jeweiligen Normalgeweben. Signifikanzniveaus wurden mittels *one-way* ANOVA ($p \leq 0,01$) analysiert. **(B)** Signifikant differenziell regulierte Gene aus den Methylom (M)- und Transkriptom (T)-Analysen von A549^{L^{sub}} vs. A549^{WT} wurden mit *most differential survival genes* (MDSGs) der Gliome (GEPIA2; *cutoff* 75. Quartil; 500 Gene je Glioma-Entität) durch ein Venn Diagramm ermittelt. **(C)** Einfluss von hoch- und herunterregulierten Genen (B) auf das Gesamt- (OS)- und krankheitsfreie Überleben (DFS) der NSCLC- und Gliom-Gruppe. Hinweise: ADC = Adenocarcinoma; SQC = Squamous cell carcinoma; GBM = Glioblastoma multiforme; LGG = Low grade glioma.

Im nächsten Schritt wurden die *most differential survival genes* (MDSG) für GBM und LGG über GEPIA2 ermittelt. Mittels eines Venn Diagramms wurden die signifikant differenziell herauf- und herunterregulierten Genen aus den Methylom- und Transkriptomanalysen von A549^{L^{sub}} vs. A549^{WT} abgeglichen (Abb. 36, B). Die ermittelten Listen herauf- und

herunterregulierter Gene wurden auf das OS und DFS der NSCLC- und Gliom-Gruppe getestet. Dabei zeigten signifikant heraufregulierte Gene sowohl in der NSCLC- als auch Gliom-Gruppe einen signifikant negativen Einfluss auf das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben. Darunter befanden sich bspw. *GJB2*, *GOS2*, *CCNB1* und *SPHK1*. In beiden Tumorgruppen trennten sich die Kurven beim Gesamtüberleben deutlicher auf im Vergleich zum krankheitsfreien Überleben. Die herunterregulierten Gene hatten keinen signifikanten Einfluss auf das OS und DFS bei NSCLCs. Bei den Gliomen gab es hingegen einen signifikant positiven Zusammenhang mit dem Gesamt- und krankheitsfreien Überleben (Abb. 35, C).

Die Analysen zeigten, dass Gliome signifikant erhöhte $S2^{AE3}$ -Transkriptniveaus im Vergleich zu den Normalgeweben aufwiesen. Die kurze SMAD2-Spleißvariante lag ebenfalls in Proteinlysaten von A549L^{sub}-Zellen höher vor (Abb. 22), aber nicht auf mRNA-Ebene (Abb. 26). Interessanterweise zeigten die *in silico* Analysen der NSCLCs eine geringere Transkriptexpression von $S2^{FL}$ zu den Normalgeweben. Bei einem Vergleich von A549^{WT}-Zellen zu AECII aus tumorfreien Lungengeweben waren die Niveaus hingegen auf Proteinebene vergleichbar (Abb. 28). Die differenziell regulierten Gene aufgrund der fehlenden SMAD2 Linker-Phosphorylierung zeigten wiederum exklusive Übereinstimmungen mit MDSGs von GBM und LGG. Dies bestätigte die zuvor erhaltenen Ergebnisse der KEGG-Analyse, die eine signifikante Anreicherung für Gliome bei einer fehlenden SMAD2 Linker-Phosphorylierung ergab (Abb. 34). Insbesondere die in A549L^{sub} heraufregulierten Gene hatten sowohl bei der NSCLC- als auch Gliom-Gruppe einen signifikant negativen Einfluss auf das OS und DFS. Eine fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierung beeinflusst den Ergebnissen zur Folge neuronal-assoziierte Zielstrukturen. Ob sich fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen auch auf andere zelluläre Prozesse auswirkten, wurde anhand der Transkriptom-Daten geprüft.

SMAD2 Linker-Phosphorylierungen beeinflussen Genexpressionen die mit EMT-, Zellmotilität- und Embryonalentwicklung assoziiert sind

Um näher zu untersuchen, ob und inwieweit fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen spezifische Prozesse auf mRNA-Ebene beeinflussen wurden drei repräsentative Genlisten

über GSEA MSigDB bezogen und mit den differentiellen Daten der Transkriptome (A549^{WT} vs. A549L^{sub}) abgeglichen (Abb. 36, A-C).

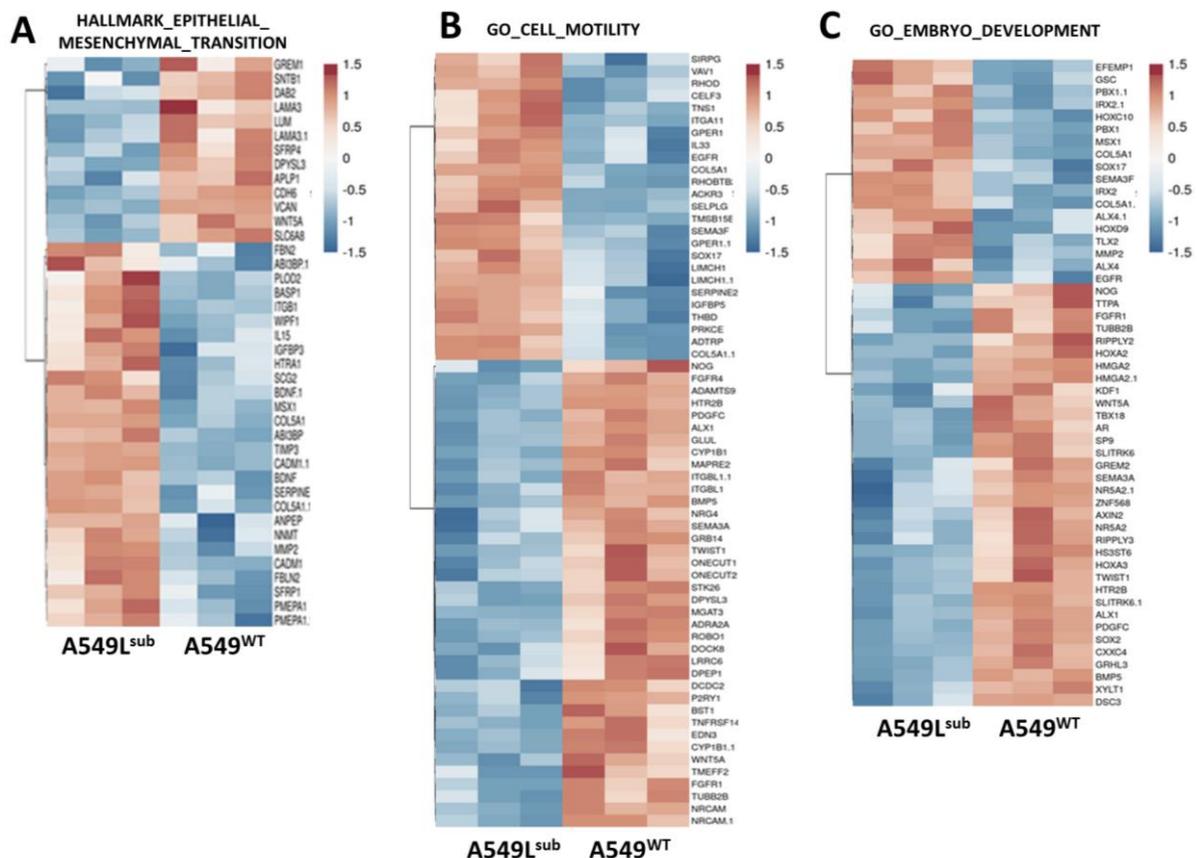


Abb. 37: Differentielle Genexpressionen von assoziierten Genen mit EMT, Zellmotilität und Embryonalentwicklung in A549L^{sub}- vs. A549^{WT}-Zellen. Genexpressionen unstimulierter A549L^{sub}- und A549^{WT}-Zellen wurden mit relevanten Genen für EMT (A), Zellmotilität (B) und Embryonalentwicklung (C) auf signifikant differentielle Regulationen mittels moderated T-Tests ($p \leq 0,05$) mit BH *multiple testing correction* (FDR 0,05) analysiert. Normalisierte Expressionsdaten wurden mittels ClustVis hierarchisch geclustert und als *heatmaps* dargestellt. Die Referenzlisten wurden über die GSEA MSigDB bezogen und deren Bezeichnungen über den *heatmaps* angegeben.

Da insbesondere EMT einen TGF β -assoziierten Prozess darstellt (65) wurde geprüft, ob fehlende Linker-Phosphorylierungen Auswirkungen auf assoziierte Gene hatten, obwohl Linker-Domänen kein direktes Substrat des T β R-Komplexes darstellen (48) (99) (100). Des Weiteren wurde aufgrund einer verlangsamten Migration von A549L^{sub}-Zellen untersucht, ob relevante Gene der Zellmotilität von differentiellen Regulationen betroffen waren. Die letzte Analyse ergab sich aus der signifikanten Anreicherung von GO_BP *terms* für Embryonalentwicklung. Des Weiteren wurden höhere S2^{AE3}-Niveaus in A549L^{sub}-Zellen analysiert, die bspw. ebenfalls in *X. laevis* Embryonen nachgewiesen wurden (57). Die

ermittelten Zielstrukturen wurden einem hierarchischen Clustering unterzogen (Abb. 36, A - C).

Interessanterweise zeigte die Analyse EMT-assoziiierter Gene differenzielle Regulationen, wenn SMAD2 Linker-Phosphorylierungen unterbunden waren. Im Vergleich zu A549^{WT} waren 13 Genexpressionen herunter- und 26 heraufreguliert. Es fanden sich bspw. niedrigere Transkriptionsniveaus für *SLC6A8*, *LUM* und *GREM1*. Gegensätzlich stellte sich dies bspw. für Genexpressionen von *COL5A1*, *PLOD2*; *BDNF* und *MMP2* dar. Diese waren in A549L^{sub}-Zellen höher exprimiert (Abb. 36, A). Wie bereits durch die Ergebnisse der Migrationsanalysen vermutet, bestätigten sich ebenfalls differenzielle Expressionen von relevanten Genen der Zellmotilität. In A549L^{sub} waren 23 Genexpressionen herauf- und 36 herunterreguliert. Zu ersteren gehörten bspw. *IL33* und *EGFR*. Ein herabgesetztes Transkriptionsniveau lag dagegen bspw. für *TWIST1* sowie *ONECUT1* und -2 vor (Abb. 36, B). Unterschiede konnten ebenfalls bei Genen analysiert werden, die mit Embryonalentwicklung assoziiert waren. Neben einer heraufregulierten *GSC*-Expression zeigte sich dies ebenfalls für die Homeobox-Gene *HOXD9* und *HOXC10*, während andere Transkriptionsniveaus der gleichen Genfamilie wie bspw. *HOXA2* und -3 herunterreguliert waren (Abb. 36, C).

Insgesamt bestätigte ein Abgleich mit bekannten Zielstrukturen spezifischer zellulärer Prozesse signifikant veränderte Genregulationen aufgrund fehlender SMAD2 Linker-Phosphorylierungen. Insbesondere die Tatsache, dass sich ein Fehlen dieser in A549L^{sub}-Zellen auch auf TGFβ-assoziierte Prozesse auswirkte, gab Anlass für weitere Untersuchungen zur Liganden Prozessierung und Signalwegsintegrität.

3.9 TGFβ-Signalwegsintegrität und Liganden Prozessierung in A549L^{sub}- und A549^{WT}-Zellen

Die folgenden Untersuchungen sollten Aufschluss zur Prozessierung von TGFβ-Signalen in A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen geben. Des Weiteren sollte dadurch geprüft werden, ob der kanonische Signalweg und das SMAD2-Protein trotz einer SMAD2 Linker-Substitution intakt waren. Zum anderen wurden die Analysen als Antikörper-Kontrolle genutzt, da C-terminale Phosphorylierungen direkt vom TβR-Komplex vermittelt werden. Durch TGFβ1-

Stimulationen wurden daher bei einem intakten kanonischen TGF β -Signalweg höhere Signalintensitäten für pS2C erwartet. Darüber hinaus erfolgte als ergänzende Kontrolle der Nachweis des SMAD3-Gesamtproteins in unstimulierten Zellen, um einen möglichen indirekten Einfluss durch SMAD2 Linker-Substitutionen zu untersuchen und die Spezifität des S2 total Antikörpers aufgrund der hohen Sequenzidentität zu SMAD3 zu verifizieren. Umsetzungen dieser Vorhaben erfolgten durch Western Blot- und Genexpressionsanalysen (Abb. 37 + 38).

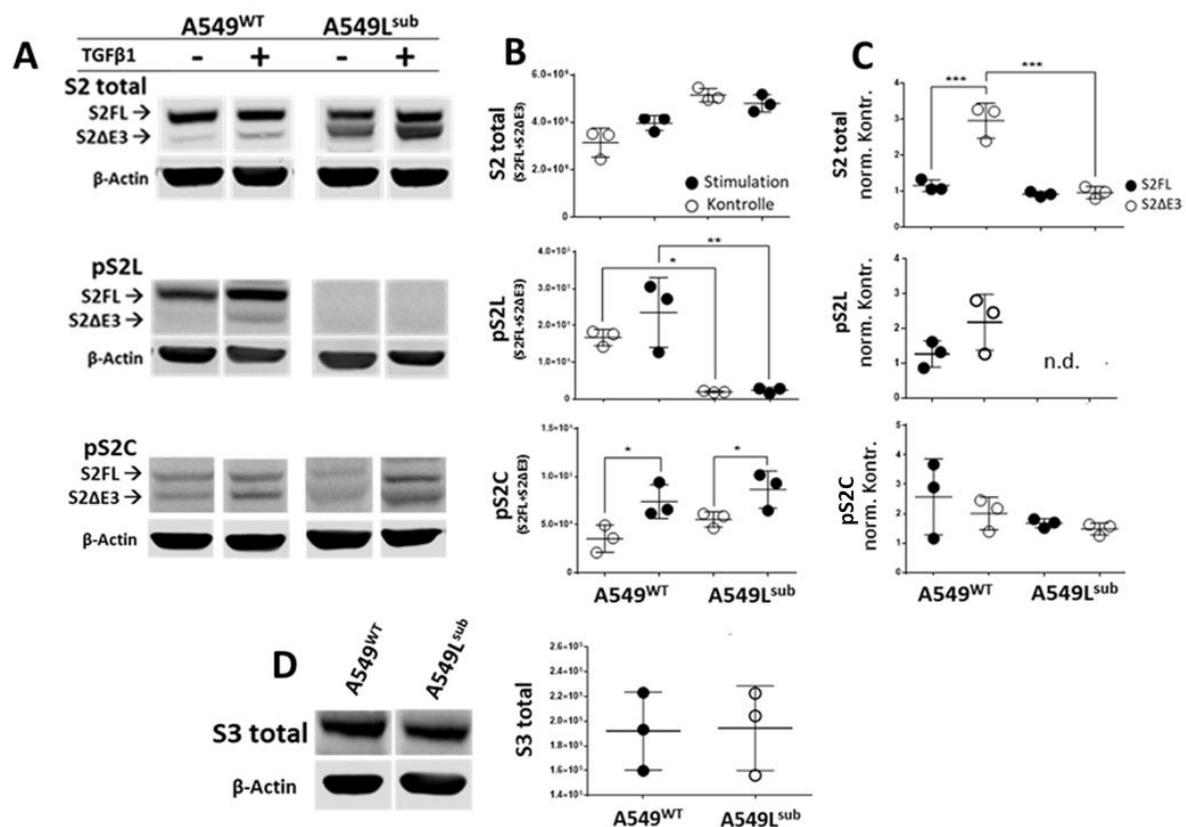


Abb. 38: TGF β -Signalwegintegrität in A549^{Lsub}- und A549^{WT}-Zellen. (A) Exemplarische Western Blot-Analysen TGF β 1 stimulierter A549^{Lsub}- und A549^{WT}-Zellen (n = 3) **(B)** Statistische Auswertungen gemittelter Intensitätswerte (\pm SD) der Western Blot-Analysen (A) von A549^{WT} und A549^{Lsub}. Für paarweise Vergleiche fanden RM *one-way* ANOVAs mit Sidak's *post-hoc* Tests ($p \leq 0,05$) Anwendung. Die Intensitätswerte der SMAD2-Spleißvarianten wurden zu einem Gesamtsignal addiert ($S2^{FL} + S2^{\Delta E3}$). **(C)** Abgebildet wurden die normalisierten Daten (\pm SD) der SMAD2-Spleißvarianten TGF β 1 stimulierter Zellen zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle. Vergleiche erfolgte bei S2 total und pS2C wie unter (B) beschrieben. Für pS2L wurde aufgrund der verhinderten Linker-Phosphorylierungen in A549^{Lsub}-Zellen ein gepaarter T-Test ($p \leq 0,05$) angewendet. **(D)** Exemplarische Western Blot-Analysen und statistische Auswertung des SMAD3-Gesamtproteins (S3 total) in unstimulierten Zellen (n = 3). Zum Vergleich der mittleren Intensitätswerte (\pm SD) kam ein gepaarter T-Test ($p \leq 0,05$) zur Anwendung. Hinweise: n.d. = Nicht detektiert.

C-terminale Phosphorylierungen steigen nach TGFβ1-Stimulationen in beiden Zelllinien
vergleichbar an

Wie erwartet stieg die C-terminale Phospho-Isoform nach TGFβ1-Stimulationen in beiden Zelltypen signifikant an. Sowohl die Signalintensitäten als auch die Standardabweichungen der gemittelten Werte waren in A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen vergleichbar. Es zeigten sich beim SMAD2-Gesamtprotein keine Veränderungen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Abb. 37, B). Wie zuvor in den anderen Stimulationen blieben in A549L^{sub}-Zellen die Proteinniveaus der Spleißvarianten auch nach TGFβ1-Stimulationen unbeeinflusst bestehen. SMAD2 Linker-Phosphorylierungen in A549L^{sub} blieben weiterhin nicht nachweisbar im Vergleich zu A549^{WT} (Abb. 36, A+B). Nach Normalisierungen der Spleißvarianten zu den entsprechenden Kontrollen bildete sich ein signifikanter S2^{ΔE3}-Anstieg in A549^{WT} ab, wenn die Zellen mit TGFβ1 stimuliert wurden. Bei A549L^{sub} gab es keine Veränderungen im Vergleich zu den Niveaus der Kontrollen. SMAD2 Linker-phosphorylierte S2^{ΔE3}-Niveaus zeigten einen tendenziellen Anstieg in A549^{WT}, das Ergebnis blieb aber nicht signifikant. Für pS2C zeigten sich ebenfalls nach Normalisierungen zu den Kontrollen in beiden Zelllinien keine Unterschiede bei den SMAD2-Spleißvarianten (Abb. 37, A+C). Dies traf ebenfalls für das SMAD3-Gesamtprotein zu, die Proteinniveaus lagen in beiden Zelltypen in vergleichbarer Ausprägung vor (Abb. 37, D).

Insgesamt belegten die Daten einen intakten kanonischen TGFβ-Signalweg in A549L^{sub}-Zellen trotz ausbleibender SMAD2 Linker-Phosphorylierungen. Der zu A549^{WT}-Zellen vergleichbare Anstieg der C-terminalen Phosphorylierung ließ darüber hinaus eine ähnliche Regulationsstärke vermuten. Wie erwartet ergaben sich durch Stimulationen keine signifikanten Unterschiede der SMAD2 Linker-Phosphorylierung in A549^{WT}. Es zeigte sich jedoch ein Anstieg des S2^{ΔE3}-Niveaus, wenn Zellen mit TGFβ1 stimuliert wurden. Um zu untersuchen, ob A549L^{sub}-Zellen TGFβ-Signale unterschiedlich prozessieren, wurden Transkriptomanalysen stimulierter Zellen durchgeführt.

SMAD2 Linker-Phosphorylierungen beeinflussen TGFβ-Signaturen

Die folgenden Analysen dienten dem Vergleich von TGFβ-Signalprozessierungen, wenn SMAD2 Linker-Phosphorylierungen nicht möglich waren. Zu diesem Zweck wurden TGFβ-

Signaturen erstellt, indem die differenziell exprimierten Gene in A549^{WT} und A549L^{sub} nach TGFβ1-Stimulationen zu den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen verglichen wurden. Die erhaltenen Listen wurden daraufhin mittels eines Venn Diagramms auf Überschneidungen untersucht. Der Prozess wurde in der folgenden Abbildung zusammengefasst und die erstellten Signaturen beider Zelllinien für einen Abgleich in Datenbanken verwendet (Abb. 38).

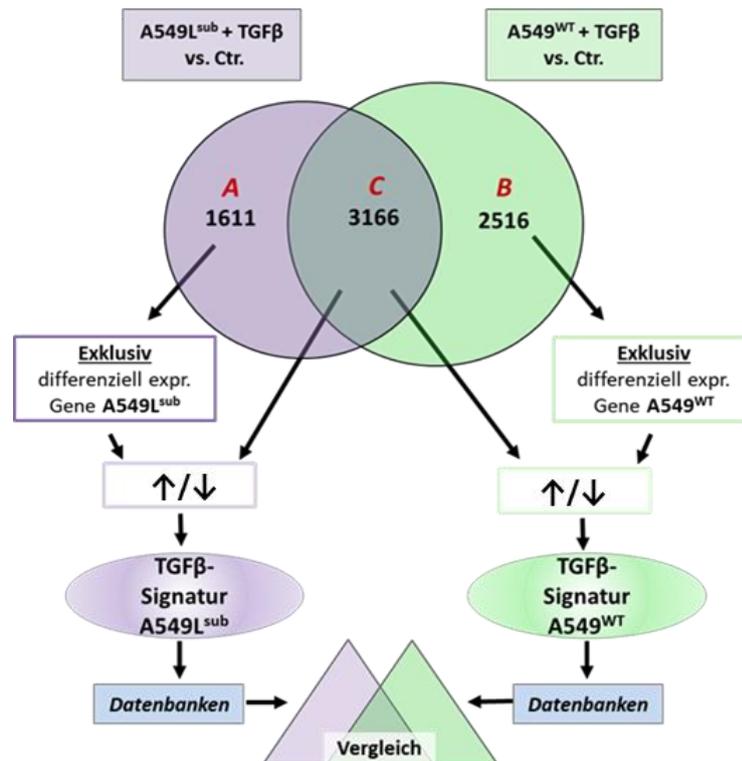


Abb. 39: Transkriptomanalysen TGFβ1-stimulierter A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen zur Erstellung von TGFβ-Signaturen. Signifikant differenziell exprimierte Gene wurden mittels RM *one-way* ANOVA und Tukey's *post-hoc* Test ($p \leq 0,01$) nach einer BH *multiple testing correction* (FDR 0,05) im Vergleich zu den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (Kontr.) ermittelt. Die Expressionsprofile beider Zelltypen wurden zum Vergleich in einem Venn Diagramm überlagert. Die Liste übereinstimmender differenziell regulierter Gene (C) enthielt 312 inverse Regulationen. Die entsprechenden TGFβ-Signaturen wurden wie abgebildet zusammengeführt und für weitere Analysen in Datenbanken verwendet.

Fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen führen zu inversen Genregulationen nach TGFβ1-Stimulationen

Insgesamt wurden nach einer Aktivierung des TGFβ-Signalwegs ≥ 4.700 Gene in A549L^{sub} und ≥ 5600 Gene in A549^{WT} differenziell exprimiert. Davon waren 1611 Gene ausschließlich bei A549L^{sub}- und 2516 Gene bei A549^{WT}-Zellen differenziell reguliert.

Weitere 3166 Gene waren in beiden Zelllinien von differenziellen Regulationen betroffen. Eine detailliertere Analyse der überschneidenden Gene ergab 312 inverse Genregulationen. Davon waren im Vergleich zu den Kontrollen in A549L^{sub} 236 herunterreguliert, die in A549^{WT} hochreguliert vorlagen. Bei weiteren 75 Genen lag der entgegengesetzte Fall vor (Abb. 39, A).

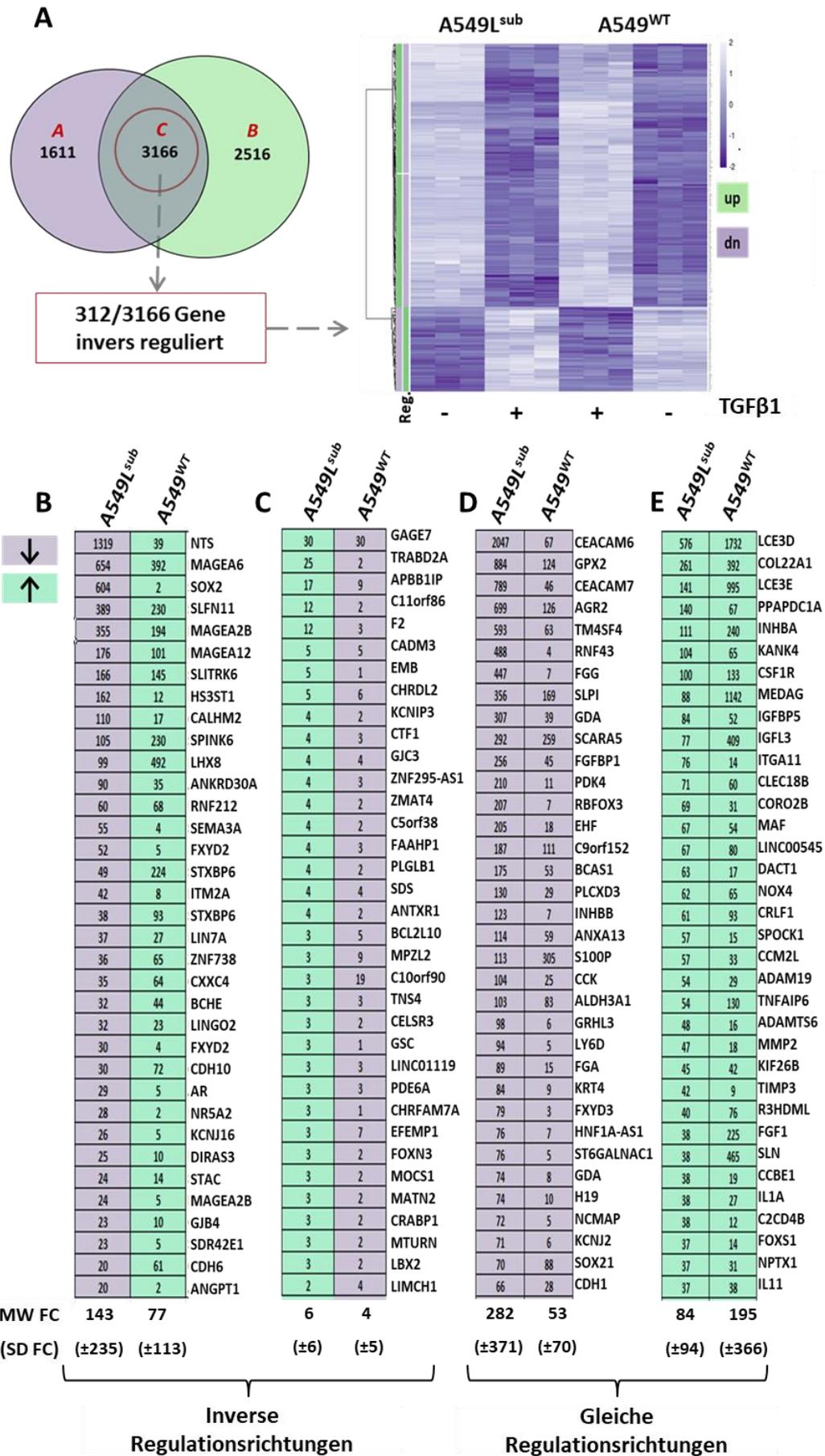


Abb. 40: Differenzielle Genregulationen in TGFβ1 stimulierten A549^{WT} vs. A549L^{sub}-Zellen.
(A) Die Genexpressionsanalysen ergaben in der Überlagerung mittels Venn Diagramm 3166 Gene, die sowohl in der TGFβ-Signatur von A549^{WT} als auch A549L^{sub} im Vergleich zur entsprechenden Lösungsmittelkontrolle signifikant differenziell reguliert waren (vergl. Abb. 39). Davon wurden 312 Gene invers exprimiert und mittels ClustVIS einem hierarchischen Clustering unterzogen. **(B-E)** Abgebildet wurden Auszüge der Genregulationen aus dem Clustering (A) der jeweils 35 am stärksten herauf- und herunterregulierten Gene aus dem Vergleich A549L^{sub}+TGFβ vs. Kontrolle (FC ≥ 1,5). Die korrespondierenden Beobachtungen aus dem Vergleich A549^{WT}+TGFβ vs. Kontrolle wurden gegenübergestellt. Die Regulationsstärken wurden anhand der entsprechenden FC-Werte (abs.) abgebildet (B+C). Gleichermaßen wurde für Gene mit gleichen Regulationsrichtungen verfahren (D+E). Hinweise: MW FC = Mittelwert *fold change*; SD FC = Standardabweichung *fold change*.

Unter den 35 am stärksten herunterregulierten Genen aus dem Vergleich A549L^{sub}+TGFβ vs. Kontrolle befand sich bspw. der Stammzellfaktor *SOX2*, dessen Regulation 604-fach reprimiert war. Im Kontrast dazu zeigte sich nach einer TGFβ-Stimulation in A549^{WT} eine 2-fach höhere *SOX2* Expression im Vergleich zur Kontrolle. Gleiche Beobachtungen konnten bspw. für die Expressionen von *NTS*, *SLFN11* und das LIM/Homeobox-Gen *LHX8* gemacht werden. Darüber hinaus waren auch die Expressionen von *AR* und Cadherine des Typs II (*CDH6* und *-10*) betroffen (Abb. 39, B). Der entgegengesetzte Fall zeigte sich bspw. für *TNS4* mit einer 3-fach höheren Transkription in A549L^{sub}- und einer 3-fach herabgesetzten in A549^{WT}-Zellen. Ebenfalls traf dies bspw. für *GSC*, *ANTXR1* und *EMB* zu (Abb. 39, C). Bei gleichen Regulationsrichtungen war die Regulationsstärke oftmals unterschiedlich ausgeprägt. Dies war u. a. bei *CEACAM6* besonders ausgeprägt. In A549L^{sub} war diese 2047-fach herunterreguliert und A549^{WT} 47-fach. Ähnlich verhielt es sich für *CDH1* (*E-cadherin*), das zu den „EMT Master-Regulatoren“ zählt (Abb. 39, D). Bei den heraufregulierten Genen traten öfter höhere Expressionen in A549^{WT}- im Vergleich zu A549L^{sub}-Zellen auf wie bspw. für *FGF1*, *IGFL3* und *SLN*. Bei A549L^{sub} ergaben sich bspw. höhere Regulationen für *MMP2*, *ADAM9* und *DACT1* im Vergleich zu A549^{WT}, wenn die Zellen mit TGFβ1-stimuliert wurden (Abb. 39, E). Insgesamt zeigten sich stärkere herunter- als heraufregulierte Genen in A549L^{sub} im Vergleich zu A549^{WT}, was anhand der berechneten FC-Mittelwerte deutlich wurde (Abb. 40, B-E). Um zu untersuchen mit welchen Prozessen differenziell regulierte Gene in A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen assoziiert waren, wurden die erstellten Genlisten GO_BP-Anreicherungsanalysen unterzogen (Abb. 40).

Inverse Genregulationen aufgrund fehlender SMAD2 Linker-Phosphorylierungen sind mit Embryonalentwicklung, Differenzierung und Morphogenese assoziiert

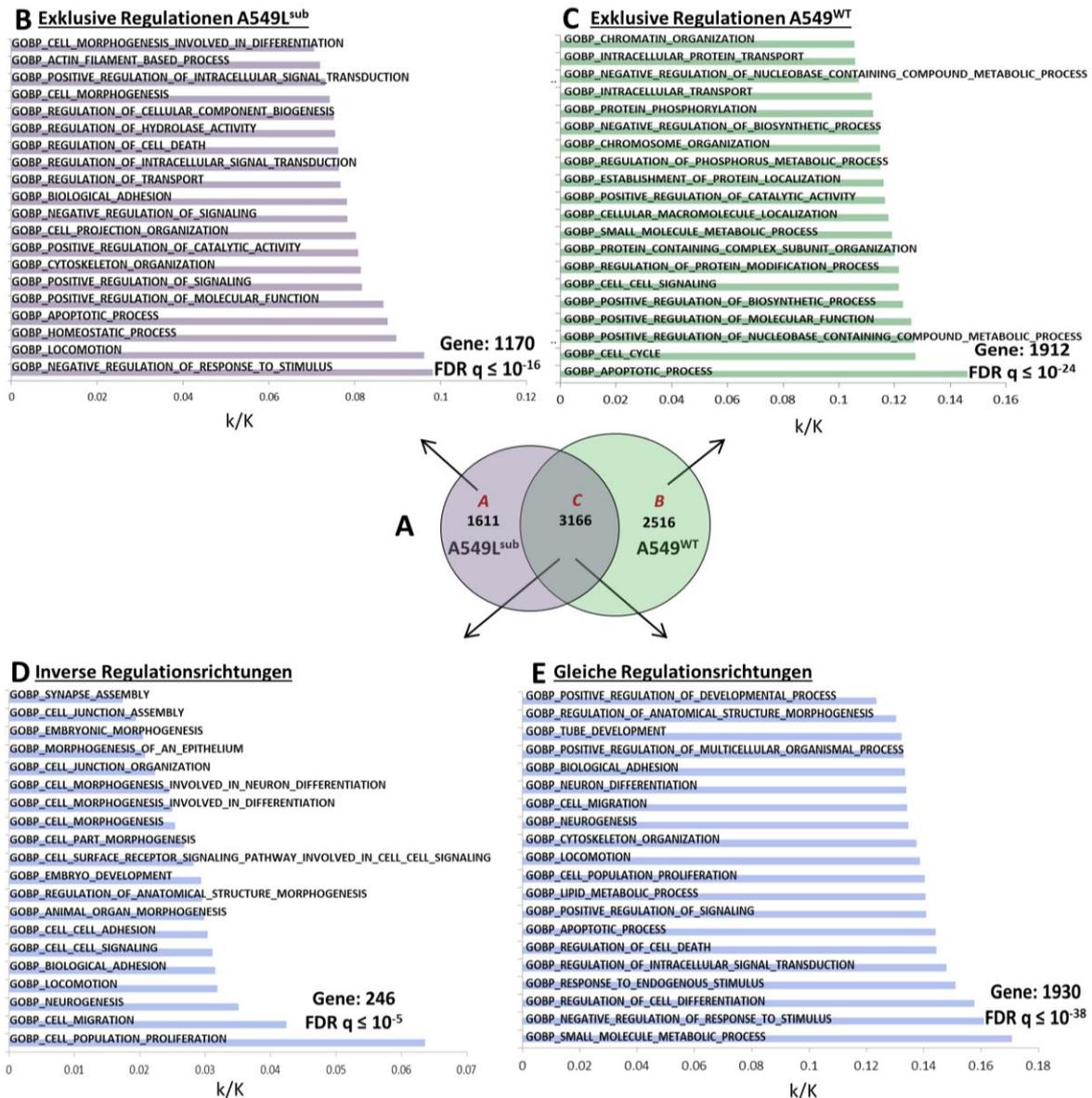


Abb. 41: GO_BP-Analysen TGF β 1-stimulierter A549L^{sub}- vs. A549^{WT}-Zellen. (A) Die exklusiven und übereinstimmenden differentiellen Genregulationen aus den Vergleichen A549L^{sub} +TGF β 1 vs. Kontrolle (violett) sowie A549^{WT} +TGF β 1 vs. Kontrolle (türkis) wurden durch ein Venn Diagramm ermittelt. (B-E) Die aus dem Venn Diagramm erhaltenen Genlisten (A) mit einem FC $\geq 1,5$ wurden mittels der GSEA MSigDB (gsea-msigdb.org) unter Berücksichtigung von GO_BP terms (FDR $\leq 0,05$) analysiert. Es wurden jeweils die „top 20 hits“ herangezogen. Gene der Liste C (A) wurden für inverse und gleiche Genregulationen getrennt voneinander analysiert (D + E) (vergl. Abb. 38). Die entsprechenden signifikant angereicherten GO_BP terms wurden anhand des Quotienten (k/K) sortiert. Hinweise: k = Anzahl signifikant angereicherter GO_BP terms der Analysen; K = Gesamtanzahl annotierter GO_BP terms.

Differenziell exklusiv regulierte Gene nach TGF β 1-Stimulationen in A549L^{sub}- und A549^{WT}-Zellen waren für drei gleiche GO_BP terms signifikant angereichert. Dazu zählten „positive regulation of catalytic activity“, „positive regulation of mollecular function“ und „apoptotic process“. Die weiteren 17 signifikant angereicherten GO_BP terms betrafen

bspw. regulatorische und insbesondere in A549^{WT} metabolische Prozesse. Darüber hinaus waren in A549^{WT} GO_BP terms für „cell cycle“ und „chromatin organization“ signifikant angereichert. In A549L^{sub} fanden sich GO_BP terms wie bspw. „homeostatic process“ und „regulation of cell death“ wieder (Abb. 40, B + C). Die Genlisten mit gleichen und inversen Regulationsrichtungen enthielten nach der Analyse sechs identisch angereicherte GO_BP terms, darunter waren bspw. „locomotion“, „neurogenesis“, „cell migration“ und „cell population proliferation“. Insbesondere bei den signifikant angereicherten GO_BP terms invers regulierter Gene stellten sich überwiegend Prozesse dar, die mit Differenzierung, Morphogenese sowie Embryonalentwicklung assoziiert waren (Abb. 40, D + E).

Die Ergebnisse machten deutlich, dass fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen differenzielle Regulationen diverser Gene nach TGFβ1-Stimulationen zur Folge hatten. Diese deckten sich nur teilweise mit denen von A549^{WT}. Dabei zeigten sich insbesondere bei herunterregulierten Genen in A549L^{sub} deutlich stärkere Effekte im Vergleich zu A549^{WT} anhand gemittelter FC-Werte. Inverse Genregulationen führten zu signifikant angereicherten GO_BP terms, die mit Prozessen der Embryonalentwicklung, Morphogenese und Differenzierung assoziiert waren. Diese zeigten parallelen zu signifikanten GO_BP terms unstimulierter A549^{WT} vs. A549L^{sub}-Zellen (Abb. 34), was für konservierte Mechanismen bei ausbleibenden SMAD2 Linker-Phosphorylierungen spricht. Unter den invers regulierten Genen befand sich bspw. der zentrale Stammzellfaktor SOX2. Insbesondere Genexpressionen von SOX2, OCT4 und MYC spielen eine zentrale Rolle bei Reprogrammierungen somatischer Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) (101) (102). Aufgrund dieser Beobachtungen erfolgte ein Vergleich der TGFβ-Signaturen mit stammzell-assoziierten Genen.

SMAD2 Linker-Phosphorylierungen beeinflussen stammzell-assoziierte Gene

Ein Abgleich von stammzell-assoziierten Genen in den abgeleiteten TGFβ-Signaturen von A549L^{sub}- und A549^{WT}-Zellen erfolgte unter Verwendung der StemChecker Datenbank. Diese gleicht eigene Datensets mit kuratierten Stammzellprofilen ab und gibt die statistische Signifikanz für Stammzelltypen als Radardiagramm aus (Abb. 42).

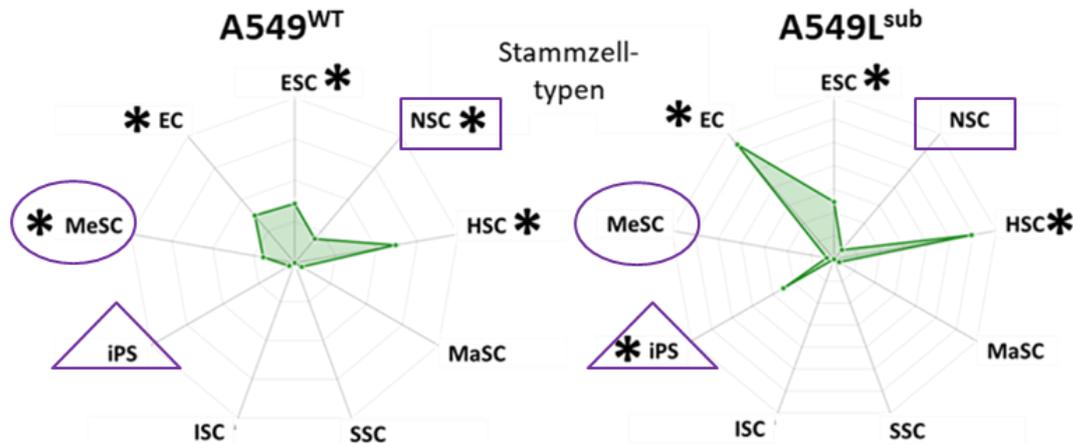


Abb. 42: Stammzell-assoziierte Gene TGF β 1-stimulierter A549L^{sub}- und A549^{WT}-Zellen. Für die Analysen wurde die *web*-basierte StemChecker Datenbank verwendet. Für die Abfragen wurden die erstellten TGF β -Signaturen von A549^{WT} (li.) und A549L^{sub} (re.) verwendet (vergl. Abb. 39). Dargestellt wurden die signifikanten (*) Anreicherungen verschiedener Stammzelltypen. Signifikanzprüfungen erfolgten mittels hypergeometrischer Tests in Relation zur entsprechenden *Input*-Genliste. Signifikant angereicherte Zielstrukturen entsprechender Stammzelltypen wurden als Radardiagramme ausgegeben (p-Werte; -log). Unterschiede zwischen den Zelllinien wurden durch violette Symbole hervorgehoben. Hinweise: EC = *embryonal carcinoma*; ESC = *embryonic stem cells*; NSC = *Neural stem cells*; HSC = *Hematopoetic stem cells*; MaSC = *Mammary stem cells*; SSC = *Spermatogonial stem cells*; ISC = *Intestinal stem cells*; iPS = *Induced pluripotent stem cells*; MeSC = *Mesenchymal stem cells*.

Insgesamt setzen sich die TGF β -Signaturen bei A549^{WT} aus 5682 und bei A549L^{sub} aus 4777 Genen zusammen. In der TGF β -Signatur von A549^{WT}-Zellen zeigten sich signifikante Anreicherungen für die Gensets *embryonal carcinoma* (EC), *embryonic stem cells* (ESC), *neural stem cells* (NSC), *hematopoetic stem cells* (HSC) und *mesenchymal stem cells* (MeSC). Die TGF β -Signatur von A549L^{sub} war ebenfalls signifikant angereichert für EC, ESC, HSC und im Gegensatz zu A549^{WT} für iPS. Hingegen wurden keine signifikanten Anreicherungen für NSC oder MeSC analysiert (Abb. 47).

Aus den vorliegenden Ergebnissen ergaben sich signifikante Unterschiede in den Anreicherungen stammzell-assoziiierter Gene nach TGF β 1-Stimulationen in A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen. Dabei stellte sich im Gegensatz zu A549^{WT} bspw. kein signifikantes Ergebnis für neuronale Stammzellen in A549L^{sub}-Zellen dar, entgegengesetzt war dies für iPS der Fall. Für eine genauere Betrachtung wurden die jeweiligen TGF β -Signaturen unter Beachtung der Regulationsrichtungen differenziell exprimierter Gene mit stammzell-assoziierten Genlisten abgeglichen.

TGF β -Signaturen von A549L^{sub} und A549^{WT} beinhalten exklusive Regulationen stammzell-assoziierter Gene

Für einen Vergleich der TGF β -Signaturen von A549L^{sub} vs. A549^{WT} wurden drei Listen mit stammzell-assoziierten Genen via GSEA MSigDB bezogen und fusioniert. Die Analysen erfolgten unter Berücksichtigung der Regulationsrichtungen mittels Venn Diagramme, um mögliche übereinstimmende und exklusive Genregulationen in beiden Zelltypen zu ermitteln (Abb. 43).

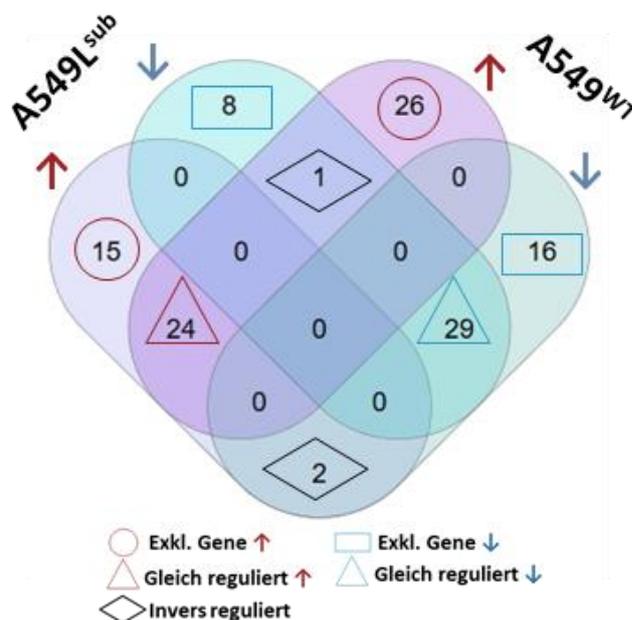


Abb. 43: Venn Diagramm stammzell-assoziiierter Genregulationen TGF β -stimulierter A549L^{sub}- vs. A549^{WT}-Zellen. Die stammzell-assoziierten Genlisten wurden über GSEA MSigDB bezogen und fusioniert. Die nach Regulationsrichtungen getrennt analysierten Gene in den TGF β -Signaturen von A549L^{sub} und A549^{WT} wurden in Venn Diagrammen überlagert. Das abgebildete Venn Diagramm gibt Aufschluss über gleiche und exklusive stammzell-assoziierte Genregulationen in A549^{WT} und A549L^{sub}.

Insgesamt waren in A549L^{sub}-Zellen 41 stammzell-assoziierte Gene herauf- und 38 herunterreguliert. In A549^{WT}-Zellen waren hingegen 51 herauf- und 47 herunterregulierte Genexpressionen feststellbar. Davon waren 15 herauf- und 8 herunterregulierte Gene exklusiv in A549L^{sub} zu finden, die in A549^{WT} nicht vorkamen. Bei den heraufregulierten Genen handelte es sich bspw. um *POU5F1 (OCT4)*, *HDAC2* und *IMPDH2*. Bei A549^{WT} war dies für 26 herauf- und 16 herunterregulierte Gene der Fall. Unter den Genen mit einer höheren Expression waren bspw. *RCC2*, *FHL1* und *IGF2BP2*. Die Gene *CRABP1* und *NIFK* hatten eine höhere Expression in TGF β -stimulierten A549L^{sub}-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Diese traten ebenfalls in stimulierten A549^{WT}-Zellen auf, waren aber im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert. Der entgegengesetzte Fall trat für *LIMA1* auf, die Expression war in A549^{WT} herauf- und in A549L^{sub} herunterreguliert (Abb. 43).

Differenziell exprimierte stammzell-assoziierte Gene in A549L^{sub}-Zellen haben einen negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben bei ADC-Patienten

Ob und welchen Einfluss die jeweils exklusiv differenziell exprimierten stammzell-assoziierten Gene (Abb. 43) auf das Gesamtüberleben in ADC- und SQC-Patienten hatten, wurde *in silico* unter Verwendung der GEPIA2 Datenbank anhand von Kaplan-Meier Kurven analysiert (Abb. 44).

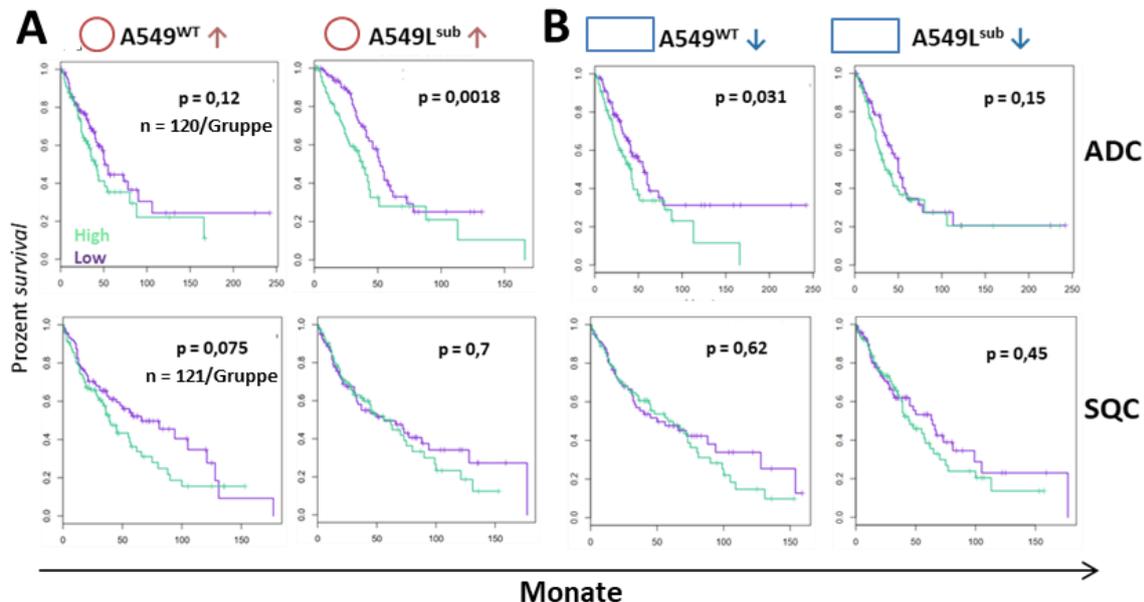


Abb. 44: Einfluss differenziell regulierter stammzell-assoziierten Gene TGFβ-stimulierter A549L^{sub}- und A549^{WT}-Zellen auf das Gesamtüberleben in ADC- und SQC-Kohorten. Die exklusiven herauf (A)- und herunterregulierten (B) stammzell-assoziierten Gene TGFβ1-stimulierter A549L^{sub}- und A549^{WT}-Zellen (Symbole vergl. Abb. 43) wurden auf einen Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten untersucht. Die NSCLC-Entitäten ADC (oben) und SQC (unten) wurden separat berücksichtigt. Die *high*- und *low*-Gruppen wurden anhand des 75. Quartils getrennt. Ergebnisse der Log-Rank-Tests wurden mit $p \leq 0,05$ als signifikant bewertet. Die *in silico* Analysen erfolgten *web*-basiert unter Verwendung der GEPIA2 Datenbank.

In der SQC- und ADC-Kohorte zeigte sich eine Auftrennung der Kurven des exklusiv hochregulierten Gensets in A549^{WT}-Zellen erkennen, die ab etwa 30 Monaten einsetzte und sich bei 130 Monaten wieder annäherten, wobei diese stärker bei SQCs ausgeprägt war. Insgesamt blieben beide Ergebnisse jedoch nicht signifikant (Abb. 44, A; li.). Hingegen beeinflussten die heraufregulierten stammzell-assoziierten Gene von A549L^{sub} das Gesamtüberleben von ADC-Patienten signifikant negativ. Insbesondere in den ersten Monaten (0-30) zeigte sich eine deutlichere Auftrennung der *high*- und *low*-Gruppe. Bei SQCs blieb ein signifikanter Einfluss aus (Abb. 44, A; re.). Für exklusiv herunterregulierte Gene in A549^{WT} und A549L^{sub} waren weder in ADCs noch in SQCs signifikante Einflüsse

feststellbar. In ADCs deutete sich lediglich ein tendenziell besser Verlauf herunterregulierter stammzell-assoziiertes Gene beider Zelltypen an (Abb. 44, B).

Zusammengenommen machten die Analysen deutlich, dass fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen TGF β -Liganden Prozessierungen beeinflussen, obwohl Linker-Domänen keine direkten Substrate von T β R-Komplexen darstellen. Dies äußerte sich innerhalb der TGF β -Signaturen in Form inverser Genregulationen, unterschiedlicher Regulationsstärken bei herunterregulierten Genen und exklusiven Expressionen stammzell-assoziiertes Gene. Letztere in A549L^{sub}-Zellen zeigten zudem *in silico* einen signifikant negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben von ADC-Patienten. Hingegen ergaben sich keine Einflüsse auf das Patientenüberleben bei SQCs. Dies stand wiederum in Einklang mit den Beobachtungen der eingangs durchgeführten *in silico* Analysen von SMAD2-Gesamtexpression, die ebenfalls keinen Einfluss in SQC-Patienten zeigte (Abb. 8).

4. Diskussion

Durch vorangegangene Studien unserer Arbeitsgruppe wurde die zentrale Stellung des TGF β -Signalwegs in NSCLCs u. a. anhand hoher Frequenzen C-terminaler SMAD2,-3-Phosphorylierungen (1) und deren Modulierbarkeit durch Pirfenidon gezeigt (30). Regulationen von R-SMADs sind jedoch nicht auf rezeptorvermittelte C-terminale Phosphorylierungen beschränkt, sondern werden maßgeblich von intrazellulären Kinasen anderer Signalkaskaden wie bspw. MAPK beeinflusst, die spezifisch R-SMAD Linker-Domänen phosphorylieren (5) (35). In der vorliegenden Arbeit wurden daher erstmals die Einflüsse von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen in NSCLC-Geweben und -Zelllinien analysiert. Neben Untersuchungen zum Gesamtüberleben wurden ebenfalls phospho-SMAD2-Linker abhängige Prozesse im NSCLC-Kontext spezifiziert. Zu diesem Zweck erfolgte zunächst die Erfassung von Abundanzen des SMAD2-Gesamtproteins und Phospho-Isoformen in fünf NSCLC-Zelllinien. Ergänzend wurden Primärzellen in Form von AECII aus tumorfreien Lungengeweben und T-Zellen gesunder Spender mit NSCLC-Zellen verglichen. Dabei wurden grundlegende Unterschiede bei den SMAD2-Spleißvarianten und Phospho-Isoformen festgestellt. Darüber hinaus war insbesondere eine Assoziation von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen mit dem Zellzyklus nachweisbar. Dies zeigte sich ebenfalls durch eine Modulierbarkeit von SMAD2-Spleißvarianten und Linker-Phosphorylierungen mittels zugelassener Medikamente wie bspw. Palbociclib (CDK4/6-Inhibitor) und Pirfenidon, die bei Brustkrebs bzw. einer idopathischen pulmonalen Fibrose Anwendung finden. Abschließend ermöglichte die Etablierung einer A549-Zelllinie mit konstitutiv fehlenden SMAD2 Linker-Phosphorylierungen (A549L^{sub}) eine Charakterisierung phospho-SMAD2-Linker-abhängiger Einflüsse auf zelluläre Prozesse und Zielstrukturen. Außerdem zeigten die Ergebnisse, dass TGF β -abhängige Genregulationen in NSCLCs maßgeblich durch SMAD2-Linker-Phosphorylierungen beeinflusst werden und fehlende pS2L-Ereignisse darüber hinaus zu inversen Genregulationen führten. Gezielte Modulationen von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen und der kurzen Spleißvariante könnten einen neuen Ansatz für die Krebstherapie bieten.

4.1 SMAD2-Spleißvarianten und Phospho-Isoformen in NSCLC- und Primärzellen

In allen fünf getesteten NSCLC-Zelllinien waren beide SMAD2-Spleißvarianten nachweisbar und sowohl innerhalb der Linker-Domäne als auch am C-terminalen Motiv phosphoryliert.

Darüber hinaus war $S2^{FL}$ in allen Zelltypen die vorherrschende Spleißvariante des Gesamtproteins. Hingegen überwog keine Spleißvariante bei den Phospho-Isoformen, trotz einer grundsätzlich höheren $S2^{FL}$ -Abundanz. Im Hinblick auf die SMAD2 Linker-Substitution wurden die Ergebnisse von A549^{WT}-Zellen zu AECII aus tumorfreien Lungengeweben verglichen. Im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen zeigten sich nahezu gleiche Verhältnisse der Spleißvarianten und Linker Phospho-Isoform. Hingegen traten bei C-terminalen Phosphorylierungen signifikante Unterschiede auf. Letztere ergaben sich jedoch nur bei $S2^{FL}$, wobei ein höheres Niveau in AECII im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen vorlag. Dies ließ wiederum auf eine höhere Frequenz von TGF β -Signalen via $S2^{FL}$ schließen und wurde bereits zuvor an NSCLC-Gewebe mittels IHC gezeigt (1). Ein höheres Transkriptionsniveau von $S2^{FL}$ wurde darüber hinaus auch mittels RT-PCR in A549^{WT} verifiziert. Damit übereinstimmend waren Untersuchungen in den humanen Zelllinien HaCaT, MOLT-4, HEL und U937, wobei $S2^{\Delta E3}$ -Transkriptniveaus in HaCaT- und MOLT-4-Zellen vergleichsweise höher vorlagen (17). Gleiches konnte für $S2^{FL}$ - und $S2^{\Delta E3}$ -Expressionen in adulten und embryonalen Mausgeweben mittels einer Rekombinase-Polymerase-Amplifikation nachgewiesen werden. Darüber hinaus stellten Western Blot-Analysen heraus, dass in Wildtyp T-Lymphozyten ein vergleichbares Niveau C-terminaler Phosphorylierungen an beiden SMAD2-Spleißvarianten vorlag. Hingegen zeigten extrahierte B-Lymphozyten der Milz und HepG2-Zellen kaum detektierbare pS2C-Banden des kürzeren SMAD2-Proteins. Nach Stimulationen mit humanen TGF β 1 wiesen alle Zelltypen eine deutlich höhere C-terminale Phosphorylierung am $S2^{FL}$ auf (15). Dies war vorliegend bei A549^{WT}-Zellen nicht gegeben. Es zeigten sich vergleichbare Zunahmen der C-terminalen Phosphorylierung an beiden SMAD2-Spleißvarianten nach Stimulationen mit TGF β 1. Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass nicht nur die alleinige Signalfrequenz von Bedeutung ist, sondern ebenfalls an welcher Spleißvariante Phosphorylierungen erfolgen. Unterstützt wurde diese Vermutung von der Tatsache, dass in peripheren T-Zellen gesunder Spender $S2^{FL}$ - aber keine $S2^{\Delta E3}$ -Niveaus nachweisbar waren. Dies ließ vermuten, dass SMAD2-Spleißvarianten mit dem zellulären Differenzierungsstatus sowie einem benignen und malignen Zell-Kontext in Zusammenhang stehen.

SMAD2-Spleißvarianten und Linker-Phosphorylierungen stehen mit zellulären Differenzierungsprozessen in Zusammenhang

T-Zellen entwickeln sich aus dem mesodermalen Keimblatt, während das respiratorische Epithel dem Entoderm entstammt (103). Dass der TGF β -Signalweg in T-Zellen relevant ist, wurde bereits durch Studien in Mäusen gezeigt. Ein gleichzeitiger embryonaler *SMAD2,-3* Knockout in T-Zellen führte neben phänotypischen Veränderungen postnatal nach etwa 4 Wochen zu letalen Entzündungen (104). Dies wurde ebenfalls in Mäusen gezeigt, die ein *Smad3*^{-/-}-Genom-Hintergrund aufwiesen. Dementsprechend führten mutierte Immun- und T-Zellen zu Thymusinsuffizienz, vergrößerten Lymphknoten und bakteriellen Abszessen, was in chronischen, letal verlaufenden Entzündungen resultierte und die zentrale Funktion des TGF β -Signalwegs bei Immunantworten verdeutlichte (105).

Die Beobachtung, dass in T-Zellen lediglich S2^{FL} vorlag stand in Einklang mit Untersuchungen in murinen naiven CD4⁺ T-Zellen, in denen keine S2 ^{Δ E3}-Expression nachweisbar war. Die Forschenden schlussfolgerten daraus, dass S2 ^{Δ E3} für Funktionen von CD4⁺ T-Zellen wahrscheinlich unerheblich sei (106). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von humanen MOLT4-Zellen (CD3⁻/CD4⁺/CD8⁺ T-Lymphoblasten, akute lymphoblastische Leukämie (ALL) (107)), in denen beide *SMAD2*-Transkriptvarianten nachweisbar waren (17). Interessanterweise wurde anhand extrahierter T-Lymphozyten aus Thymusgeweben geschlechtsreifer Mäuse gezeigt, dass beide *SMAD2*-Spleißvarianten C-terminal phosphoryliert waren (15). Dies bedeutet, dass grundsätzlich S2^{FL} und S2 ^{Δ E3} in T-Zellen translatiert werden, wenn diese Thymus-assoziiert vorliegen (Thymocyten). S2 ^{Δ E3} scheint daher mit prä-T-Zell-Stadien und malignen T-Zellen (z. B. ALL) im Zusammenhang zu stehen bzw. eine erforderliche Zielstruktur für maligne Zelltransformationen darzustellen.

Darüber hinaus blieben in nicht-aktivierten T-Zellen *SMAD2* Linker-Phosphorylierungen aus. Nach CD3/CD28-Aktivierungen, die T-Zellen ebenfalls zur Proliferation anregen, war pS2L nachweisbar, während S2 ^{Δ E3}-Niveaus weiterhin abwesend blieben. Gegensätzlich zeigte sich dies für C-terminale Phosphorylierungen und das *SMAD2*-Gesamtprotein insoweit, dass diese lediglich nach Aktivierungen zunahmen (3.6). Weitere Studien in Mäusen ergaben, dass *SMAD2* und -3 in T-Zellen im engen Zusammenhang mit *in situ* Differenzierungen stehen. Insbesondere interagieren *SMAD2* Linker-Phosphorylierungen am Serin 255 mit STAT3, um eine Differenzierung zu Interleukin 17 (IL17) produzierenden T-Helferzellen (TH₁₇) zu bewirken. Dabei wurde ebenfalls festgestellt, dass *SMAD3* trotz

fehlender C-terminaler Phosphorylierungen in der Lage ist mit STAT3 zusammenzuwirken. Dies führt zu einem gegenteiligen Effekt und einer verminderten *IL17a*-Expression (106) (108). Insbesondere IL17 Sezernierungen von T-Helferzellen sind in NSCLCs mit erhöhter Migration und Invasion via des STAT3/NF- κ B/NOTCH1-Signalwegs assoziiert (109). Darüber hinaus wurde kürzlich in NSCLCs durch Marwitz *et al.* gezeigt, dass FOXP3⁺ T-Zellen, die C-terminal phosphoryliertes SMAD3 (pS3C) aufweisen, in direkter Nähe von CD8⁺ T-Zellen mit dem Gesamt- und krankheitsfreien Überleben in Zusammenhang stehen. Hier zeigte sich, dass eine höhere Anzahl FOXP3⁺/pS3C⁺-T-Zellen einen signifikant negativen Einfluss auf das OS und DSF haben (3).

Darüber hinaus wurde in murinen und humanen T-Zellen nachgewiesen, dass *T β RI*-Expressionen über T-Zell-Rezeptoren (**t cell receptor**; **TCR**) reguliert werden und den Aktivierungszustand dieser beeinflussen. Dabei halten TGF β -Signale die Quieszenz aufrecht. Hingegen führen starke TCR-Stimuli zu einer herabgesetzten *T β RI*-Expression und unterbinden infolgedessen den TGF β -Signalweg (110). Folglich haben hohe TGF β -Konzentrationen eine immunsuppressive Wirkung und fördern *in situ* Umwandlungen von Effektor T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen durch *FOXP3*-Expressionen. Tumorzellen sind darüber hinaus in der Lage TGF β autokrin zu sezernieren (111) (112). Den Ergebnissen zur Folge könnten sich hohe TGF β -Konzentrationen innerhalb des Tumors ebenfalls auf SMAD2-Spleißvarianten von Tumorzellen auswirken und höhere S2 ^{Δ E3}-Niveaus zur Folge haben, wie es sich nach TGF β 1-Stimulationen in A549^{WT}-Zellen darstellte (3.9) (Abb. 45). Ob dies ebenfalls in T-Zellen der Fall ist und möglicherweise Umwandlungen in regulatorische T-Zellen fördert bleibt zu überprüfen.

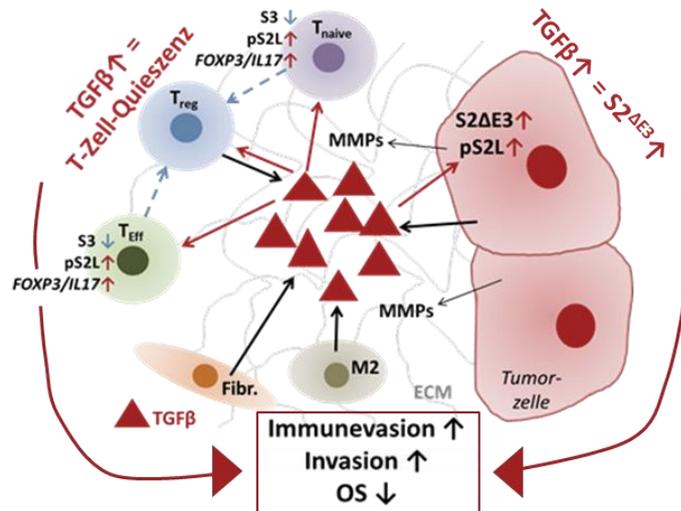


Abb. 45: Hypothese: Einfluss hoher TGFβ-Konzentrationen auf Tumor- und T-Zellen in NSCLCs. Die schematische Abbildung zeigt einen möglichen Einfluss hoher TGFβ-Konzentrationen innerhalb des Tumors auf S2^{ΔE3}-Niveaus in Tumorzellen. Darüber hinaus halten hohe TGFβ-Signale die Quieszenz von T-Zellen aufrecht. Hohe pS2L-Niveaus könnten zudem eine Umwandlung infiltrierender Effektor- und naiver T-Zellen zu regulatorischen IL17-produzierenden T-Zellen durch eine FOXP3-Expression bewirken (blaue Pfeile). Dadurch könnte eine Immunevasion und Invasion von Tumorzellen begünstigt werden und sich negativ auf das Gesamtüberleben (OS) von NSCLC-Patienten auswirken. Hinweise: T_{naive} = Naive T-Zellen; T_{reg} = Regulatorische T-Zellen; T_{Eff} = Effektor T-Zellen; Fibr. = Fibroblasten; M2 = Makrophagen; ECM = Extracellular matrix; MMPs = Matrix-Metalloproteasen; S2^{ΔE3} = SMAD2 'delta Exon 3'; S3 = SMAD3; IL17 = Interleukin 17; FOXP3 = Forkhead box protein p3.

Deutlich wurde jedoch durch CD3/CD28-Stimulationen von T-Zellen gesunder Spender, dass SMAD2 Linker-Phosphorylierungen mit Proliferation und T-Zell-Aktivierung assoziiert sind. SMAD2 Linker-Phosphorylierungen am Serin 255 (pS2L_S255) scheinen daher *in situ* Differenzierungen in Abhängigkeit von STAT3 und des phospho-Status von SMAD3 zu beeinflussen. Somit wirkt eine hohe TGFβ-Signalwegsaktivität womöglich unphosphorylierten SMAD3 entgegen, was eine FOXP3-Expression und IL17-Sezernierung fördert und zur Aufrechterhaltung Tumor-assoziiertes regulatorischer T-Zellen in NSCLCs beitragen würde. Daher sollte ebenfalls untersucht werden, wie sich fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen auf diese Prozesse in T-Zellen auswirken. Eine gezielte Inhibierung von pS2L_S255 könnte somit TH₁₇ *in situ* Differenzierungen erschweren bzw. verhindern.

Insgesamt lieferten die Primärzelldaten neue Erkenntnisse und legten nahe, dass sowohl SMAD2-Spleißvarianten als auch Linker-Phosphorylierungen in einem zellspezifischen

Kontext stehen und mit dem zellulären Differenzierungspotenzial und -status assoziiert sind. Da AECII u. a. alveoläre Vorläuferzellen von AECI sind (113), scheint eine Aufrechterhaltung des $S2^{\Delta E3}$ -Niveaus für einen noch nicht vollständig differenzierten Zelltyp zu sprechen. Verstärkt wurden diese Annahmen durch Analysen differenzieller Zielstrukturen nach einer konstitutiven Unterbindung von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen in A549-Zellen (A549L^{sub}), die im Vergleich zu Wildtyp-Zellen bspw. signifikante Anreicherungen für GO_BP-terms mit Differenzierungsprozessen ergaben (3.8; 3.9). Darüber hinaus lagen in A549L^{sub}-Zellen signifikant höhere $S2^{\Delta E3}$ -Niveaus vor (3.5). Ergänzend wurde dies ebenfalls von der Tatsache unterstützt, dass in benignen, peripheren T-Zellen ausschließlich $S2^{FL}$ nachweisbar war. Anscheinend wird das Differenzierungspotenzial von T-Zellen nach der Thymopoese und Entlassung in die Blutbahn durch fehlende $S2^{\Delta E3}$ -Niveaus beschränkt. Darauf verweisen ebenfalls die Beobachtungen in T-Zell-Lymphomen in denen beide Spleißvarianten exprimiert wurden (17), wobei sich diese aus Lymphoblasten und somit Vorläuferzellen entwickeln. Ähnliches wird in Bezug auf ADCs diskutiert und angenommen, dass diese aus AECII entstehen, wobei es sich ebenfalls um einen nicht vollständig differenzierten Zelltyp handelt und AECII eine hohe Plastizität aufweisen (114).

Die Ergebnisse ließen vermuten, dass $S2^{\Delta E3}$ mit einem malignen Zell-Kontext assoziiert ist bzw. eine erforderliche Zielstruktur für maligne Zelltransformationen darstellt. Des Weiteren wurde eine isolierte Betrachtung von SMAD2-Spleißvarianten in AECI bisher nicht vorgenommen. Daher könnten *in vitro* induzierte AECII-Differenzierungen zu AECI einen Ansatz für weitere Untersuchungen darstellen, um die Vermutungen zu verifizieren, dass $S2^{\Delta E3}$ in voll ausdifferenzierten AECI nicht länger exprimiert bzw. translatiert wird. Ergänzend könnten T-Zell-Analysen von NSCLC- und Leukämie Patienten Aufschluss über mögliche Unterschiede zu gesunden Probanden geben. Dabei sollten ebenfalls Untersuchungen von Progenitor- und Tumor-assoziierten T-Zellen sowie bspw. adulter und embryonaler Mausegewebe eingeschlossen werden. Dies könnte entscheidende Erkenntnisse darüber liefern, inwieweit $S2^{\Delta E3}$ mit dem zellulären Differenzierungspotenzial in Zusammenhang steht. Ferner könnten T-Zellen gesunder Spender zur Aufklärung von Mechanismen beitragen, die es Zellen ermöglichen Expressionen bzw. Translationen der kurzen SMAD2-Spleißvariante zu unterbinden. Ergänzend wiesen die Analysen ebenfalls

darauf hin, dass SMAD2-Phosphorylierungen an sich und in Abhängigkeit der jeweiligen SMAD2-Spleißvariante mit unterschiedlichen Prozessen assoziiert sind. Durch benigne T-Zell-Analysen wurde ferner deutlich, dass grundsätzlich im Ruhezustand (G0-Phase) keine SMAD2 Linker-Phosphorylierungen erfolgen, wodurch eine pS2L-Assoziation mit T-Zell-Aktivierung und Proliferation deutlich wurde. Hier scheint insbesondere pS2L_S255 im Zusammenspiel mit STAT3 und in Abhängigkeit des SMAD3 Phosphorylierungsstatus zu *in situ* Differenzierungen von TH₁₇ beizutragen (3) (104), die mit Invasion und Migration in NSCLCs assoziiert sind (109).

Eine hohe Anzahl pS2L-positiver Tumor- und Immunzellen wirkt sich negativ auf das Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten aus

Die angestellten Vermutungen wurden ebenfalls durch Ergebnisse der mIHC-Analysen unterstützt. Die untersuchte NSCLC-Kohorte machte deutlich, dass eine hohe Anzahl pS2L-positiver Zellen das Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten negativ beeinflusste. Insbesondere eine hohe Anzahl pS2L-positiver tumorinfiltrierender-Immunzellen zeigte einen negativen Einfluss auf die Überlebenszeit, wenn diese am Tumorrand auftraten. Wie die Untersuchungen CD3/CD28-aktivierter T-Zellen gesunder Spender zeigten, sind SMAD2-Linker-Phosphorylierungen mit T-Zell-Aktivierungen und Proliferation assoziiert (3.6). Dies schien in anbeacht einer fördernden pS2L_S255/STAT3-Interaktion und *in situ* TH₁₇-Differenzierungen (104) plausibel, da ein Wachstum des Tumors durch eine Gewebeinvasion innerhalb in der vitalen Randregion zu vermuten ist, wobei IL17 diese in NSCLCs fördert (109). Im Vergleich zu den Tumorarealen zeigten die Untersuchungen im Stroma eine geringere Anzahl pS2L-positiver Immunzellen. Wenn jedoch eine hohe Anzahl auftrat, war der negative Einfluss auf das Gesamtüberleben stärker ausgeprägt. Dabei war es irrelevant, ob diese Beobachtungen im Stroma des Zentrums oder der Randregion gemacht wurden. Tumor-assoziierten Immunzellen werden zentrale Rollen bei Immunevasion und Metastasierung zugeschrieben (115) indem sie die Tumormikroumgebung durch Sekretionen von Cytokinen und Proteasen beeinflussen (116) (117). Dies ist bspw. für Tumor-assoziierte Makrophagen bekannt, die Tumorzellen während der Progression vor antitumoralen Immunantworten schützen und als M2-Makrophagen bezeichnet werden. M2-Makrophagen sind bspw. in der Lage TGFβ1 zu

sezernieren, um der Cytotoxizität von natürlichen Killerzellen entgegenzuwirken (118) (119) (Abb. 44).

Die Untersuchungen zeigten, dass bei NSCLCs nicht nur *in silico* analysierte SMAD2-Gesamtexpressionen entscheidend sind, sondern auch posttranslationale Modifikationen wie SMAD2-Linker-Phosphorylierungen einen signifikanten Einfluss auf den Krankheitsverlauf und Tumorprogression haben. Eine erneute und getrennte Analyse beider NSCLC-Entitäten (ADC + SQC) erscheint sinnvoll, da lediglich hohe SMAD2-Expressionen in ADCs einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben hatten.

4.2. SMAD2 und Phospho-Isoformen in der Proliferation von NSCLC-Zellen

Es ist lange bekannt, dass Krebszellen bestimmte Schlüsselmerkmale erlangen und eine abnormal gesteigerte Proliferation und Immortalisierung zentrale Kennzeichen sind (10) (120). Darüber hinaus wurden R-SMAD Linker-Phosphorylierungen in anderen humanen Karzinomen wie dem Kolorektalen- und Leberzellkarzinom mit dem Zellwachstum in Zusammenhang gebracht (12) (42). Daher wurden in NSCLC-Zelllinien detaillierte zellzyklusabhängige Untersuchungen von SMAD2-Zielstrukturen im Zusammenhang mit dem Zellzyklus durchgeführt.

SMAD2 und Phospho-Isoformen unterliegen dynamischen Veränderungen während des Zellzyklus

Dass sich sowohl SMAD2 als auch die Phospho-Isoformen während der Zellteilung dynamisch verändern, wurde durch DFZ-Analysen in fünf verschiedenen NSCLC-Zelllinien nachgewiesen. Dabei zeigten die Untersuchungen einen Anstieg des SMAD2-Gesamtproteins und der C-terminalen Phosphorylierung von etwa 60 %, wenn Zellen von der G0/G1- zur G2/M-Phase verglichen wurden. Im Kontrast dazu ergab sich für SMAD2 Linker-Phosphorylierungen ein Anstieg von der G0/G1- zur G2/M-Phase von etwa 140 % (Abb. 46, A). Der höhere Gesamtanstieg der pS2L-Signalintensitäten resultierte aus einer Subpopulation innerhalb der G2/M-Phase, in denen vielfach höhere SMAD2 Linker-Phosphorylierungen vorlagen (pS2L⁺) (Abb. 46, B).

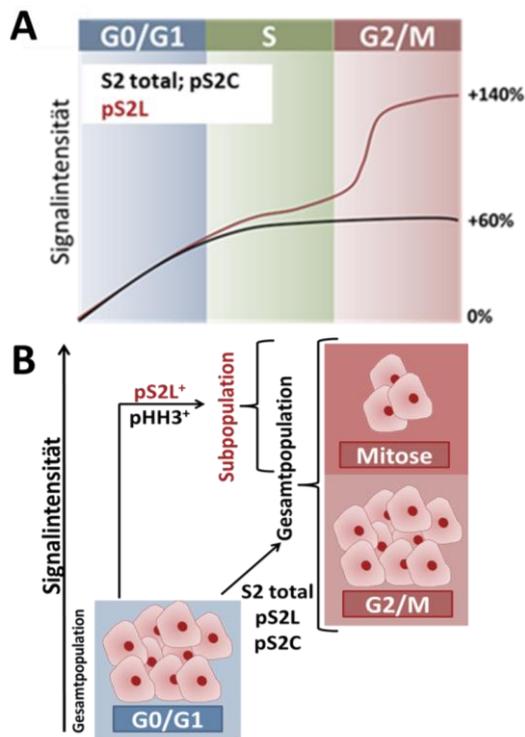


Abb. 46: Zunahmen von SMAD2- und Phospho-Isoformen von der G0/G1- zur G2/M-Phase in NSCLC-Zelllinien. Die schematischen und vereinfachten Abbildungen zeigen zusammenfassend: **(A)** Die Zunahmen des SMAD2-Gesamtproteins und Phospho-Isoformen in den Zellzyklusphasen. **(B)** Subpopulationen von NSCLC-Zellen innerhalb der G2/M-Phase, die lediglich für SMAD2 Linker-Phosphorylierungen auftrat. Die Zellen zeigten ein vielfach höheres pS2L-Signal (pS2L⁺) und waren positiv für den Mitose-Marker phospho-Histon H3 (pHH3⁺).

Weiterführende Analysen durch Doppelfärbungen machten deutlich, dass es sich in allen NSCLC-Zelllinien bei pS2L⁺-Subpopulationen um mitotische pHH3⁺-Zellen handelte. Die Ergebnisse wurden in A549^{WT}-Zellen durch IFM-Analysen verifiziert. Darüber hinaus zeigten die Untersuchungen, dass SMAD2 Linker-Phosphorylierungen während der Interphase nukleär lokalisiert waren und als distinkte punktuelle Strukturen vorlagen. Im Kontrast dazu stellten sich auch hier innerhalb der Mitose-Phasen vielfach höhere SMAD2 Linker-Phosphorylierungen dar, insbesondere wenn sich die Zellen in der Meta- und Anaphase befanden. Diese erinnerten strukturell an die mitotische Spindel und Lokalisationen von Centrosomen. Die Beobachtungen konnte mittels Kollokationen von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen und Pericentrin bestätigt werden.

Eine Assoziation von pS2L mit dem mitotischen Spindelapparat wurde bereits zuvor mit Proteinen des *chromosomal passenger complex* in HeLa-Zellen beobachtet. Die Forschungsarbeit deckte dabei die „mitotischen Phosphorylierungsmotive“ ({PX[G/T/S][L/M]S(p) P und WGLS(p) P}) mittels Massenspektrometrie in 11 Proteinen auf. Unter diesen befanden sich neben SMAD2 bspw. AURKB, INCENP, CDK1 und FZR1. Bei SMAD2 fand sich eine Übereinstimmung der ersten Motivstruktur, die der

Aminosäuresequenz PTTL(p)P entspricht. Dabei handelt es sich um die Phosphorylierung (p) des Serins 255, das in der SMAD2 Linker-Domäne lokalisiert ist (121). Darüber hinaus wurde vorliegend durch einen G2/M-Arrest (CDK1-Inhibitor) in allen fünf NSCLC-Zelllinien ausschließlich ein Anstieg für SMAD2 Linker-Phosphorylierungen nachgewiesen. Dies wurde ebenfalls für HeLa-Zellen beschrieben, wenn diese mit Nocodazol (Mikrotubuli-Polymerisations-Hemmstoff) in der G2/M-Phase arretiert wurden. Während Stimulationen mit Thymidine (G1/S-Arrest) nicht zu pS2L-Zunahmen führten (121). Gleiches wurde in NSCLC-Zellen für Stimulationen mit dem CDK4/6 (Palbociclib)- bzw. CDK2-Inhibitor festgestellt, wobei es zu stark verminderten pS2L⁺/pHH3⁺-Subpopulationen innerhalb der G2/M-Phase kam. Beide Kinasen sind insbesondere in der späten G1- und S-Phase aktiv (84). Das CDK2 und CDK4 zu einer Linker-Phosphorylierung des SMAD2-Proteins befähigt sind, wurde bereits in vorangegangenen Studien in Keratinozyten (122) und murinen embryonalen Fibroblasten (5) gezeigt. In Zellen des Ovarialkarzinoms einer anderen Studie waren Linker- und C-terminale Phosphorylierungen von SMAD3 ebenfalls mit der mitotischen Spindel assoziiert. Hingegen der Beobachtungen von Zunahmen für SMAD2 und pS2L bei einem Mitose-Arrest, wurden für SMAD3-Zielstrukturen Abnahmen beschrieben (123) und eine Annahme unterschiedlicher Funktionen beider Proteine unterstützt.

SMAD2 Linker- und Histon H3-Phosphorylierungen sind kolokalisiert und korrelieren auch unter Stimulationsbedingungen

Darüber hinaus zeigten IFM-Analysen neben einer Korrelation auch eine Kolokalisation von pS2L mit pHH3. Phosphorylierungen am Histon H3 sind während der Zellteilung für die Kondensation und Segregation der Chromosomen wesentlich und an der Funktion spezifischer DNA-RNA-Hybride beteiligt, die als *R-Loops* bekannt sind. Diese beeinflussen Gentranskriptionen und fördern eine Chromosomeninstabilität (124). Des Weiteren konnte eine Studie an murinen epidermalen Zellen zeigen, dass phospho-Histon H3 für eine EGF-induzierte Transformation unverzichtbar ist (86). Weitere Untersuchungen verschiedener stimulierter NSCLC-Zelllinien mit CDK-Inhibitoren und Pirfenidon bestätigten eine Korrelation für die Zellzahlen von pS2L⁺-Subpopulationen in der G2/M-Phase mit pHH3⁺-Zellen. Die Ergebnisse zeigten sowohl nach Stimulationen mit dem CDK2- als auch CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib) eine stark reduzierte Anzahl pS2L⁺/pHH3⁺-Zellpopulationen. Somit

könnten diese bzw. deren Zielproteine sowohl für Histon H3- als auch SMAD2 Linker-Phosphorylierungen verantwortlich sein. Ableitend aus den Ergebnissen konnte eine Beteiligung von CDK1 ausgeschlossen werden, da pS2L⁺/pHH3⁺-Subpopulationen nach Stimulationen mit dem CDK1-Inhibitor stark zunahmen. Das SMAD2 Linker-Phosphorylierungen ebenfalls in T-Zellen gesunder Spender eine Rolle bei der Zellteilung spielen legten die Proteinanalysen nahe, da pS2L in nicht-aktivierten und nicht-proliferierenden Zellpopulationen nicht nachweisbar war. Hingegen führte eine CD3/CD28-Aktivierung zu einem deutlichen pS2L-Anstieg, wobei Zellzyklusanalysen signifikante Zunahmen von Zellen in der S- und G2/M-Phase im Vergleich zu nicht-aktivierten T-Zellen zeigten. Dementsprechend waren SMAD2 Linker-Phosphorylierungen auch in benignen Zellen Mitose-assoziiert.

DFZ-Analysen zeigten, dass es in allen NSCLC-Zelllinien geringere Zunahmen des SMAD2-Gesamtproteins und der C-terminalen Phospho-Isoform von der G0/G1- zur G2/M-Phase gab, verglichen mit der SMAD2-Linker-Phosphorylierung, die stärker zunahm. Innerhalb der G2/M-Phase zeigte sich ausschließlich für pS2L eine höhere Abundanz, die sich im Vergleich zum Gesamtprotein und der C-terminalen Phosphorylierung etwa verdoppelte (Abb. 46). Dies schien in Anbetracht einer Korrelation mit dem Mitose-Marker phospho-Histon H3 und einer Verdoppelung des Erbguts (2N → 4N) während der Zellteilung nachvollziehbar. Zudem waren ebenfalls Kolokalisationen von pS2L und Pericentrin nachweisbar. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass sich die pS2L-Abundanz während eines Zellzyklus verdoppelt und nach der Zytokinese zu gleichen Teilen in den Tochterzellen vorliegt.

Das TGFβ eine Erhöhung der Chromatin Zugänglichkeit bewirkt und diese sowohl von kanonischen- als auch nicht-kanonischen TGFβ-Signalwegen abhängt, wurde kürzlich in normalen Mamma-Drüsenepithelzellen von Mäusen gezeigt (125). Darüber hinaus zeigte eine Studie in murinen Embryonalkarzinomzellen (P19-Zellen, Teratokarzinom), dass SMAD2-Bindungsstärken am Chromatin mit dem Histon H3 Acetylierungsstaus korrelierten. Zudem machten die Untersuchungen deutlich, dass kein fester Mechanismus von SMAD2-vermittelten Transkriptionen vorliegt, sondern diese genspezifisch erfolgen und sowohl akut als auch verzögert sowie aktivierend und repressiv sein können. Dabei wird das Transkriptionsprofil zu späteren Zeitpunkten im Zusammenspiel mit weiteren Transkriptionsfaktoren moduliert. Aktivin/NODAL-Stimulationen zeigten, dass SMAD2 an

inaktivierte Chromatin-*Loc*i bindet, was zu einer Nukleosomenverschiebung und Acetylierung von Histon H3 führte. Damit wurde nachgewiesen, dass SMAD2 nicht auf „*Master-Transkriptionsfaktoren*“ wie POU5F1 (OCT4) angewiesen ist, um Gene zu aktivieren, wohingegen für andere SMAD2-abhängige Regulationen Pionier-Transkriptionsfaktoren wie POU5F1 (OCT4) und/oder FOXH1 erforderlich waren. Damit kann SMAD2 sowohl Gentranskriptionen aktivierter Gene verstärken als auch nicht aktive Gene reaktivieren (126). Ob und inwieweit SMAD2 Linker-Phosphorylierungen oder -Spleißvarianten diese Prozesse beeinflussen bleibt durch die Studien unbeantwortet. Ein Einfluss ist jedoch aufgrund von pS2L⁺/pHH3⁺-Kokalisationen und -Korrelationen während der G2/M-Phase, manifestiert veränderter Niveaus der SMAD2-Spleißvarianten bei unterbundenen Linker-Phosphorylierungen und differenziellen Genexpressionen in A549^{WT}- vs. A549L^{sub}-Zellen anzunehmen. Des Weiteren machten die vorliegenden Ergebnisse der Stimulationen deutlich, dass insbesondere hohe Phosphorylierungen von SMAD2 Linker-Domänen und Histon H3 innerhalb eines engen Zeitfensters erfolgen. Die T-Zell-Analysen zeigten zudem, dass SMAD2 Linker-Phosphorylierungen ebenfalls in mitotischen Immunzellen gesunder Spender eine Rolle spielen (3.6). Darüber hinaus scheinen SMAD2-Phosphorylierungen am Serin 255 bei der Mitose involviert zu sein, die ebenfalls mit *in situ* TH₁₇-Differenzierungen in Zusammenhang stehen (106) (108). Damit scheinen Transkriptexpressionen bereits während der Mitose durch Chromatin-Umstrukturierungen zu erfolgen, die erst zeitverzögert nach der Cytokinese in Anhängigkeit weiterer Kofaktoren zum tragen kommen.

Die experimentellen Ergebnisse zeigten, dass SMAD2 Linker-Phosphorylierungen während der Mitose sowohl in allen fünf NSCLC-Zelllinien als auch proliferierenden T-Zellen (nach CD3/CD28-Aktivierung) gesunder Spender keimblattübergreifend nachweisbar waren. Daher kann geschlossen werden, dass es sich um einen basalen und konservierten Mechanismus der SMAD2-Signalwegsfunktion in benignen und malignen Zellen handelt, die insbesondere aufgrund einer Kreuzvernetzung zu anderen Signalkaskaden in NSCLCs als auch *in situ* Differenzierungen in T-Zellen von besonderer Bedeutung ist. Derzeit werden zur weiteren Verifizierung eines konservierten Mitose-abhängigen Auftretens von pS2L verschiedene humane Tumore und Normalgewebe analysiert. Darüber hinaus sollen die

Untersuchungen herzustellen, ob sich Gesamtabundanzen von SMAD2 und insbesondere Linker-Phosphorylierungen in Tumoren und Normalgeweben differenziell darstellen.

4.3 S2^{ΔE3} – der „Linker“ zur Embryogenese

Zur Spezifizierung SMAD2 Linker-abhängiger Prozesse, war die erfolgreiche Etablierung einer A549L^{sub}-Zelllinie mit einer Substitution des Serin-Triplets innerhalb der Linker-Domäne mittels CRISPR/Cas9 entscheidend. Dadurch wurden SMAD2 Linker-Phosphorylierungen konstitutiv unterbunden, wobei essenzielle Strukturen für eine Aufrechterhaltung des kanonischen TGFβ-Signalwegs in Form von Phosphorylierungen des C-terminalen Motivs sowie SMAD3 erhalten blieben. Dies ermöglichte eine isolierte Analyse pS2L-abhängiger Regulationen auf verschiedenen biologischen Ebenen und stellte einen Vorteil gegenüber anderen Methoden dar wie bspw. bei einem SMAD2-Knockout oder transienten -Knockdown.

SMAD2 Linker-Phosphorylierungen begünstigen Malignitätsfaktoren

Aufgrund der beobachteten Mitose-Assoziation von pS2L wurden weiterführende Untersuchungen zur Proliferation durchgeführt. Als Folgen konstitutiv abwesender SMAD2 Linker-Phosphorylierungen wurde eine verminderte Zellzahl innerhalb der G2/M-Phase und herabgesetzte Proliferationsrate von 9 % (±2,9 %) im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen festgestellt. In Anbetracht eines Austausches von lediglich drei Aminosäuren und einer Aufrechterhaltung der SMAD2-Proteinstruktur und kanonischen TGFβ-Signalwegsintegrität (3.9) war dies als deutlich verlangsamt zu bewerten. Zudem wiesen A549L^{sub}-Zellen eine deutlich langsamere Wundheilung auf. Wie bereits erläutert wurde, nahmen insbesondere SMAD2 Linker-Phosphorylierungen während des Zellzyklus zu. Die Ergebnisse waren konform mit einer Reepithelialisierung, bei der sowohl Migration als auch Proliferation entscheidende Rollen spielen (127).

Den Ergebnissen zur Folge könnten SMAD2 Linker-Phosphorylierungen eine zentrale Funktion bei Wundheilungsprozessen in Lungengeweben haben. Diese stellen einen komplexen zellulären Prozess von Immun- und Epithelzellen sowie der ECM dar, der u. a. über die Entlassung verschiedener Wachstumsfaktoren wie TGFβ1/2, KGF und EGF reguliert und koordiniert wird. Nach Verletzungen der Alveolen kommt es neben Hyperproliferationen von AECII zu Umdifferenzierungen in AECl und schließlich zur

Reepithelialisierung der Wunde (128). Daher ist es vorstellbar, dass bei diesen Prozessen sowohl SMAD2 Linker-Phosphorylierungen als auch SMAD2-Spleißvarianten von Bedeutung sind. Insbesondere die Ergebnisse in AECII zeigten eine höhere C-terminale Phosphorylierung von S2^{FL}, die in benignen Epithelzellen mit anti-proliferativen Wirkungen assoziiert sind (12) (33). In Folge eines Wundheilungsprozesses könnten Wachstumsfaktoren wie EGF intrazelluläre Signalkaskaden (z. B. MAPK) aktivieren und SMAD2 Linker-Phosphorylierungen vermitteln, wie es in murinen embryonalen Fibroblasten gezeigt wurde (13). Diese könnten C-terminale Phosphorylierungen in AECII überlagern bzw. in dualen SMAD2-Phosphorylierungen resultieren, um Proliferation und Migration zu fördern. Darüber hinaus waren signifikante Zunahmen von S2^{AE3} nachweisbar, wenn A549^{WT}-Zellen mit TGFβ1 stimuliert wurden (3.9) und lag in Zelllinien mit *EGFR*-Mutationen erhöht vor (3.2). Ein ähnlicher Mechanismus wäre ebenfalls bei AECII denkbar, wenn es zu hohen Wachstumsrezeptoraktivitäten kommt und könnte eine Umdifferenzierung zu AECl und Proliferation induzieren. Darüber hinaus wurde durch unserer Forschungsgruppe gezeigt, dass TGFβ1-Stimulationen in AECII einen Umbau des Aktin-Cytoskeletts und erhöhten Kollagen-Metabolismus zur Folge hatten (67). Nach einer Reepithelialisierung bleiben S2^{AE3}-Translationen bzw. -Expressionen möglicherweise aus, um die Plastizität in AECl einzuschränken und Gewebshomöostase zu gewährleisten. Die Ergebnisse standen sowohl im Einklang mit den Beobachtungen während der Mitose als auch mit den SMAD2-Spleißvarianten, die anscheinend mit dem zellulären Differenzierungsstatus assoziiert sind. Übereinstimmend damit zeigten die Transkriptomanalysen differenzielle Regulationen relevanter Gene, die mit Zellmotilität assoziiert waren, wenn Linker-Phosphorylierungen unterbunden wurden. Darüber hinaus waren bei einem Vergleich von A549^{WT} vs. A549L^{sub} ebenfalls die GO_BP-Analysen differenzieller Zielstrukturen der Methylome, Transkriptome und Proteine signifikant angereichert für „*Cell Motility*“ und „*Locomotion*“ (3.8) (Abb. 47).

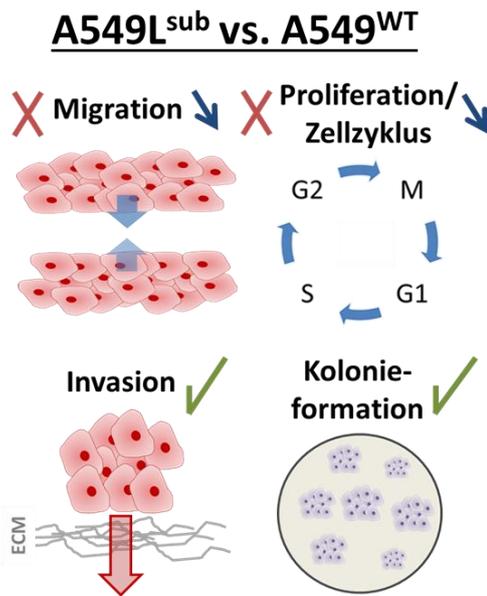


Abb. 47: Ergebnisse funktioneller phospho-SMAD2-Linker-abhängiger Prozesse. Die schematische Abbildung fasst die Ergebnisse der funktionellen *in vitro* Zell-Analysen zusammen. Während sich eine verlangsamte Proliferationsrate und Migrationsfähigkeit von A549L^{sub}- im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen zeigte, blieben Invasion und Kolonieformation unverändert.

Überraschenderweise waren keine Veränderungen bei der Invasionsfähigkeit festzustellen, wenn SMAD2 Linker-Phosphorylierungen ausblieben. Die Beobachtungen stellten sich gegensätzlich zu murinen embryonalen Fibroblasten (mMEFs) dar. Hier wurde eine Abnahme der Invasionseffizienz nach einer retroviralen Infektion von *Smad2*^{-/-}-mMEFs mit SMAD2-Mutanten beschrieben. Diese enthielten verschiedene Serin- bzw. Threonin-Substitutionen innerhalb der SMAD2 Linker-Domäne oder am C-terminalen Motiv. Für eine herabgesetzte *in vitro* Invasion war es nicht wesentlich ausschlaggebend, ob ein Serin- bzw. Threoninrest oder alle substituiert waren. Es wurde daher geschlossen, dass Invasionen C-terminale und gleichzeitig „volle“ Linker-Phosphorylierungen am SMAD2 voraussetzen (5). Dies traf für A549L^{sub}-Zellen nicht zu. Auch nach einer Substitution des SMAD2 Serin-Triplets zu Alaninen waren A549L^{sub}-Zellen *in vitro* invasiv (3.7). Den Ergebnissen zur Folge ist zumindest keine „volle“ SMAD2 Linker-Phosphorylierung nach malignen Transformationen zwingend erforderlich, um A549-Zellen zur Invasion zu befähigen.

Dies könnte sowohl auf grundlegende Unterschiede von Epithel- zu Stromazellen, adulten- und embryonalen Zellen als auch malignen- zu benignen Zellen hinweisen. Dass invasive- und migratorische Prozesse unabhängig voneinander sind machte eine Studie anhand von Ratten-Prostata-Krebs- und immortalisierten humanen Mammaepithelzellen (HMLE) deutlich. Beide Zelltypen wiesen *post*-EMT eine verlangsamte Migration auf, blieben aber beide *in vitro* invasiv. *In vivo* war hingegen lediglich bei den Prostata-Krebszellen eine Invasionsfähigkeit nachweisbar. Somit sind beide Prozesse entkoppelt und eine

verminderte Migration hat nicht zwangsläufig auch eine verminderte Invasion zur Folge (129). Dies schien vorliegend in A549L^{sub}-Zellen ebenfalls der Fall zu sein.

Insbesondere der TGF β -Signalweg ist in Lungenkrebs EMT-assoziiert und geht ebenfalls mit einem Erwerb von Stammzell-Merkmalen einher (130) (1). Die Transkriptomanalysen von A549L^{sub}- und A549^{WT}-Zellen zeigten differenzielle Expressionen EMT-assoziiierter Gene. Jedoch war die Invasionseffizienz im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen *in vitro* nicht verändert. Dennoch verdeutlichten die Ergebnisse, dass TGF β -abhängige Prozesse ebenfalls von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen beeinflusst werden. Dies erschien zunächst widersprüchlich, da SMAD2 Linker-Domänen laut Literatur keine direkten Substrate des T β R-Komplexes darstellen (12) (45). Es ist jedoch bekannt, dass Linker-Phosphorylierungen als Knotenpunkte zu zahlreichen anderen Signalkaskaden wie bspw. MAPK fungieren (Abb. 2, C). Demnach könnte eine indirekte Beeinflussung über weitere intrazelluläre Kinasen erfolgen (42) (131) (132), da diese durch die Substitution nicht länger in der Lage sind Phosphorylierungen auf SMAD2 Linker-Domänen zu übertragen. Als Konsequenz wären differenzielle Genregulationen vorstellbar, da R-SMADs zur Aktivierung TGF β -responsiver Gene weitere Co- und Transkriptionsfaktoren benötigen, die mit spezifischen R-SMAD Phospho-Isoform-Komplexen interagieren (40) (35). Demnach kommt es durch eine Linker-Substitution zu einer reduzierten Phospho-Isoform-Diversität, die den Ergebnissen nach auch TGF β -induzierte Genregulationen beeinflusst. Die Analysen verdeutlichten somit, dass Prozessierungen von TGF β -Signalen pS2L-abhängig sind. Dies zeigten ebenfalls GO_BP-Analysen nach TGF β 1-Stimulationen und führten zu exklusiven und inversen Genregulationen, wenn kein pS2L vorlag. Dies könnte gleichermaßen für weitere Wachstumsfaktoren der Fall sein, wenn diese via SMAD2 Linker-Phosphorylierungen mit dem TGF β -Signalweg verknüpft sind (z. B. WNT- und JAK/STAT-Signalweg). Des Weiteren zeigten sowohl A549L^{sub}- als auch A549^{WT}-Zellen ein vergleichbares Koloniebildungspotenzial in Soft-Agar. Ein Wachstum unabhängig einer festen Oberfläche zählt zu den Schlüsselmerkmalen einer Karzinogenese (133) (134).

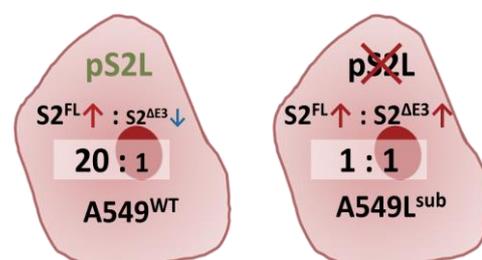
Die Ergebnisse zeigten, dass SMAD2 Linker-Phosphorylierungen in A549-Zellen mit Proliferation und Migration assoziiert sind. Ferner blieb jedoch ungeklärt, ob Linker-Phosphorylierungen bei diesen Prozessen an einer bestimmten SMAD2-Spleißvariante erfolgen oder beide involviert sind. Konstitutiv unterbundene Linker-Phosphorylierungen in

A549L^{sub}-Zellen führten demnach lediglich zu partiellen Abnahmen von Malignitätsfaktoren, wovon die Invasions- und Kolonieformationseffizienz nicht betroffen waren, obwohl im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen bspw. EMT-assoziierte Gene differenziell exprimiert waren (3.8). Zur vollständigen Abklärung, ob fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen in Lungenkrebszellen Invasion beeinträchtigen könnten *in vivo* Experimente in Mäusen Aufschluss geben. Des Weiteren ist festzuhalten, dass die Ergebnisse anderer Zelltypen nicht *per se* auf NSCLCs bzw. transformierte Zellen übertragbar sind und keine „volle“ Linker- und C-terminale Phosphorylierung für Invasion vorausgesetzt ist. Darüber hinaus stellte sich durch die Analysen deutlich heraus, dass SMAD2 Linker-Domänen TGFβ-abhängige Genregulationen beeinflussen, auch wenn diese keine Zielstruktur von TGFβ-Rezeptoren darstellen.

S2^{ΔE3}-Niveaus steigen bei durch fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen an

Als weitere Folgen fehlender SMAD2 Linker-Phosphorylierungen wurden signifikant höhere Niveaus für das SMAD2-Gesamtprotein ($S2^{FL} + S2^{\Delta E3}$) in A549L^{sub}- im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen festgestellt. Dabei setzen sich die Anteile der SMAD2-Spleißvarianten unterschiedlich zusammen. Es zeigten sich in Relation zum jeweiligen SMAD2-Gesamtprotein Anteile von 48,2 % ($\pm 2,9$ %) für $S2^{FL}$ und 51,8 % ($\pm 2,9$ %) für $S2^{\Delta E3}$ in A549L^{sub}, was einem Verhältniswert von $S2^{FL}$ zu $S2^{\Delta E3}$ von etwa 1:1 entsprach. In A549^{WT} lagen hingegen Anteile von 94,6 % (± 2 %) für $S2^{FL}$ und 5,4 % (± 2 %) für $S2^{\Delta E3}$ vor und somit ein Verhältnis von etwa 20:1. Damit ergab sich im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen eine 10-fache Zunahme für $S2^{\Delta E3}$, während sich die Abundanz für $S2^{FL}$ halbierte, wenn keine Linker-Phosphorylierungen am SMAD2 erfolgen konnten (Abb. 48).

Abb. 48: Auswirkungen konstitutiv unterbundener pS2L-Signale auf SMAD2-Spleißvarianten in A549-Zellen. Die schematische Abbildung stellt die Verhältniswerte von $S2^{FL}$ zu $S2^{\Delta E3}$ in Folge einer SMAD2 Linker-Substitution (A549L^{sub}) im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen dar. Eine konstitutiv unterbundene Phosphorylierung der SMAD2 Linker-Domäne führte insbesondere zu einer Zunahme von $S2^{\Delta E3}$ und infolgedessen zu veränderten Verhältnissen der SMAD2-Spleißvarianten.



Insbesondere die kurze SMAD2-Spleißvariante ist in der Literatur mit der Embryonalentwicklung assoziiert. So wurden bspw. vergleichbare Verhältnisswerte der SMAD2-Spleißvarianten wie in A549L^{sub}-Zellen in frühen Entwicklungsstadien von *X. laevis*

Embryonen nach einer Aktivierung des Aktivin-*like*- und TGF β -Signalwegs beschrieben (57). Untersuchungen muriner ESCs zeigten zudem, dass S2 ^{Δ E3} im Vergleich zu S2^{FL} stärker nukleär lokalisiert ist (135) und eine defekte *anterior-posterior*-Achse zur Folge hat, wenn S2 ^{Δ E3} nicht exprimiert wird (15). Die differentiellen Proteinniveaus von A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen waren auf mRNA-Ebene nicht verifizierbar und schienen einer posttranskriptionellen Regulation zu unterliegen. Eine andere Studie kam zu einem vergleichbaren Ergebnis und beschrieb abweichende Transkript- und Proteinniveaus für beide SMAD2-Proteinformen in Mausgeweben. Dabei verwendeten sie zur Expressionsbestimmung einen sensitiveren Ribonuklease-Protection-Assay. Es zeigten sich höhere S2^{FL}-Transkriptniveaus, jedoch waren die Verhältniswerte von S2^{FL} zu S2 ^{Δ E3} in murinen ESCs als auch adulten Geweben nie höher als 3,5:1 (E7,5-10,5). In der späteren Trächtigkeit (E16,5) waren hingegen ebenfalls Verhältniswerte der Transkripte von nahezu 1:1 nachweisbar. Gleiche Verhältniswerte wiesen die SMAD2-Spleißvarianten auf Proteinebene in A549L^{sub} auf, wenn kein pS2L vorlag. Auf Proteinebene untersuchte die Studie ausschließlich C-terminale SMAD2-Phosphorylierungen in T- und B-Lymphozyten adulter Tiere aus dem Thymus bzw. der Milz. In beiden unstimulierten Zelltypen zeigten sich nahezu gleich ausgeprägte schwache pS2C-Niveaus für S2 ^{Δ E3} und S2^{FL}. Hingegen führten TGF β 1-Stimulationen zu wesentlich höheren Phosphorylierungen am S2^{FL}. Die Forschenden schlossen daher ebenfalls auf posttranskriptionelle Regulationen der Spleißvarianten (15). Vergleichbare Ergebnisse waren sowohl in unstimulierten A549^{WT}- als auch A549L^{sub}-Zellen nachweisbar. Nach TGF β 1-Stimulationen kam es jedoch zu erhöhten pS2C-Niveaus beider Spleißvarianten, die zwar höher, aber weiterhin in einem Verhältnis von etwa 1:1 vorlagen.

Grundsätzlich ließ sich feststellen, dass eine konstitutiv abwesende SMAD2 Linker-Phosphorylierung in A549L^{sub}-Zellen einen Anstieg der embryonal-assoziierten kürzeren SMAD2-Spleißvariante zur Folge hatte. Eine Studie in Mäusen zeigte, dass eine alleinige Expression von S2^{FL} in einem *Smad3*^{null/null} Genom-Hintergrund nicht zu einem definitiven Entoderm führt, was auf unterschiedliche regulatorische Kapazitäten von S2^{FL} und S2 ^{Δ E3} schließen lässt (60).

SMAD2 Linker-Phosphorylierungen sind für eine kanonische TGF β -Signalwegsintegrität nicht essenziell

Dass die Integrität des kanonischen TGF β -Signalwegs auch bei konstitutiv fehlenden SMAD2 Linker-Phosphorylierungen gegeben war, machten TGF β 1-Stimulationen deutlich. Dabei stiegen C-terminale Phospho-Isoformen an beiden SMAD2-Spleißvarianten in A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen vergleichbar an. Die stark abweichenden Gesamtniveaus der SMAD2-Spleißvarianten in A549L^{sub} und A549^{WT} hatten somit keine Auswirkungen auf die Ausprägung von C-terminalen Phosphorylierungen. Dies sprach ebenfalls für vergleichbare Regulationsstärken, unabhängig einer SMAD2 Linker-Phosphorylierung. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass beide Proteinvarianten gleichermaßen an der Weiterleitung von TGF β -Signalen beteiligt sind.

TGF β 1-Stimulationen führen in A549^{WT}-Zellen zu höheren S2 ^{Δ E3}-Niveaus

Ferner zeigten sich keine signifikanten Veränderungen von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen in A549^{WT}-Zellen, wenn diese mit TGF β 1-stimuliert wurden. Es kam jedoch ausschließlich zu einem tendenziellen Anstieg von Linker-Phosphorylierungen an der kurzen SMAD2-Spleißvariante, was nochmals durch eine größere Stichprobe geprüft werden sollte, insbesondere da S2 ^{Δ E3} nach TGF β 1-Stimulationen ebenfalls signifikant erhöht war (3.9). Darüber hinaus wurde in murinen embryonalen Fibroblasten gezeigt, dass pS2L sowohl durch EGF- als auch TGF β -Stimulationen zunahm (13). Bei S2^{FL} wurden in A549^{WT}-Zellen wie erwartet ebenfalls keine signifikanten Zunahmen von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen durch aktivierte TGF β -Rezeptorkomplexe vermittelt. Somit wirkten sich TGF β 1-Stimulationen selektiv auf die kurze SMAD2-Spleißvariante in A549^{WT}-Zellen aus, während diese keinen Einfluss auf S2^{FL} hatten. In A549L^{sub}-Zellen blieben die Verhältnisse von S2^{FL} zu S2 ^{Δ E3} mit 1:1 auch nach TGF β 1-Stimulationen bestehen.

TGF β 1-induzierte Genregulationen sind „abhängig“ von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen

Die Transkriptom-Analysen beider TGF β -Signaturen von A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen machten deutlich, dass TGF β 1-responsive Gene von einer SMAD2 Linker-Phosphorylierungen „abhängig“ sind. Dies äußerte sich in exklusiven und invers regulierten Genen, wenn Linker-Phosphorylierungen nicht erfolgen konnten. Es zeigte sich zudem, dass

Gene mit gleichen Regulationsrichtungen durch fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen oftmals stärker herunterreguliert waren. Bei A549L^{sub} +TGFβ vs. Kontrolle ergab sich ein mittlerer FC der 35 am stärksten herunterregulierten Gene von 282 (±371), während dieser bei A549^{WT} +TGFβ vs. Kontrolle bei 53 (±70) lag. Bei heraufregulierten Genen lag überwiegend der entgegengesetzte Fall vor, dabei ergab sich ein mittlerer FC von 85 (±94) für A549L^{sub} und von 195 (±366) für A549^{WT} nach TGFβ1-Stimulationen. Interessanterweise stellten sich darüber hinaus invers regulierte Gene durch fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen dar. Hier kam es ebenfalls zu stärkeren herunter- als heraufregulierten Genen. Bei A549L^{sub} lag der mittlere FC herunterregulierter Gene bei 143 (±254), während der heraufregulierte mittlere FC in A549^{WT} bei 77 (±113) lag. Im Gegensatz dazu ergab sich in A549L^{sub} bei heraufregulierten Genen ein durchschnittlicher FC von 5 (±6) und bei A549^{WT} ein herunterregulierter FC von 4 (±5). Die GO_BP-Analyse invers regulierter Gene war zudem signifikant angereichert für *terms* die mit Embryonalentwicklung, Differenzierung und Morphogenese assoziiert waren. Dies spiegelte sich ebenfalls bei einem Vergleich von stammzell-assoziierten Genen wider. Dabei stellte sich *in silico* ein signifikant negativer Effekt der exklusiv hochregulierten A549L^{sub}-Gene auf das Gesamtüberleben bei NSCLC-Patienten heraus, was bei den exklusiv hochregulierten stammzell-assoziierten Genen von A549^{WT} nicht der Fall war.

Die Ergebnisse ließen daher die Vermutung zu, dass es zu epigenetischen Reprogrammierungen bei abwesenden Linker-Phosphorylierungen kommt bzw. diese davon abhängen an welcher SMAD2-Spleißvariante C-terminale oder Linker-Phosphorylierungen erfolgen. Durch ein erhöhtes S2^{ΔE3}-Niveau könnten wiederum embryonale Differenzierungsprozesse reaktiviert werden. Höhere Regulationsstärken liegen möglicherweise in einer effizienteren und damit erhöhten nukleären Lokalisation von S2^{ΔE3} begründet, wie es in Hirngeweben von Mäusen gezeigt wurde (16). Vergleichbare Veränderungen durch erhöhte S2^{ΔE3}-Niveaus könnten auch auftreten, wenn hohe TGFβ-Konzentrationen in Tumoren vorliegen, wie es in A549^{WT}-Zellen nach TGFβ1-Stimulationen der Fall war. Aufgrund einer pS2L-Assoziation mit Mitose wurden daher Modulationen mittels CDK-Inhibitoren und Pirfenidone untersucht.

SMAD2 Linker-Phosphorylierungen und -Spleißvarianten sind durch CDK-Inhibitoren und Pirfenidon in A549^{WT}-Zellen modulierbar

Bei Stimulationen mit dem CDK1-Inhibitor waren keine Veränderungen der Spleißvarianten ersichtlich. Es kam aber zu einer erwarteten Zunahme von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen aufgrund eines induzierten G2/M-Arrests. Signifikante Zunahmen traten ebenfalls in den DFZ-Analysen von A549^{WT}-Zellen auf. Im Gegensatz dazu führten Stimulationen mit dem CDK2-Inhibitor zu einer Abnahme des S2^{FL}-Niveaus, während S2^{ΔE3} unverändert blieb. Auf Linker-Phosphorylierungen hatten die Stimulationen hingegen keinen Einfluss, wenn die Proteinlysate analysiert wurden. In den DFZ-Analysen wurde hingegen eine Abnahme von hohen SMAD2 Linker-Phosphorylierungen der Subpopulation innerhalb der G2/M-Phase ersichtlich. Letztres zeigte sich ebenfalls nach Stimulationen mit dem CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib). Darüber hinaus kam es zu einer S2^{ΔE3}-Zunahme, während S2^{FL} unverändert blieb. Zudem waren ebenfalls signifikante Abnahmen von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen im Proteinlysat nachweisbar. Die Ergebnisse machten deutlich, dass Linker-Phosphorylierungen nicht kompensiert wurden, wenn Zellen entweder mit dem CDK2- oder CDK4/6-Inhibitor stimuliert wurden. Dies ließ vermuten, dass es sich um eine Reihe nachgeschalteter Kinaseaktivitäten handeln könnte, die letztendlich SMAD2 Linker-Phosphorylierungen während der Mitose vermitteln (Abb. 49).

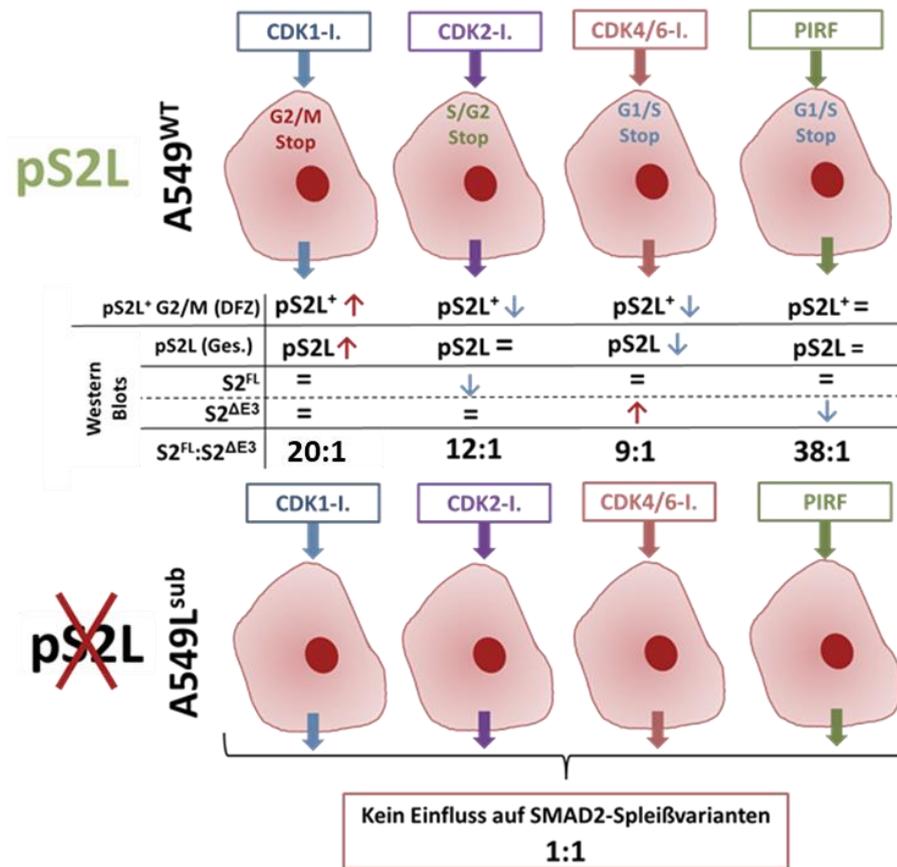


Abb. 49: Modulationen von SMAD2-Spleißvarianten und Linker-Phosphorylierungen durch Stimulationen mit CDK-Inhibitoren und PIRF in A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen. Die schematische Übersicht fasst die Ergebnisse von Einflüssen durch Stimulationen mit CDK-Inhibitoren und PIRF auf die SMAD2-Spleißvarianten und Linker-Phosphorylierung aus den DFZ- und Western Blot-Analysen im Vergleich zu den Kontrollen zusammen. Hinweise: ↑ = Erhöht; ↓ = Vermindert; „=“ = Unverändert; S2^{FL} = SMAD2 ‚full length‘; S2^{ΔE3} = SMAD2 *delta* Exon 3; pS2L (Ges.) = Phospho-Smad2-Linker in Gesamtpopulation (Proteinlysat); pS2L⁺ = Zellzahl der Subpopulation pS2L-positiver Zellen in der G2/M-Phase (Intensität ≥ 4x10³).

Im Gegensatz zu den Beobachtungen für Stimulationen mit dem CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib) führten Behandlungen mit Pirfenidon zu stark reduzierten S2^{ΔE3}-Niveaus. Diese hatten aber ebenfalls keinen Einfluss auf S2^{FL}. Des Weiteren waren keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich Linker-Phosphorylierungen nachweisbar, weder in den Proteinlysaten noch anhand der Subpopulation in der G2/M-Phase. Darüber hinaus zeigten sich Abnahmen des SMAD2-Gesamtproteins in den DFZ-Analysen nach Pirfenidon-Stimulationen für A549^{WT}. Überraschenderweise waren keine Veränderungen durch Stimulationen mit CDK-Inhibitoren oder Pirfenidon für S2^{FL} und S2^{ΔE3} in A549L^{sub}-Zellen nachweisbar. Die Verhältnisse blieben unverändert mit 1:1 für beide SMAD2-

Proteinvarianten bestehen, wenn keine SMAD2 Linker-Phosphorylierungen erfolgten (Abb. 49).

In Bezug auf NSCLC Wildtyp-Zelllinien wurden gleiche Beobachtungen nach Pirfenidon-Stimulationen in den gleichen Zelllinien einer anderen Studie unserer Forschungsgruppe für das SMAD2-Gesamtprotein gemacht. Neben signifikanten Abnahmen von SMAD2 zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bei pS2C, wenn Zellen mit Pirfenidon behandelt wurden. Hingegen waren bei SMAD3 sowohl das Gesamtprotein als auch C-terminale Phosphorylierungen signifikant reduziert. Ferner wurde festgestellt, dass eine Pirfenidon-Behandlung in A549^{WT}-Zellen signifikante Anreicherungen für Mitose- und Zellzyklus-assoziierte Signalwege nach sich zieht (2). Daher war es überraschend, dass es trotz eines G0/G1-Arrests von A549^{WT}-Zellen durch Pirfenidon und einer scheinbar konservierten Mitose-abhängigen Phosphorylierung der SMAD2-Linkerdomäne keine Veränderungen von pS2L-Niveaus auftraten. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Pirfenidon eine verminderte Survivin/BIRC5-Abundanz in NSCLC-Zelllinien zur Folge hat. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die ermittelten differenziell regulierten Survivin/BIRC5-Interaktoren wie bspw. Kinasen der mitotischen Spindel BUB1, PLK1, INCENP und AURKB (2) anscheinend nicht an SMAD2 Linker-Phosphorylierungen beteiligt sind. Wie für SMAD2 wurden bspw. ebenfalls für INCENP und AURKB „mitotische Phosphorylierungsmotive“ in HeLa-Zellen nachgewiesen (121). Daraus wurde geschlossen, dass SMAD2 vermutlich ähnliche Funktionen wie andere Mitose-assoziierte Proteine bei der Proliferation einnimmt. Konsistent damit waren eine verlangsamte Proliferation und Wundheilung sowie eine verringerte Zellzahl in der G2/M-Phase, wenn keine Phosphorylierungen an SMAD2 stattfinden konnten. Damit scheinen SMAD2 und insbesondere Linker-Phosphorylierungen bspw. ebenfalls an Prozessen wie der Chromosomen Segregation beteiligt zu sein, was durch Kollokalisierungen und Korrealitionen mit phospho-Histon H3 und Pericentrin unterstützt wurde.

Die Pharmakodynamik von Pirfenidon ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Den Ergebnissen zur Folge vermindert Pirfenidon die Abundanz des SMAD2-Gesamtproteins aufgrund selektiv reduzierter S2^{ΔE3}-Niveaus. Dabei wirkt es jedoch nicht primär inhibierend auf die Vermittlung von Linker- und C-terminalen Phosphorylierungen am S2^{FL}. Die Tatsache, dass sich dies in unserer vorangegangenen Studie für C-terminale SMAD3-

Phosphorylierungen anders darstellte und signifikant reduzierte Phosphorylierungen nachweisbar waren (2), deutet nochmals trotz einer hohen Sequenzidentität auf unterschiedliche Funktionen von SMAD2 und SMAD3 hin. Weiterhin ist zu vermuten, dass Pirfenidon anscheinend keine CDK2- oder CDK4/6-Inhibierung verursacht und somit auch weiterhin pS2L-Phosphorylierungen vermittelt werden. Durch die wesentlich geringe S2^{ΔE3}-Abundanz im Vergleich zu S2^{FL} waren pS2L-Abnahmen nach Pirfenidon-Stimulationen in Gesamtpopulationen nicht detektierbar. Folglich verhindert Pirfenidon indirekt selektiv S2^{ΔE3}-vermittelte TGFβ-abhängige und -unabhängige Prozesse durch reduzierte Niveaus, während dies für S2^{FL} nicht der Fall war. Dies unterstreicht erneut die Hypothese, dass nicht nur spezifische Phosphorylierungen ausschlaggebend sind, sondern ebenfalls an welcher SMAD2-Spleißvariante diese erfolgen. Unterstützt wurde diese Annahme ebenfalls durch *in silico* Analysen von SMAD2-Transkriptexpressionen und deren Einfluss auf das Gesamtüberleben von ADC-Patienten, wobei hohe Expressionen der kurzen S2^{ΔE3}-Spleißvariante mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert waren. Auswirkungen auf SMAD2-Spleißvarianten durch Pirfenidon wurden bislang nicht untersucht. Aufgrund der Vermutung, dass S2^{ΔE3} mit dem Differenzierungspotenzial und Embryonalentwicklung in Zusammenhang steht wird dieses möglicherweise zusätzlich durch stark reduziertes S2^{ΔE3} beschränkt. Gleiches würde im Gegenzug bedeuten, dass S2^{ΔE3}-Zunahmen nach Stimulationen mit dem CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib) oder SMAD2 Linker-Substitutionen das Differenzierungspotenzial steigern.

Insbesondere im Zusammenhang mit der Linker-Substitution ist zu berücksichtigen, dass eine weitere Phosphorylierungsstelle innerhalb der SMAD2 Linker-Domäne in Form eines Threoninrests an Position **220 (T220)** weiterhin intakt war (Abb. 3, B + C). Eine Ösophagitis-Studie in Mäusen untersuchte **SMAD2/3 T220/179-Phosphorylierungen (pS2/3_T220/179)** in Basalzellen des Ösophagus während der Verletzungs- und Regenerationsphase. Dabei zeigte sich, dass pS2/3_T220/179-Zellen MIB-1 (Ki67) negativ waren und während der Regeneration signifikant zunahmen. Mittels BrdU-Markierungen wurde eine verlangsamte Proliferation von pS2/3_T220/179-Zellen nachgewiesen und festgestellt, dass diese morphologisch einen undifferenzierteren Zustand aufwiesen. Es wurde daher vermutet, dass es sich um epitheliale Stammzellen handelt. Darüber hinaus zeigten pS2/3_T220/179-Zellen Kolokalisationen mit CDK4 und P63 (100). Die Studie differenzierte nicht zwischen SMAD2 und SMAD3 Linker-Threonin- und untersuchte auch keine Linker-Serin-

Phosphorylierungen. Dennoch legten die Beobachtungen nahe, dass Phosphorylierungen innerhalb von Linker-Domänen unterschiedliche Funktionen haben und vom Zell-Kontext abhängen. Weiterführend sollte daher analysiert werden, ob A549L^{sub}-Zellen differenzielle pS2L_T220-Niveaus im Vergleich zu A549^{WT} aufweisen. Gleiches gilt für Phosphorylierungen von SMAD3 Linker-Domänen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Integrität des kanonischen TGFβ-Signalwegs auch bei abwesenden SMAD2 Linker-Phosphorylierung gegeben war. TGFβ1-Stimulationen bewirkten S2^{ΔE3}-Zunahmen in A549^{WT}-Zellen, während diese bei A549L^{sub} nicht beeinflusst wurden und erhöhte S2^{ΔE3}-Niveaus in A549L^{sub}-Zellen konstant über alle Stimulationen hinweg bestehen blieben. Hingegen zeigten insbesondere Behandlungen mit dem CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib) und Pirfenidon gegensätzliche Einflüsse in A549^{WT}-Zellen, obwohl beide Medikamente einen G0/G1-Arrest bewirkten. Stimulationen mit dem CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib) führten zu reduzierten Linker-Phosphorylierungen und erhöhten S2^{ΔE3}-Niveaus, während bei Pirfenidon-Stimulationen SMAD2 Linker-Phosphorylierungen unverändert blieben, aber S2^{ΔE3} stark reduziert vorlag.

Durch diese Beobachtungen wurde gleichzeitig deutlich, dass ein G0/G1-Arrest allein nicht zwingend zu Veränderungen von SMAD2-Linker-Phosphorylierungen führt, sondern dass wahrscheinlich spezifische Abfolgen von Kinase-Aktivitäten, z. B. durch CDK4/6 und CDK2, essenziell sind. Gleiches konnte für Abnahmen von pS2L⁺-Subpopulationen in der G2/M-Phase festgestellt werden. Sowohl Stimulationen mit dem CDK4/6 (Palbociclib)- als auch CDK2-Inhibitor zeigten signifikante Abnahmen von pS2L⁺-Zellen. Dennoch führten lediglich Stimulationen mit dem CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib) zu S2^{ΔE3}-Zunahmen und Abnahmen von pS2L-Niveaus in der Gesamtpopulation. Bei Stimulationen mit dem CDK2-Inhibitor kam es hingegen zu höheren S2^{FL}-Niveaus, während pS2L-Niveaus in der Gesamtpopulation unverändert blieben. Damit zeigte sich, dass Inhibierungen von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen abhängig von einer bestimmten Zellzyklusphase durch unterschiedliche Cyclin-CDK-Komplexe andere Auswirkungen nach sich ziehen. Darüber hinaus beeinflussten fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen die Prozessierung TGFβ-abhängiger Gene. Dies führte neben exklusiven- zu inversen Genregulationen, wobei herunterregulierte Genexpressionen in A549L^{sub}-Zellen deutlich stärker ausgeprägt waren.

Differenzielle pS2L-abhängige Genregulationen konnte darüber hinaus auch bei stammzell-assoziierten Genen festgestellt werden.

Die Etablierung der A549L^{sub}-Zelllinie stellte heraus, dass konstitutiv unterbundene SMAD2 Linker-Phosphorylierungen zu einem manifestierten Anstieg der kurzen embryonal-assoziierten Spleißvariante S2^{ΔE3} führten und differenziell regulierte Zielstrukturen mit Embryonalentwicklung, -Morphogenese und diversen Differenzierungsprozessen in Zusammenhang stehen. Die Tatsache, dass ein vergleichbarer „S2^{ΔE3}-Phänotyp“ in A549^{WT}-Zellen durch Palbociclib (CDK4/6-Inhibitor)-Stimulationen induziert wurde, der ebenfalls mit stark reduzierten pS2L-Niveaus einherging und Pirfenidon zu reduzierten S2^{ΔE3}-Abundanzen führte machte deutlich, dass SMAD2-Linker-Phosphorylierungen und die kurze Spleißvariante modulierbare Zielstrukturen in NSCLCs darstellen und somit als Angriffspunkte in Krebstherapien interessant sind.

4.4 SMAD2 Linker-Phosphorylierungen und S2^{ΔE3} im Fokus von Krebstherapien

Die KEGG-Analyse interagierender differenzieller Zielstrukturen ergab u. a. signifikante Anreicherungen für „EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance“ und „endocrine resistance“. Letztere ist mit Mammakarzinomen und einer Behandlung von Östrogen-Hemmern wie Fulvestrant assoziiert. In Ergänzung können selektive CDK4/6-Inhibitoren als Kombinationstherapie wie bspw. Palbociclib bei der Behandlung von Hormonrezeptor-positiven und metastasiertem Brustkrebs eingesetzt werden. Hier konnte eine Verlängerung für das krankheitsfreie Überleben nachgewiesen werden (136). Interessanterweise zeigte sich nach Stimulationen von A549^{WT}-Zellen eine Abnahme von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen und eine Zunahme des S2^{ΔE3}-Niveaus, wenn diese mit dem CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib) stimuliert wurden. Die Verhältniszahlen der SMAD2-Spleißvarianten unterschieden sich nach Stimulationen zudem nicht länger signifikant von denen in A549L^{sub}-Zellen, die ebenfalls einen Anstieg der kurzen SMAD2-Proteinvariante aufwiesen.

Trägt eine hohe S2^{ΔE3}-Abundanz zur Etablierung erworbener Resistenzen bei?

Dass S2^{ΔE3} in der Embryogenese eine zentrale Rolle spielt, wurde durch *in vivo* Experimente an Mausembryonen gezeigt. Bei einer exklusiven Expression von S2^{ΔE3} in einem *Smad3*^{null/null} Genom-Hintergrund entwickelten sich die Tiere fertil und normal. Hingegen

fürte eine alleinige Expression von $S2^{FL}$ in murinen ESCs nicht zu einem definitiven Entoderm (15). Dies deutet auf eine Restriktion der Embryonalentwicklung durch $S2^{FL}$ hin. Interessanterweise ist bekannt, dass humane ESCs eine verkürzte G1-Phase haben. Daraus resultiert ein kürzeres Zeitfenster zur Übertragung von Phosphorylierungen sowie eine geringere CyclinD-Konzentration, die erst in der späten G1-Phase ansteigt. Infolgedessen führen niedrigere CyclinD-Konzentrationen zu geringeren CyclinD-CDK4/6-Aktivitäten (137). Im Zusammenspiel könnte dies in **humanen ESCs (hESCs)** dazu beitragen, dass eine Übertragung von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen stark limitiert wird. Infolgedessen würde es zu herabgesetzten pS2L-Niveaus und höheren $S2^{\Delta E3}$ -Abundanzen kommen, wie es vorliegend in A549^{WT}-Zellen durch eine Behandlung mit Palbociclib (CDK4/6-Inhibitor) bzw. in A549L^{sub}-Zellen durch eine SMAD2 Linker-Substitution gezeigt wurde. In humanen ESCs könnte dieser Mechanismus zur Aufrechterhaltung von Genexpressionen beitragen, die mit Embryogenese assoziiert sind. Verlängert sich im Laufe der Embryonalentwicklung die G1-Phase, nimmt die CyclinD-Konzentration zu. Dies führt konsequenterweise zu gesteigerten CyclinD-CDK4/6-Aktivitäten. Infolgedessen kommt es zu höheren SMAD2 Linker-Phosphorylierungen und reduzierten $S2^{\Delta E3}$ -Abundanzen, wodurch wiederum Gentranskriptionen für zelluläre Spezifizierungen durch $S2^{FL}$ verstärkt werden könnten (138) (Abb. 50, A + B).

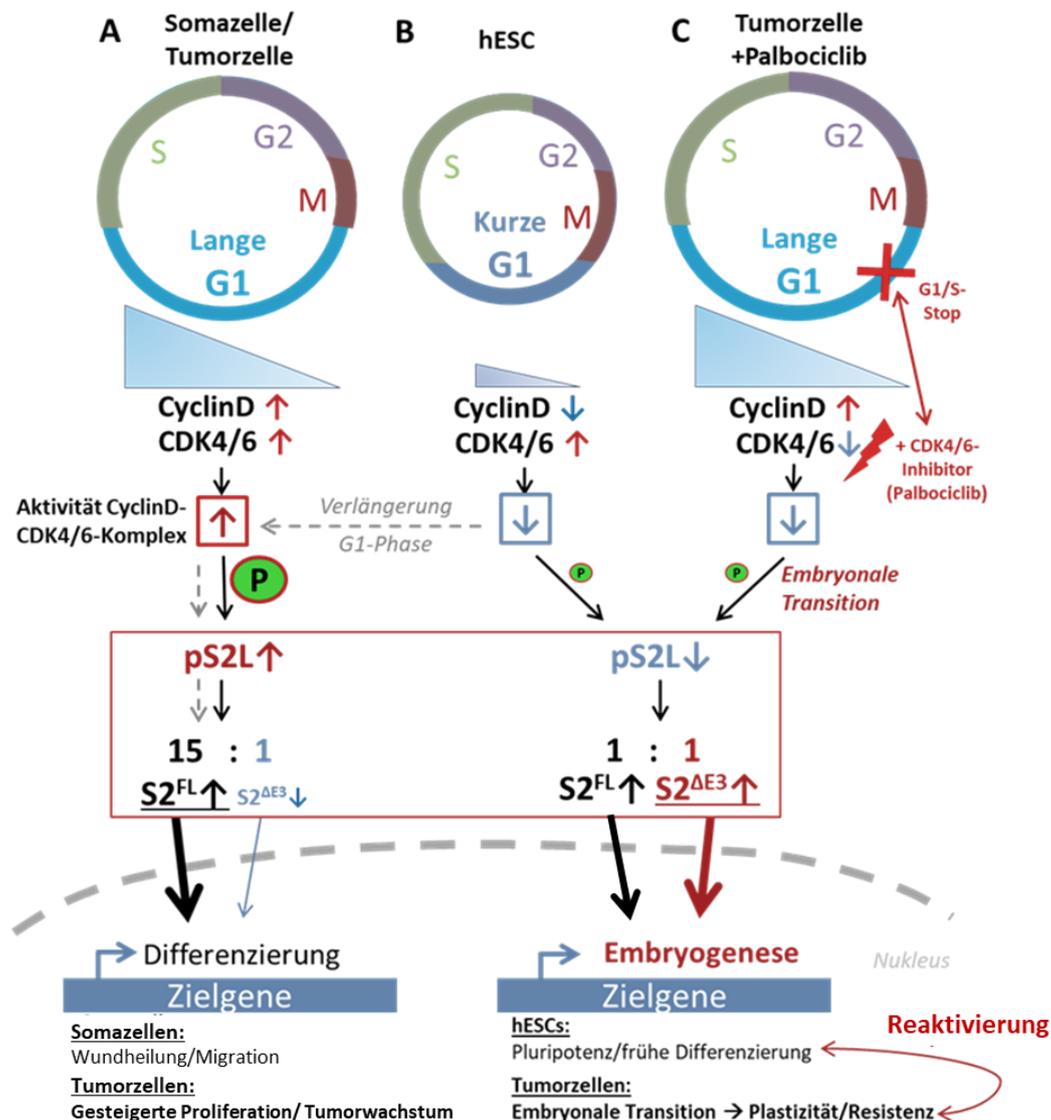


Abb. 50: Hypothese: Herabgesetzte CyclinD-CDK4/6-Aktivitäten durch Inhibitoren oder eine verkürzte G1-Phase beeinflussen SMAD2 Linker-Phosphorylierungen und S2^{ΔE3}-Niveaus. Eine Behandlung von Krebszellen mit CDK4/6-Inhibitoren wie bspw. Palbociclib (C) oder eine verkürzte G1-Phase in humanen ESCs (hESCs) (B) limitieren aufgrund einer geringeren CDK4/6-CyclinD-Aktivität SMAD2 Linker-Phosphorylierungen (pS2L). Dies führt letztlich zu höheren S2^{ΔE3}-Niveaus und Veränderungen der SMAD2 Spleißvarianten-Verhältnisse. Infolgedessen kommt es zu einer „embryonalen Transition“ und Reaktivierung von Genen der Embryonalentwicklung. Dieses Ereignis könnte möglicherweise in Krebszellen zur Plastizität und Etablierung erworbener Resistenzen beitragen. Hinweise: S2^{FL} = SMAD2 ‚full length‘; S2^{ΔE3} = SMAD2 ‚delta Exon 3‘; pS2L = Phospho-SMAD2 Linker.

Reduzierte SMAD2 Linker-Phosphorylierungen lösen „embryonale Transition“ aus

Dieser embryonale Mechanismus wird scheinbar durch CDK4/6-Inhibitoren wie Palbociclib reaktiviert und führt zur „embryonalen Transition“ in Krebszellen. Es ist bekannt, dass trotz einer Inhibierung der Proliferation durch Palbociclib Brustkrebszellen erworbene Resistenzen entwickeln (136) (84). Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass in A549^{WT}-Zellen nach Stimulationen mit Palbociclib signifikant niedrigere pS2L-Niveaus vorlagen,

wobei im Gegensatz zu hESCs verringerte CyclinD-CDK4/6-Aktivitäten durch CDK4/6-Inhibierungen zu vermuten waren. Als Folge ergeben sich in A549^{WT} signifikant höhere S2^{ΔE3}-Niveaus nach Palbociclib-Stimulationen. Infolgedessen kommt es in Tumorzellen zur „embryonalen Transition“ wodurch bspw. Gentranskriptionen der Embryonalentwicklung durch S2^{ΔE3} reaktiviert werden. Daraus könnten partielle De- oder Umdifferenzierungen resultieren, was wiederum zur Heterogenität und Plastizität von Krebszellen beiträgt. Unter Umständen bieten diese Beobachtungen einen Erklärungsansatz für Therapie-induzierte Resistenzentwicklungen in Brustkrebszellen (Abb. 50, C). Mit dieser Hypothese konform waren die GO_BP-Analysen von A549^{WT}- und A549L^{sub}-Zellen. Diese ergaben signifikante Anreicherungen für GO_BP terms, die bspw. mit der Embryonalentwicklung und – Morphogenese assoziiert waren. Insbesondere gingen diese Ergebnisse ebenfalls aus den invers regulierten Genen nach TGFβ1-Stimulationen hervor, wenn keine SMAD2 Linker-Phosphorylierungen erfolgen konnten. SMAD2-Spleißvarianten scheinen daher verschiedene Differenzierungsprogramme zu beeinflussen, wobei S2^{ΔE3} anscheinend auf ein anderes bzw. erweiteretes Repertoire von Genregulationen zugreift das mit Embryonalentwicklung assoziiert ist. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass CDK4/6-Inhibierungen in luminalen Brustkrebszelllinien (RB1-Wildtyp) zu Umstrukturierungen der Chromatin-Architektur führen und bspw. Reprogrammierungen durch eine gesteigerte Aktivität des Transkriptionsfaktors AP1 bewirken (139), wozu ebenfalls SMAD2-Phosphorylierungen und -Spleißvarianten beitragen könnten.

Andererseits zeigte eine Studie synergistische Effekte durch eine Kombination aus Afatinib und Palbociclib in PC-9- und HCC827-Zellen (140). Gleiches wurde für Osimertinib-resistente H1975-Zellen gezeigt, wenn Stimulationen durch Palbociclib ergänzt wurden. Interessanterweise waren in H1975 Osimertinib-sensitiven Zellen keine Veränderungen des Zellzyklus nachweisbar, wenn diese mit einem der beiden Wirkstoffe oder einer Kombination aus beiden behandelt wurden. Dies war auf eine etablierte Resistenz zurückzuführen, da die Zellen unter anderem eine Überexpression von *CDK4* aufwiesen, die sich ebenfalls auf Proteinebene nachweisen ließ (141). Die Daten standen den vorliegenden insoweit entgegen, dass eine alleinige Stimulation mit dem CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib) zu signifikanten Veränderungen des Zellzyklus in H1975-Zellen führte. Diese Tatsache liegt anscheinend in einer Konzentrationsdifferenz begründet. Insgesamt sind sowohl die

vorliegenden als auch Studiendaten in anbetracht eines kurzen Stimulationszeitraums hinsichtlich langfristiger Auswirkungen kritisch zu hinterfragen bzw. zu prüfen, gaben aber dennoch erste Aufschlüsse über potenzielle Mechanismen.

Des Weiteren wurde in Lungenkrebs-Mausmodellen gezeigt, dass T-Zellen ebenfalls sensitiv für CDK4/6-Inhibitoren sind. Dabei stellte sich durch eine transiente CDK4/6-Inhibition heraus, dass die antitumoralen Effekte gesteigert wurden. Darüber hinaus hatte die ergänzende Verabreichung eines CDK4/6-Inhibitors zur Chemotherapie in Mäusen und einer SCLC-Kohorte einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben. Es wurde daher spekuliert, dass ein transienter G1-Arrest cytotoxische Funktionen tumorspezifischer T-Zellen dämpft. (142) (143). In Anbetracht der zentralen Rolle von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen bei T-Zellen *in situ* Differenzierungen (106), könnten geringere pS2L-Ereignisse durch eine CDK4/6-Inhibition Umwandlungen von Effektor oder naiven T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen hemmen. In Übereinstimmung damit waren ebenfalls die Ergebnisse der mIHC. Hier zeigten sich negative Einflüsse auf das Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten, wenn eine hohe Anzahl pS2L-positiver Immunzellen vorlag. Den Daten zur Folge spricht diese Beobachtung für proliferierende bzw. aktivierte T-Zellen, wodurch pS2L_S255-Phosphorylierungen zur Aufrechterhaltung bzw. *in situ* Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen beitragen, was den beobachteten negativen Effekt auf das OS erklären könnte. Ob eine CDK4/6-Inhibition in T-Zellen ebenfalls zu einer Expression bzw. Translation von S2^{AE3} führt, die in peripheren T-Zellen nicht nachweisbar war, bleibt zu überprüfen. Des Weiteren konnte aus der bisherigen Datenlage nicht vollständig geklärt werden, ob ein Anstieg der SMAD2 Linker-Phosphorylierung die Folge einer Aktivierung von T-Zellen war oder auftrat weil diese durch eine CD3/CD28-Stimulation in die Proliferation versetzt wurden. Oder anders formuliert, es bleibt zu prüfen ob T-Zellen ohne SMAD2 Linker-Phosphorylierungen sich gleichermaßen um- bzw. differenzieren und eine vollständige Aktivierung erfolgen kann.

Fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen beeinflussen neuronale Differenzierungsprozesse

Dass SMAD2 Linker-Phosphorylierungen mit Differenzierungsprozessen in Zusammenhang steht machten die Ergebnisse der GO_BP- und KEGG-Analysen deutlich. Hier stellten sich

insbesondere Anreicherungen für Prozesse der Neurogenese, Axon-Pfadfindung und neuronalen Differenzierung sowie zu Gliomen signifikant dar. Die *in silico* Analysen der beiden Gliom-Entitäten (GBM + LGG) zeigten im Gegensatz zu den NSCLCs (ADC + SQC) erhöhte Expressionen der kurzen $S2^{\Delta E3}$ -Spleißvariante im Vergleich zu den Normalgeweben. In Proteinlysaten von Neuronen postnataler Mäuse konnte eine höhere nukleäre $S2^{\Delta E3}$ Lokalisation festgestellt werden. Des Weiteren stieg die $S2^{\Delta E3}$ -Expression während der frühen postnatalen Hirnreifung an. Im späteren Verlauf nahm die *Smad3*-Expression zu und $S2^{\Delta E3}$ nahm mit der Alterung leicht ab. Dennoch bleibt $S2^{\Delta E3}$ die vorherrschende Proteinform im Gehirn (16), was vorliegend weder für epitheliale NSCLCs und AECII noch für T-Zellen der Fall war. Es kam jedoch zu einem $S2^{\Delta E3}$ -Anstieg in A549L^{sub}-Zellen, wenn keine SMAD2 Linker-Phosphorylierungen erfolgten. Die Analysen Stammzell-assoziiierter Gene der TGF β -Signatur von A549L^{sub} zeigten keine signifikanten Anreicherungen für neuronale Stammzellen im Gegensatz zu A549^{WT}. Dies würde eher für Prozesse einer De- bzw. Differenzierung neuronal-assoziiierter Zielmoleküle sprechen, wenn in Zellen keine SMAD2 Linker-Phosphorylierung erfolgen kann. Im Einklang damit zeigten die differenziell exprimierten Gene Übereinstimmungen mit den *most differential survival genes* von *glioblastoma multiforme* und *low grade glioma*. Die *in silico* Analysen machen deutlich, dass heraufregulierte Gene sowohl das Gesamtüberleben der NSCLC- als auch Gliom-Gruppe negativ beeinflusst. Hingegen zeigten die herunterregulierten Gene keinen Effekt auf das Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten und hatten einen stark positiven Einfluss bei den Gliom-Entitäten.

Insbesondere SCLCs zählen zu den neuroendokrinen Karzinomen (144) und eine Transformation vom NSCLC- zum SCLC-Subtyp ist ein bekannter erworbener Resistenzmechanismus (145). Dass neuronale Strukturen auch in Krebszellen epithelialen Ursprungs eine Rolle spielen ist bereits länger bekannt (146), dabei begünstigen Tumorzell-induzierte Kooperationen des Immun- und Nervensystems eine Progression und Metastasierung (147). Insbesondere Sezernierungen neurotropher Faktoren wie BDNF und Semaphorine beeinflussen die Steuerung von Axonen sowie Immunevasion und sind auch bei Lungenkrebs von Bedeutung (148) (147). In A549L^{sub}-Zellen stellte sich nach einem Abgleich EMT-assoziiierter Generegulationen eine erhöhte *BDNF*-Expression im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen dar. Eine Studie in A549-Zellen zeigte, dass BDNF die Invasion förderte, wobei diese Effekte nicht in humanen bronchialen Epithelzellen nachweisbar waren. Die

Forschenden schlussfolgerten daraus einen Zusammenhang mit *TRKB*-Expressionen, einem BDNF-Wachstumsrezeptor, die in untersuchten NSCLC-Patienten erhöht vorlagen und signifikante Korrelationen mit Lymphknotenmetastasen zeigten (149). Weitere Studien stellten heraus, dass Patienten mit hohen *TRKB*- und *BDNF*-Expressionen in NSCLCs bzw. hohen Proteinabundanz in SCLCs eine schlechtere Prognose haben (150) (151). Zudem zeigten A549L^{sub}- im Vergleich zu A549^{WT}-Zellen sowohl in unstimulierten als auch TGFβ1-stimulierten Zellen eine herunterregulierte Genexpression für *SLFN11*, wobei herabgesetzte oder fehlende Expressionen in SCLCs mit einer Chemotherapieresistenz und gesteigerten DNA *damage repair* assoziiert sind (152) (153).

Ein Abgleich der vorliegenden Ergebnisse zu SCLC-Daten könnte weiteren Aufschluss über Parallelen und Unterschiede zu neuroendokrinen Karzinomen geben. Dies ist insbesondere interessant, da bei EGFR-TKI-Therapien Transformationen vom NSCLC- zum SCLC-Subtyp beobachtet werden und davon ausgegangen wird, dass Inhibierungen von EGFR-Signalen ausschlaggebende Faktoren sind (154). Neuronale De-/Differenzierungen und –Prozesse scheinen mit pS2L- und S2^{ΔE3}-Niveaus assoziiert zu sein, die möglicherweise via EGFR-Aktivitäten und nachgeschaltete Signalkaskaden reguliert werden. Interessanterweise wiesen Zelllinien mit *EGFR*-Mutationen höhere S2^{ΔE3}-Niveaus auf, im Vergleich zu *EGFR*-Wildtyp Zellen (3.2).

Zelllinien mit *EGFR*-Mutationen haben höhere S2^{ΔE3}-Niveaus

Aus den vorliegenden Untersuchungen ging hervor, dass beide NSCLC-Zelllinien mit *EGFR*-Mutationen eine höhere S2^{ΔE3}-Abundanz im Vergleich zu *EGFR*-Wildtyp Zelllinien aufwiesen. H1975- tragen eine *EGFR*-Doppelmutation (*T790M/L858R*) und H1650-Zellen eine -Deletion (*Exon19 Del. E746-A750*), die zu konstitutiven Aktivierungen des Rezeptors und dadurch zu einer „Abhängigkeit“ von EGFR-vermittelten Signalen führt (155) (156). Diese stehen mit verschiedenen Signalkaskaden in Verbindung wie bspw. MAPK (Abb. 51, A). Die Ergebnisse legten nahe, dass *EGFR*-Mutationen anscheinend *per se* SMAD2-Spleißvarianten beeinflussen und höhere S2^{ΔE3}-Niveaus nach sich ziehen. In Einklang damit waren die Beobachtungen aus den TGFβ1-Stimulationen, die ebenfalls einen Anstieg von S2^{ΔE3}-Niveaus in A549^{WT}-Zellen zur Folge hatten. Dies ließ vermuten, dass hohe Wachstumsrezeptoraktivitäten mit höheren Niveaus der kurzen Spleißvariante zusammenhängen. Diese Vermutung ging ebenfalls mit den Ergebnissen der KEGG-Analyse

interagierender differenzieller Zielstrukturen von A549L^{sub} vs. A549^{WT} einher, die für EGFR-TKI-Resistenz signifikant angereichert waren. Darunter waren hochregulierte Zielstrukturen für Wachstumsfaktoren zu finden wie bspw. *FGF2*, *TGFA*, *NRG1* und *IGF1*, die wiederum bei Etablierungen von *bypass tracks* als Folgen erworbener EGFR-TKI-Resistenzen in NSCLCs bekannt sind (96). Dadurch sind Tumorzellen in der Lage unterbrochene Signalkaskaden durch andere Wachstumsrezeptoraktivitäten zu kompensieren, die letztlich erneut intrazelluläre Kinasen aktivieren. So wurde bspw. gezeigt, dass FGF/FGFR-Signalwege aufgrund inhibierter EGFRs aktiviert werden. Hingegen wurden NSCLC-Zellen durch *si*-RNA vermittelte Knockdowns von *FGF2* oder *FGFR1* wieder Gefitinib-sensitiv (157) (158). Eine Aktivierung des FGF2/FGFR1-Signalwegs führt dabei bspw. zu Phosphorylierungen von ERK1/2, STAT3 und AKT und resultiert folglich in einer Wiederherstellung von Signalkaskaden, die durch EGFR-TKIs blockiert werden (159). Demnach könnte eine Unterbrechung von Linker-Phosphorylierungen durch intrazelluläre Kinasen zu höheren Expressionen von Wachstumsfaktoren führen, was infolgedessen gesteigerte Wachstumsrezeptoraktivitäten zur Folge hat und höhere S2^{AE3}-Niveaus nach sich zieht bis ein Resistenzmechanismus etabliert wurde (Abb. 51, B).

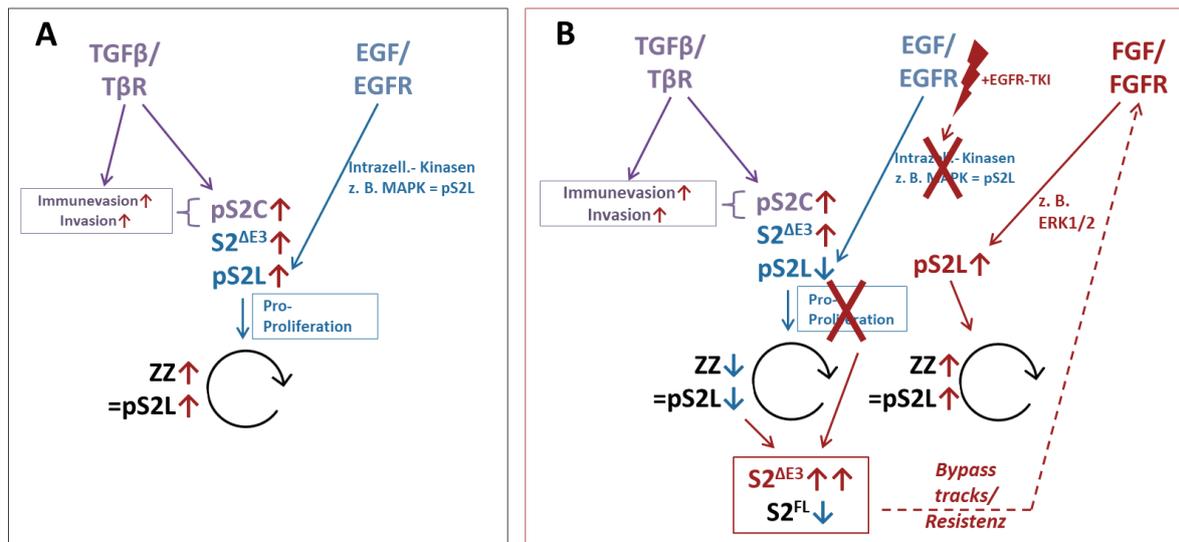


Abb. 51: Hypothese: Therapie-induzierte Veränderungen von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen und $S2^{\Delta E3}$ -Abundanzen tragen zu erworbenen Resistenzen in Krebszellen bei. Vereinfachte und schematische Abbildung zum Einfluss von pS2L auf $S2^{\Delta E3}$ -Abundanzen in Krebszellen. **(A)** Etablierte unbehandelte Krebszellen mit hohen EGFR- und TβR-Aktivitäten führen zu einer gesteigerten Proliferation z. B. via EGF/EGFR-vermittelten SMAD Linker-Phosphorylierungen (z. B. MAPK) (blau), während TGFβ Prozesse wie Immunevasion und Invasion steuert (violett). **(B)** Eine Behandlung mit EGFR-TKIs (z. B. Gefitinib) führt zu einer Abnahme von pS2L. Dadurch werden proliferative Signale unterbrochen und führen zu herabgesetzten Proliferationsraten, die ebenfalls zu verminderten pS2L-Niveaus führen (z.B. durch CDK4/6 und CDK2). Infolgedessen kommt es zu einer höheren $S2^{\Delta E3}$ -Abundanz. $S2^{\Delta E3}$ transloziert in den Nukleus und reaktiviert bspw. Gene der Embryonalentwicklung bzw. frühe Differenzierungsprozesse, was bspw. zu höheren Expressionen von Wachstumsfaktoren und -rezeptoren führt und die Plastizität von Krebszellen fördert. Letztlich führt dies zur Etablierung erworbener Resistenzen (bypass tracks z. B. via FGF/FGFR-Aktivierung) und Wiederherstellung von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen, was eine erneute Tumorprogression ermöglicht (rot). Hinweise: $S2^{\Delta E3}$ = SMAD2 *delta* Exon3; $S2^{FL}$ = SMAD2 *full length*; pS2C = Phospho-SMAD2 C-terminal; ↑ = Erhöht; ↓ = Reduziert; ZZ = Zellzyklus.

A549-Zellen tragen eine *KRAS*-Mutation, die EGFR-unabhängig zu einer konstitutiven Aktivierung des RAS/RAF/MAPK-Signalwegs führt, weshalb diese nicht auf EGFR-TKIs ansprechen. Dennoch beeinflussten fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen Zielstrukturen die mit EGFR-TKI-Resistenzen assoziiert waren. Dies resultierte möglicherweise daraus, dass *KRAS*-abhängige Kinasen keine Phosphorylierungen auf das SMAD2 Linker-Substrat übertragen konnten und ließ die Vermutung zu, dass SMAD2 Linker-Phosphorylierungen bei *EGFR*-Mutationen relevant sind und diese möglicherweise durch EGFR-TKIs unterbunden werden. Infolgedessen würden Phosphorylierungen nur noch vermindert auf intrazelluläre Signalkaskaden übertragen werden. Demnach ist es denkbar, dass aufgrund einer „EGFR-Abhängigkeit“ auch Phosphorylierungen der SMAD2 Linker-Domäne ausbleiben, was die Hypothese einer Kreuzvernetzung von EGF/EGFR-induzierten Signalkaskaden mit dem TGFβ-Signalweg via SMAD2, -3 Linker-Phosphorylierungen laut Literatur unterstützt (13) (46). Als Konsequenz wären ähnliche

Auswirkungen wie bei einer Stimulation mit dem CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib) bzw. Linker-Substitution denkbar. Es bleibt jedoch unklar, ob spezifische Inhibierungen von intrazellulären Kinasen, die Linker-Phosphorylierungen vermitteln, zu den gleichen Effekten führen. Denn offenbar ist nicht die Zellzyklushemmung *per se* entscheidend, sondern welche Kinasen oder Zielstrukturen inhibiert werden (Palbociclib vs. Pirfenidon) und in welcher Zellzyklusphase dies erfolgt (CDK4/6- vs. CDK2-Inhibitor). Ob dies ebenfalls zu veränderten $S2^{\Delta E3}$ -Niveaus führt und letztlich zu Etablierungen erworbener Resistenzen beiträgt, sollte daher näher untersucht werden.

Wie bereits in anderen humanen Karzinomen (z. B. Ovarialkarzinom) gezeigt wurde, scheinen R-SMAD Linker-Phosphorylierungen C-terminal vermittelten anti-proliferativen Phosphorylierungen durch T β R-Komplexe entgegenzuwirken. Wobei EMT-assoziierte TGF β -Signale aufrechterhalten bleiben (12) (160) (Abb. 50, A). Nach einer Etablierung von *bypass tracks* könnten sich demnach erneut „normale“ pS2L-Niveaus einstellen, wenn SMAD2 Linker-Phosphorylierungen durch diese kompensiert werden, was letztlich zur Tumorprogression führt. Um zu untersuchen, ob diese Veränderungen lediglich transient auftreten wären Etablierungen EGFR-TKI-resistenter NSCLC-Zelllinien mit regelmäßiger Prüfung der SMAD2-Spleißvarianten und Phospho-Isoformen aufschlussreich. Ergänzend könnten spezifische Knockdowns von $S2^{FL}$ und $S2^{\Delta E3}$ in $A549L^{sub}$ - und $A549^{WT}$ -Zellen sowie Zelllinien mit *EGFR*-Mutationen Aufschluss über SMAD2-Spleißvarianten-anhängige Regulationen geben, insbesondere aufgrund manifestierter Verhältnisse in $A549L^{sub}$ -Zellen. Darüber hinaus wären Etablierungen von SMAD2 Linker-Substitutionen in Zelllinien mit EGFR-TKI-sensitivem und -resistentem genomischen Hintergrund von Interesse für mögliche therapeutische Kombinationen mit Palbociclib und Pirfenidon.

Darüber hinaus zeigten $A549L^{sub}$ -Zellen ebenfalls eine herunterregulierte *SOX2*-Expression, sowohl in unstimulierten als auch TGF β 1-stimulierten Zellen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass in EGFR-TKI resistenten NSCLC-Zellen eine herunterregulierte *SOX2*-Expression im Zusammenspiel mit TGF β zur Zellplastizität und einer EGFR-TKI-Toleranz beiträgt (161). Dem Gegenüber stehen die Beobachtungen, dass *SOX2*- und *BCL2L1*-Expressionen korrelieren. Eine geringe *BCL2L1*-Expression hat dabei einen positiven Effekt bei Chemotherapie-resistenten Lungenzellen und macht diese wieder sensitiv gegenüber Chemotherapeutika (162). Die Expressionen von *BCL2L1* waren sowohl in

A549L^{sub} als auch A549^{WT} nach TGFβ-Stimulationen herunterreguliert, während dies für SOX2 nur in A549L^{sub} der Fall war. Bei unstimulierten Bedingungen war SOX2 in A549L^{sub} herunterreguliert, während für *BCL2L1* keine veränderte Expression festgestellt wurde. Folglich ergab sich eine Korrelation nur, wenn A549L^{sub}-Zellen mit TGFβ1 stimuliert wurden, aber nicht bei unstimulierten Bedingungen. Eine andere Studie stellte hingegen in zwei unabhängigen NSCLC-Kohorten fest, dass hohe SOX2-Proteinniveaus einen positiven prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben darstellen (163). Des Weiteren spielt SOX2 eine dosisabhängige Rolle bei der Organspezifizierung während der Embryogenese. So differenziert sich bspw. der *anteriore* Teil des Vorderdarms mit einer hohen SOX2-Expression zum Ösophagus und Vormagen aus, während eine herabgesetzte SOX2-Expression zur Differenzierung der Trachea und zum *posterioren* Magen führt (164). Damit reguliert SOX2 Differenzierungsprozesse während der Embryonalentwicklung und scheint durch SMAD2 Linker-Phosphorylierungen bzw. -Spleißvarianten beeinflusst zu werden.

Ob EGFR-TKI-Behandlungen sensitiver NSCLCs sich ebenfalls auf pS2L-Niveaus auswirken und höhere S2^{ΔE3}-Abundanzen nach sich ziehen, sollte daher durch weitere Experimente untersucht werden. Darüber hinaus könnten vergleichende Genexpressionsanalysen EGFR-TKI behandelter NSCLCs Aufschluss über mögliche Parallelen und Unterschiede zu A549L^{sub}-Zellen geben. Ob herunterregulierte *BCL2L1/SOX2*-Korrelationen nach TGFβ1-Stimulationen in A549L^{sub}-Zellen ausreichend für eine höhere Sensitivität gegen Chemotherapeutika sind, sollte ebenfalls nochmals mittels spezifischer Experimente untersucht werden. Durch die vorliegenden Untersuchungen konnte ebenfalls nicht abschließend sichergestellt werden, ob A549L^{sub}-Zellen durch fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen sensitiv bzw. sensitiver gegenüber ERG-TKIs werden und wird derzeit näher untersucht.

Pirfenidon und Palbociclib als S2^{ΔE3}- und pS2L-Antagonisten in Krebstherapien

Die Ergebnisse Pirfenidon stimulierter A549^{WT}-Zellen zeigten stark reduzierte S2^{ΔE3}-Niveaus in den Proteinlysaten. Aus den Daten einer anderen Studie unserer Forschungsgruppe geht hervor, dass die *SMAD2*-Expression in NSCLC-Zellen tendenziell, aber nicht signifikant herunterreguliert war. Auf Proteinebene war hingegen ein signifikant niedrigeres Niveau des SMAD2-Gesamtproteins nachweisbar (2). Der erzeugte G0/G1-Arrest zeigte ebenfalls,

dass dies keine Auswirkungen auf die Linker-Phosphorylierung am S2^{FL} hatte. Des Weiteren könnte eine nicht signifikant reduzierte SMAD2-Expression einen Vorteil für das Patientenüberleben darstellen, da die *in silico* Analysen herausstellten, dass hohe Expressionen in ADCs einen positiven Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben zeigten. Darüber hinaus wurde ebenfalls *in silico* festgestellt, dass geringere S2^{ΔE3}-Expressionen einen Überlebensvorteil für ADC-Patienten hatten. Folgt man der Hypothese, dass S2^{ΔE3}-Niveaus das Differenzierungspotenzial beeinflussen könnte Pirfenidon als potenzieller S2^{ΔE3}-Antagonist für die Krebstherapie interessant sein und S2^{ΔE3}-Translationen entgegenwirken. Als Folge könnte dies die Plastizität von Krebszellen möglicherweise einschränken. Dazu sollte weiterführend untersucht werden, ob die Wirkung in Kombination mit anderen Therapeutika die gleichen Ergebnisse erzielt wie eine Einzelbehandlung oder sich möglicherweise synergistische Effekte ergeben könnten. Gleiches gilt ebenfalls im Hinblick auf eine NSCLC-Behandlung mit Palbociclib (Abb. 51).

| | Mono-Therapie | | | Duale-Therapie | | Triple-Therapie |
|--------------------------------|---------------|--------------------------------|-----------|---------------------------------------|------------------|---|
| Medikamente | PIRF | CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib) | EGFR-TKIs | PIRF + CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib) | PIRF + EGFR-TKIs | PIRF + CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib) + EGFR-TKIs |
| Treibermutation vorausgesetzt? | NEIN | NEIN | JA | NEIN | JA | JA |
| Parameter: | | | | | | |
| pS2L | = | ↓ | ↻ | ↓ | ? | ? |
| S2 ^{ΔE3} | ↓ | ↑ | ↻ | ↓ / = | ? | ? |
| S2 ^{FL} | = | = | ↻ | = | ? | ? |
| pS2C | ↓ | = | = | ↓ / = | ? | ? |
| Potenzielle Effekte: | | | | | | |
| Zellzyklus | ↓ | ↓ | = | ? | ? | ? |
| Differenzierungspotenzial | ↓ ? | ↑ ? | ↓ ? | ? | ? | ? |
| OS/DFS | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ ↑ | ↑ ↑ | ↑ ↑ ↑ |

Potenzielle synergistische Effekte → 

Abb. 52: Hypothese: Potenzielle synergistische Effekte von NSCLC-Kombinationstherapien auf das Gesamtüberleben durch S2^{ΔE3}- und pS2L-Modulationen. Die Abbildung zeigt in vereinfachter und tabellarischer Form, die aus den vorliegenden Untersuchungen oder mittels Literatur nachgewiesenen Parameter bzw. Effekte von Monotherapien in Lungenkrebszellen bzw. -Kohorten (30) (141) (142). Spekulative Annahmen hinsichtlich potenzieller synergistischer Effekte wurden mittels eines Fragezeichens kenntlich gemacht.

Ferner ist zunächst zu analysieren, ob Pirfenidon auch einer erhöhten $S2^{\Delta E3}$ -Abundanz in Zellen mit anderen Mutationen wie bspw. im *EGFR* entgegenwirken kann. Des Weiteren ist von Interesse, ob Pirfenidon die gleiche Wirkung hinsichtlich einer stark verminderten $S2^{\Delta E3}$ -Abundanz erzielt, wenn Zellen bspw. gleichzeitig mit Palbociclib stimuliert werden. Vorausgesetzt es stellen sich synergistische Effekte dar, wären bspw. Etablierungen von dualen EGFR-TKI/- bzw. Palbociclib/Pirfenidon-Therapien denkbar, da es sich um bereits zugelassene Medikamente für andere Erkrankungen handelt. Darüber hinaus wären letztere nicht abhängig von Treibermutationen, was einen Vorteil für Patienten darstellt bei denen TKI-Therapien nicht anwendbar sind bzw. keine Medikamente zur Verfügung stehen wie bspw. bei *KRAS*-Mutationen.

$S2^{\Delta E3}$ und pS2L als neue Therapieziele und Monitoring in der Krebstherapie

Durch die Etablierung einer A549L^{sub}-Zelllinie und konstitutiv fehlenden SMAD2 Linker-Phosphorylierungen ergaben sich signifikante Zusammenhänge mit Differenzierungsprozessen, Embryonalentwicklung und Resistenzmechanismen. Darüber hinaus machten die vorliegenden Untersuchungen deutlich, dass insbesondere die kurze SMAD2-Spleißvariante und Linker-Phosphorylierung modulierbare Zielstrukturen des TGF β -Signalwegs darstellen. Die Untersuchungen mittels des CDK4/6-Inhibitors Palbociclib und Pirfenidon belegten, dass in Abhängigkeit von Therapien grundlegende Unterschiede dieser Zielstrukturen hervorgehen können. Ferner deuteten die Ergebnisse der T-Zellen an, dass Modulierungen in Epithel- und Immunzellen unterschiedliche Effekte aufgrund einer fehlenden $S2^{\Delta E3}$ -Zielstruktur haben könnten. Was ebenfalls für einen benignen und malignen Kontext gilt. Während fehlende Linker-Phosphorylierungen in epithelialen Tumorzellen das Differenzierungspotenzial durch eine „embryonale Transition“ via $S2^{\Delta E3}$ und infolgedessen scheinbar Etablierungen von Resistenzen ermöglichen, könnte dies in T-Zellen *in situ* Differenzierungen zu TH₁₇ durch ausbleibende Linker-Phosphorylierungen am Serin 255 erschweren. Zudem war eine hohe Anzahl pS2L-positiver Tumor- und Immunzellen negativ mit dem Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten assoziiert. Ein denkbares Therapieziel wäre daher eine spezifische Blockierung von pS2L-Ereignissen in Immunzellen bzw. T-Zellen. Wobei nähere Untersuchungen zur T-Zell-Aktivierung bei fehlenden SMAD2 Linker-Phosphorylierungen ausstehend sind. Fraglich ist der zudem, ob $S2^{\Delta E3}$ in Tumor-assoziierten T-Zellen eine Rolle spielt bzw. induziert wird, wenn diese bspw.

mit dem CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib) behandelt werden, wie es bei A549^{WT}-Zellen der Fall war. Sollte sich eine S2^{ΔE3}-Abwesenheit auch nach Stimulationen mit dem CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib) darstellen, könnten weitere Untersuchungen Aufschluss über Mechanismen zur Unterbindung einer S2^{ΔE3}-Translation bzw. Expression liefern, die sich für Krebstherapien nutzen ließen.

In Tumorzellen scheint den derzeitigen Ergebnissen zur Folge eine alleinige pS2L-Blockierung nicht ausreichend zu sein, da sich sowohl nach CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib)-Behandlungen als auch SMAD2-Linker Substitution höhere S2^{ΔE3}-Niveaus einstellten. Daher wäre eine duale Therapie mit pS2L- und S2^{ΔE3}-Inhibierungen anstrebbbar, um einer „embryonalen Transition“ entgegenzuwirken. So würde man bspw. durch fehlende Linker-Phosphorylierungen eine verlangsamte Proliferation und Migration erzielen, während abwesende bzw. reduzierte S2^{ΔE3}-Niveaus die Tumorplastizität einschränken. Dies ließe sich den Ergebnissen nach durch alternierende- oder Kombinationstherapien mit den bereits für andere Erkrankungen zugelassenen Medikamenten Palbociclib (CDK4/6-Inhibitor) und Pirfenidon erreichen.

Insbesondere NSCLC-Zelllinien mit *EGFR*-Mutationen zeigten höhere S2^{ΔE3}-Niveaus. Hier könnte Pirfenidon als Antagonist entgegenwirken und eine ergänzende Option bei Behandlungen *EGFR*-sensitiver NSCLCs darstellen, wie dies bereits zuvor durch Marwitz *et al.* vorgeschlagen wurde (2). Insbesondere Zunahmen von S2^{ΔE3} bei CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib)-Behandlungen von A549^{WT}-Zellen machten deutlich, dass sich die kurze Spleißvariante darüber hinaus für ein mögliches Monitoring in der Krebstherapie erweisen könnte. Durch Veränderungen ließen sich möglicherweise bevorstehende Resistenzen frühzeitig erkennen bzw. Gegenmaßnahmen durch Pirfenidon einleiten. Auch wenn derzeit noch fraglich ist, ob und inwieweit sich die beiden SMAD2-Zielstrukturen bei einer *EGFR*-TKI-Behandlung von NSCLCs darstellen, stehen mit Pirfenidon und Palbociclib Medikamente zur Verfügung, die abhängig von der Beeinflussung dieser Parameter modulierend entgegenwirken. Steigt bspw. S2^{ΔE3} im Laufe einer *EGFR*-TKI-Therapie an, könnte Pirfenidon zum Einsatz kommen. Nehmen hingegen SMAD2 Linker-Phosphorylierungen zu, könnte eher ein CDK4/6-Inhibitor (Palbociclib) das ergänzende Mittel der Wahl darstellen. Entwickeln sich die Parameter wieder gegenläufig könnte ein Wechsel erfolgen. Durch eine gezielte duale Modulation von pS2L und S2^{ΔE3} könnten erworbene Resistenzen hinausgezögert und Proliferationsraten verlangsamt werden.

Darüber hinaus induzierten beide Medikamente *in vitro* einen G0/G1-Arrest in NSCLC-Zellen.

Eine engmaschige Überwachung wäre durch nicht-invasive *liquid biopsies* umsetzbar. Entwicklungen von mRNA-Sonden gegen $S2^{\Delta E3}$ oder spezifischen Antikörper, die beide SMAD2-Spleißvarianten getrennt detektieren könnten somit langfristige Ziele für verbesserte und individuell angepasste NSCLC-Therapien darstellen. Der individuelle Patientenstatus beider SMAD2-Parameter könnte auch für gezielte Vorbehandlungen mit Pirfenidon bzw. Palbociclib vor Beginn einer EGFR-TKI-Therapie von Interesse sein. Dies könnte sich positiv auf das Therapie-Ansprechen und Gesamtüberleben auswirken.

4.5 Fazit: SMAD2-Spleißvarianten und Phospho-Isoformen im TGF β -Signalweg bei NSCLCs

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals für NSCLCs gezeigt, dass SMAD2 Linker-Phosphorylierungen wesentliche Modulatoren TGF β -induzierter Signale sind. Zudem wirkte sich eine hohe Anzahl pS2L-positiver Tumor- und Immunzellen negativ auf das Gesamtüberleben von NSCLC-Patienten aus. Darüber hinaus wurde deutlich, dass insbesondere SMAD2 Linker-Phosphorylierungen mit dem Zellzyklus assoziiert sind. Dies zeigte sich durch Kollokalisierungen und Korrelationen mit phospho-Histon H3 und Pericentrin. Dabei stellten die Untersuchungen heraus, dass es sich anscheinend um einen konservierten Mechanismus handelt, der keimblattübergreifend sowohl in malignen als auch benignen Zellen eine Rolle spielt, was durch T-Zellen gesunder Spender verdeutlicht wurde. In diesen war pS2L ausschließlich in proliferierenden CD3/CD28-aktivierten T-Zellen nachweisbar, was wiederum auf einen möglichen Zusammenhang mit T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung schließen ließ. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die lange SMAD2-Spleißvariante in NSCLC-Zellen die dominante SMAD2-Proteinform ist. Dennoch zeigten sich höhere Abundanzen von $S2^{\Delta E3}$ in Zelllinien mit *EGFR*-Mutationen. Hingegen war $S2^{\Delta E3}$ in T-Zellen gesunder Spender, unabhängig einer Aktivierung, nicht nachweisbar. Dies ließ vermuten, dass $S2^{\Delta E3}$ mit Zellen assoziiert ist, die nicht voll ausdifferenziert sind und eine höhere Plastizität aufweisen wie bspw. AECII und NSCLC-Zellen.

Mittels Etablierung einer A549-Zelllinie mit einer SMAD2 Linker-Substitution (A549L^{sub}) stellten sich durch *in vitro* Analysen partielle Abnahmen von Malignitätsfaktoren in Form einer verlangsamt Proliferation und Wundheilung heraus, wobei eine Invasions- und Kolonieformationseffizienz nicht verändert war. Dies ließ vermuten, dass pS2L anti-

proliferativen TGF β -Signalen entgegenwirkt. Anhand von vergleichbaren pS2C- und SMAD3-Niveaus beider Zelltypen wurde auch bei konstitutiv unterbundenen SMAD2 Linker-Phosphorylierungen eine kanonische TGF β -Signalwegsintegrität nachgewiesen. Dennoch wurden TGF β -Signal-Konvertierungen in Lungenkrebszellen durch fehlende pS2L-Signale signifikant beeinflusst und führten sowohl zu exklusiven als auch inversen Genregulationen. Letztere waren signifikant angereichert für *GO_BP-terms* die mit Embryonalentwicklung und Differenzierung assoziiert waren. Ferner führten fehlende pS2L-Niveaus zu höheren S2 ^{Δ E3}-Abundanzen. Aufgrund des Mitose-abhängigen Auftretens von pS2L wurden die Zellen mit Palbociclib (CDK4/6-Inhibitor) sowie Pirfenidon stimuliert, zwei zugelassene Medikamente für Behandlungen von Brustkrebs und IPF, die einen G0/G1-Arrest in NSCLC-Zelllinien bewirken. Während sich in A549L^{sub} keine Veränderungen ergaben, stellten sich in A549^{WT} nach Palbociclib-Behandlungen stark reduzierte pS2L- und erhöhte S2 ^{Δ E3}-Niveaus dar. Im Gegensatz dazu hatte Pirfenidon keinen Einfluss auf pS2L, aber S2 ^{Δ E3} lag stark reduziert vor. Dies verdeutlichte, dass SMAD2-Zielstrukturen in Abhängigkeit von Therapien unterschiedlich beeinflusst werden können und anscheinend nicht nur Phospho-Isoformen ausschlaggebend sind, sondern ebenfalls SMAD2-Spleißvarianten an denen sie erfolgen. Zudem zeigten sich durch die KEGG-Signalweganalyse mögliche Zusammenhänge mit erworbenen endokrinen- und EGFR-TKI-Resistenzen. Daher ließ sich vermuten, dass S2 ^{Δ E3} zur Tumorplastizität beiträgt, wenn Signalkaskaden durch EGFR-TKIs unterbrochen werden, die SMAD2 Linker-Phosphorylierungen vermitteln.

Die Analysen ergaben, dass pS2L Migration und Proliferation fördert und C-terminalen TGF β -Rezeptor-vermittelten anti-proliferativen Phosphorylierungen entgegenwirken. Es wurde jedoch auch deutlich, dass dies nicht die alleinigen Funktionen waren, da sich ebenfalls ein konservierter Mechanismus von Linker-Phosphorylierungen in der G2/M-Phase darstellte. Darüber hinaus führten unterbundene SMAD2 Linker-Phosphorylierungen zu veränderten Verhältnissen von SMAD2-Spleißvarianten und unterschiedlichen Genregulationen, die überwiegend mit Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen in Zusammenhang standen. Hingegen waren Zellzyklus-assoziierte *GO_BP terms* vordergründig nicht erkennbar. Darüber hinaus führten fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen teilweise zur Umkehrung TGF β -responsiver Genexpressionen. SMAD2 Linker-Phosphorylierungen und Verhältnisse von -Spleißvarianten stellen demnach einen

komplexen Mechanismus dar, der scheinbar von verschiedenen Faktoren wie Zellzyklusphase, Wachstumsrezeptoraktivität, Keimblattabstammung und Differenzierungsstatus abhängt. Dabei scheint es ebenfalls eine Rolle zu spielen, an welcher SMAD2-Spleißvariante welche Phosphorylierungen zu welchem Zeitpunkt auftreten, um verschiedene zelluläre Prozesse während der Embryonalentwicklung und in differenzierten Zellen zu regulieren. Dies ließ vermuten, dass Genregulationen während des Zellzyklus durch Chromatin-Umstrukturierungen via $S2^{FL}$ und $S2^{\Delta E3}$ erfolgen und ebenfalls vom pS2L/pS2C-Status beeinflusst werden. Somit scheinen SMAD2-Spleißvarianten und Phospho-Isoformen Teil eines empfindlichen Gleichgewichtssystems zu sein, das „embryonale- und somatische Transitionen“ ermöglicht und darüber im malignen Kontext zur Plastizität in Tumorzellen beiträgt. Daher stellen insbesondere gezielte duale Modulationen von pS2L und $S2^{\Delta E3}$ durch Pirfenidon und Palbociclib einen neuen Ansatz für NSCLC-Therapien dar, die unabhängig von Treibermutationen sind. Derzeit ist noch unklar wie sich EGFR-TKIs auf pS2L und $S2^{\Delta E3}$ auswirken bzw. fehlende SMAD2 Linker-Phosphorylierungen Tumorzellen mit *EGFR*-Mutationen beeinflussen und wird gegenwärtig untersucht. Gleiches gilt für Regulationsmechanismen von $S2^{\Delta E3}$, über die T-Zellen gesunder Spender Aufschluss geben könnten.

5. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit stellte die Etablierung einer NSCLC Modell-Zelllinie zur Spezifizierung phospho-SMAD2-Linker anhängiger Prozesse ein wirkungsvolles Instrument dar und wurde in einer DZL-Kooperation unter der Leitung von Herrn Prof. Heine am FZB realisiert. Der mechanistische Zusammenhang von SMAD2-Zielstrukturen als Knotenpunkt zu anderen Signalwegen könnte einen neuen Ansatzpunkt für therapeutische Ziele in Krebs- und Immunzellen bieten. Insbesondere SMAD2 Linker-Phosphorylierungen (pS2L) und die kurze Spleißvariante ($S2^{\Delta E3}$) könnten mittels gezielter dualer Modulationen durch Palbociclib und Pirfenidon für Krebstherapien und als Monitoring-Parameter relevant sein.

Durch welche Mechanismen Zellen in der Lage sind, gezielt $S2^{\Delta E3}$ -Niveaus zu regulieren, ist daher von besonderem Interesse. Des Weiteren gilt es aufzuklären inwieweit $S2^{\Delta E3}$ Zellen zur „embryonalen Transition“ befähigt und zur Plastizität von Krebszellen beiträgt. Hierzu sind weitere Untersuchungen im Verbund des DZLs vorgesehen. Die nächsten Schritte werden daher sein, eine SMAD2 Linker-Substitution in Zellen mit TKI-sensitiven und -resistenten *EGFR*-Mutationen zu etablieren. Im Anschluss daran werden diese mit verschiedenen EGFR-TKIs und Chemotherapeutika behandelt, um mögliche Einflüsse auf die Sensitivität zu untersuchen. Ebenfalls werden derzeit Kombinationsbehandlungen mit Palbociclib und Pirfenidon untersucht, um mögliche synergistische Effekte näher zu analysieren. Dabei werden ebenfalls $S2^{\Delta E3}$ und pS2L als potenzielle Monitoring- und Modulationsparameter einbezogen. Langfristig ist dies auch durch *in vivo* Experimente in Mäusen geplant. Darüber hinaus wird derzeit untersucht, wie sich pS2L-Niveaus in verschiedenen Karzinomen im Vergleich zu Normalgeweben darstellen.

Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Mechanismen einer unterdrückten Expression bzw. Translation der kurzen SMAD2-Spleißvariante bieten T-Zellen gesunder Spender. Diese werden mit peripheren- und Tumor-assoziierten T-Zellen von NSCLC-Patienten sowie zu Vorläuferzellen und Lymphomen verglichen. Ferner wird untersucht, ob SMAD2 Linker-Phosphorylierungen zur vollständigen Aktivierung notwendig sind und Differenzierungen von naiven T-Zellen beeinflussen. Dazu werden ebenfalls SMAD2 Linker-Substitutionen in primären T-Zellen vorgenommen. Die Ergebnisse ließen sich möglicherweise in Krebstherapien unabhängig von Treibermutationen anwenden.

6. Zusammenfassung

Lungenkrebs ist eine der führenden Krebstodesursachen weltweit. Bei der Karzinogenese erfährt der TGF β -Signalweg starke Veränderungen, die letztlich zum Verlust anti-proliferativer Wirkungen führen. SMAD2, -3 sind Mediatoren und direkte Substrate des TGF β -Rezeptorkomplexes und translozieren in den Zellkern, um dort als Transkriptionsfaktoren zu fungieren. Dass in NSCLCs eine hohe TGF β -Signalwegsaktivität vorliegt wurde durch eine herunterregulierte Expression des Pseudorezeptors *BAMBI* gezeigt. Darüber hinaus führten Behandlungen mit Pirfenidon in NSCLC-Zelllinien zu signifikant reduzierten C-terminalen Phosphorylierungen am SMAD3. Regulationen sind jedoch nicht auf rezeptorvermittelte Phosphorylierungen beschränkt, sondern werden maßgeblich von intrazellulären Kinasen anderer Signalkaskaden wie bspw. MAPK beeinflusst, die spezifisch Linker-Domänen phosphorylieren. Dies führt zu einer Vielzahl von Phospho-Isoformen, die Gentranskriptionen und damit das Zellschicksal beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurden daher erstmals funktionelle und regulatorische Einflüsse von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen (pS2L) in NSCLCs untersucht.

Mittels einer NSCLC-Kohorte wurde ein signifikant negativer Einfluss auf das Gesamtüberleben festgestellt, wenn eine hohe Anzahl phospho-SMAD2-Linker (pS2L) positiver Tumor- und Immunzellen vorlag. Weiterhin wurde eine Subpopulation mit vielfach höheren pS2L-Niveaus ausschließlich in der G2/M-Phase in fünf NSCLC-Zelllinien nachgewiesen. pS2L war darüber hinaus ausschließlich in proliferierenden CD3/CD28-aktivierten T-Zellen gesunder Spender nachweisbar. Was auf einen konservierten mitoseabhängigen Mechanismus schließen ließ, der keimblattübergreifend in benignen und malignen Zellen eine Rolle spielt. Daher wurde vermutet, dass pS2L anti-proliferativen TGF β -Signalen entgegenwirkt. Zudem war in NSCLC-Zelllinien die lange SMAD2-Spleißvariante (S2^{FL}) die vorherrschende Proteinform, dennoch zeigten bspw. Zelllinien mit *EGFR*-Mutationen eine höhere Abundanz der kurzen SMAD2-Spleißvariante (S2 ^{Δ E3}). Im Gegensatz dazu war S2 ^{Δ E3} in T-Zellen gesunder Spender, unabhängig von Aktivierungen, nicht nachweisbar. Es ist bekannt, dass S2 ^{Δ E3} während der Embryonalentwicklung eine zentrale Rolle einnimmt und legte nahe, dass S2 ^{Δ E3} mit dem zellulären Differenzierungsstatus assoziiert ist. Da es in peripheren T-Zellen nicht vorlag, aber in A549^{WT} und AECII vorhanden war, die beide eine hohe Zellplastizität aufweisen.

Zur Identifizierung pS2L-abhängiger Regulationen, wurde eine A549-Zelllinie mit einer Linker-Substitution etabliert, die pS2L konstitutiv verhinderte (A549L^{sub}). A549L^{sub} wiesen eine verlangsamte Proliferation und Migration auf, behielten aber ihr Invasions- und Koloniebildungspotenzial *in vitro* bei. Hingegen ließen TGFβ1-Stimulationen beider Zelltypen auf einen intakten Signalweg schließen, da C-terminale SMAD2-Phosphorylierungen vergleichbar erhöht vorlagen. Genexpressionsanalysen TGFβ1-stimulierter Zellen führten zu exklusiven und inversen Genregulationen. Letztere waren signifikant angereichert für GO_BP-terms, die u. a. mit neuronalen Differenzierungsprozessen und Embryonalentwicklung assoziiert waren. Daraus wurde deutlich, dass pS2L-Modulationen TGFβ-abhängige Prozesse signifikant beeinflussen, was anscheinend aus einer Vernetzung zu anderen Signalkaskaden resultierte. Darüber hinaus führten abwesende pS2L-Niveaus zu einem S2^{ΔE3}-Anstieg und manifestierten Spleißvariantenverhältnis von 1:1, während in A549^{WT} ein Verhältnis von 20:1 vorlag. In Anbetracht des beobachteten Mitose-abhängigen pS2L-Mechanismus wurden die Zellen mit Palbociclib (CDK4/6-Inhibitor) und Pirfenidon, zugelassene Medikamente zur Behandlung von Brustkrebs bzw. IPF, stimuliert. Beide führten in NSCLC-Zelllinien zu einem G0/G1-Arrest. In A549L^{sub} blieben die Spleißvariantenverhältnisse trotz Stimulationen unverändert, während pS2L und S2^{ΔE3} in A549^{WT}-Zellen modulierbar waren. Palbociclib führte zu erhöhten S2^{ΔE3}- und reduzierten pS2L-Niveaus, während Pirfenidon verringerte S2^{ΔE3}- und unveränderte pS2L-Niveaus zur Folge hatte. Dies ließ vermuten, dass nicht nur Phospho-Isoformen, sondern auch SMAD2-Spleißvarianten ausschlaggebend für vermittelte Regulationen sind und abhängig von Therapien unterschiedlich beeinflusst werden. Darüber hinaus zeigte die KEGG-Signalweganalyse signifikante Assoziationen mit EGFR-TKI-Resistenzen, wenn kein pS2L vorlag. Insgesamt deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass höhere S2^{ΔE3}-Abundanzen aufgrund fehlender pS2L-Ereignisse zu einer „embryonalen Transition“ führen und Prozesse der Embryonalentwicklung reaktivieren, was zur Plastizität von Krebszellen beiträgt. Derzeit ist noch unklar wie sich EGFR-TKIs auf S2^{ΔE3} und pS2L auswirken und wird gegenwärtig untersucht. Mit Pirfenidon und Palbociclib stehen Medikamente als potenzielle pS2L- und S2^{ΔE3}-Antagonisten zur Verfügung. Gezielte duale Modulationen in NSCLCs könnten unabhängig von Treibermutationen Proliferation und Migration verlangsamen sowie erworbene Resistenzen verzögern. Zur Aufklärung welche Mechanismen S2^{ΔE3}-Niveaus regulieren könnten T-Zellen gesunder Spender beitragen.

7. Abstract

Lung cancer is one of the leading causes of cancer death worldwide. During carcinogenesis, TGF β signaling undergoes strong changes leading to a loss of antiproliferative effects. In later stages, TGF β serves as a key factor for carcinogenic EMT. SMAD2, -3 are key regulators and direct substrates of the TGF β receptor complex that mediate C-terminal phosphorylation, which subsequently translocate to the nucleus and acts as transcription factors. That the TGF β pathway is highly active in NSCLCs was demonstrated, for example, by downregulated expression of the pseudoreceptor *BAMBI*. In addition, pirfenidone treatment significantly reduced C-terminal phosphorylation of SMAD3 in NSCLC cell lines. However, regulation of SMAD2, -3 is not limited to receptor-mediated phosphorylation and is significantly influenced by intracellular kinases of other signaling cascades such as MAPK that specifically phosphorylate linker domains. This leads to a variety of phospho isoforms that influence gene transcription and thus the cell fate. Therefore, in the present work, regulatory influences of SMAD2 linker phosphorylation (pS2L) in NSCLCs was investigated for the first time.

For this purpose, NSCLC tissues, five NSCLC cell lines, and primary AECII and T cells were analyzed. In the NSCLC cohort, a significant negative impact on overall survival was analyzed when a high number of phospho-SMAD2 linker (pS2L) positive tumor and immune cells were present. Furthermore, a high pS2L subpopulation was detected exclusively in the G2/M phase of all NSCLC cell lines. Moreover, pS2L was exclusively detectable in proliferating CD3/CD28-activated T cells from healthy donors, suggesting that it is a highly conserved mitosis-dependent mechanism that occurs in a germline-independent manner in benign and malignant cells. Therefore, pS2L was thought to counteract anti-proliferative TGF β signaling, particularly in NSCLCs. Furthermore, the long SMAD2 splice variant ($S2^{FL}$) was the predominant protein form, in NSCLC cell lines. Nevertheless, cell lines with *EGFR* mutations showed higher levels of the short SMAD2 splice variant ($S2^{\Delta E3}$). Surprisingly, $S2^{\Delta E3}$ was not present in T cells from healthy donors, regardless of whether T cells were activated or not. It is known that $S2^{\Delta E3}$ occupies a central role during embryogenesis. This suggests that $S2^{\Delta E3}$ may be associated with cells that are not fully differentiated, as it is absent in peripheral T cells from healthy donors but present in A549^{WT} and AECII, both of which have high cell plasticity.

To identify pS2L-dependent regulation, an A549 cell line was established with a linker substitution to constitutively prevent phosphorylation (A549L^{sub}). A549L^{sub} cells showed a slowed proliferation and decreased migratory ability, but retained their invasion and colony-forming potential *in vitro*. However, TGFβ1 stimulation indicated an intact signaling pathway in both cell types, as C-terminal SMAD2 phosphorylation was similarly increased. Although SMAD2 linker domains are not direct targets for phosphorylation by TGFβ-receptor complexes, gene expression analyses of TGFβ-stimulated cells showed exclusive and inverse gene expression. Latter were significantly enriched for GO_BP terms associated, for example, with neuronal differentiation processes and embryonic development. From this, it became clear that pS2L modulation significantly affects TGFβ-dependent processes, which is likely caused by cross-linking of the TGFβ signaling pathway to other signaling cascades via pS2L. Moreover, the absence of pS2L resulted in an S2^{ΔE3} increase and manifested splice variant ratios of 1:1, whereas in A549^{WT} the ratio was 20:1. In view of the observed mitosis-dependent pS2L mechanism, cells were treated with palbociclib (CDK4/6 inhibitor) and pirfenidone, approved drugs for the treatment of breast cancer and IPF, respectively. Both resulted in G0/G1 arrest in NSCLC cells lines. In contrast to A549L^{sub}, where SMAD2 splice variant ratios remained unchanged, pS2L and S2^{ΔE3} were drug sensitive in A549^{WT} cells. Palbociclib resulted in increased S2^{ΔE3} and decreased pS2L, whereas pirfenidone led to decreased S2^{ΔE3} and unchanged pS2L. This suggests that not only phospho isoforms but also SMAD2 splice variants are crucial for mediated regulation and are differentially affected depending on therapeutic modalities. In addition, KEGG pathway analysis showed significant association with EGFR-TKI resistance in the absence of pS2L. Overall, the results suggest that, for example, the absence of pS2L events results in higher S2^{ΔE3} abundances, leading to "embryonic transition" and reactivating differentiation processes of embryonic development, which contributes to cancer cell plasticity.

Therefore, influences of EGFR-TKI therapies on pS2L and S2^{ΔE3} are currently under investigation. Pirfenidone and palbociclib are potentially available drugs that can act as pS2L and S2^{ΔE3} anatagonists in NSCLCs to take advantage of slowed proliferation, migration, and delay of acquired resistance without depending on driver mutations. Currently, it is still unclear how a lack of linker phosphorylation affects NSCLCs with EGFR mutation background and which mechanisms control the regulation of S2^{ΔE3}. In particular, T cells from healthy donors could help elucidate these mechanisms.

8. Literaturverzeichnis

1. Marwitz S, Depner S, Dvornikov D, Merkle R, Szczygieł M, Müller-Decker K, et al. Downregulation of the TGF β pseudoreceptor BAMBI in non-small cell lung cancer enhances TGF β signaling and invasion. *Cancer Res* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2019 Nov 20];76(13):3785–801. Available from: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/early/2016/05/17/0008-5472.CAN-15-1326>
2. Marwitz S, Turkowski K, Nitschkowski D, Weigert A, Brandenburg J, Reiling N, et al. The Multi-Modal Effect of the Anti-fibrotic Drug Pirfenidone on NSCLC. *Front Oncol*. 2020 Jan 21;9.
3. Marwitz S, Ballesteros-Merino C, Jensen SM, Reck M, Kugler C, Perner S, et al. Phosphorylation of SMAD3 in immune cells predicts survival of patients with early stage non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2021;9:1469. Available from: <http://jitc.bmj.com/>
4. Matsuzaki K. Smad phospho-isoforms direct context-dependent TGF- β signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2013 Aug [cited 2019 Nov 25];24(4):385–99. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610113000609>
5. Matsuzaki K, Kitano C, Murata M, Sekimoto G, Yoshida K, Uemura Y, et al. Smad2 and Smad3 phosphorylated at both linker and COOH-terminal regions transmit malignant TGF- β signal in later stages of human colorectal cancer. *Cancer Res*. 2009;69(13):5321–30.
6. Sapkota G, Brivanlou AH, Montalvo E, Alarcón C, Massagué J, Knockaert M. Dephosphorylation of the Linker Regions of Smad1 and Smad2/3 by Small C-terminal Domain Phosphatases Has Distinct Outcomes for Bone Morphogenetic Protein and Transforming Growth Factor- β Pathways. *J Biol Chem*. 2006;281(52):40412–9.
7. Matsuzaki K. Smad phospho-isoforms direct context-dependent TGF- β signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2013;24(4):385–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.06.002>
8. Massagué J. TGF β in Cancer. *Cell*. 2008;134(2):215–30.
9. Wrighton KH, Lin X, Feng XH. Phospho-control of TGF- β superfamily signaling. *Cell Res*. 2009;19(1):8–20.
10. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation [Internet]. Vol. 144, *Cell*. Elsevier; 2011 [cited 2020 Aug 7]. p. 646–74. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867411001279/fulltext>
11. Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ, Blain SW, Holcombe RF, Mahajna J, et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2015 Dec [cited 2019 Nov 24];35 Suppl(Suppl):S25–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25892662>
12. Matsuzaki K. Smad phosphoisoform signaling specificity: The right place at the right time. *Carcinogenesis*. 2011;32(11):1578–88.
13. Hough C, Radu M, Doré JJE. TGF-beta induced Erk phosphorylation of smad linker region regulates smad signaling. *PLoS One*. 2012;7(8):26–8.
14. Massagué J. Integration of Smad and MAPK pathways: A link and a linker revisited. *Genes Dev*.

- 2003;17(24):2993–7.
15. Dunn NR, Koonce CH, Anderson DC, Islam A, Bikoff EK, Robertson EJ. Mice exclusively expressing the short isoform of Smad2 develop normally and are viable and fertile. *Genes Dev.* 2005 Jan 1;19(1):152–63.
 16. Ueberham U, Lange P, Ueberham E, Brückner MK, Hartlage-Rübsamen M, Pannicke T, et al. Smad2 isoforms are differentially expressed during mouse brain development and aging. *Int J Dev Neurosci* [Internet]. 2009 Aug 16 [cited 2020 Aug 14];27(5):501–10. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.ijdevneu.2009.04.001>
 17. Yagi K, Goto D, Hamamoto T, Takenoshita S, Kato M, Miyazono K. Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Jan 8 [cited 2020 Aug 9];274(2):703–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9873005/>
 18. To T, Viegi G, Cruz A, Taborda-Barata L, Asher I, Behera D, et al. A global respiratory perspective on the COVID-19 pandemic: Commentary and action proposals [Internet]. Vol. 56, *European Respiratory Journal*. European Respiratory Society; 2020 [cited 2020 Oct 17]. Available from: <https://doi.org/10.1183/13993003.01704-2020>
 19. World Health Organisation. The top 10 causes of death [Internet]. [cited 2020 Oct 25]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
 20. Statistisches Bundesamt. Gesundheit - Todesursachen in Deutschland. Destatis [Internet]. 2017;12(4):Wiesbaden. Available from: https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400157004.pdf?__blob=publicationFile
 21. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: Current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res.* 2016 Jun 1;5(3):288–300.
 22. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2015 / 2016. Robert Koch Inst. 2016;160.
 23. Ewig Santiago, Hecker Erich BDM. Lungenkrebs: Individuelle Therapie im zertifizierten Thoraxzentrum - Google Books [Internet]. Stuttgart: Georg Thime Verlag KG; 2014 [cited 2020 Oct 26]. 296 p. Available from: <https://books.google.de/books?id=uf1TBQAAQBAJ&pg=PA14&dq=lungenkrebs&hl=de&sa=X&ved=2ahUKewitnMDnjtPsAhXvz4UKHWN2C4EQ6AEwAXoECAyQAg#v=onepage&q=lungenkrebs&f=false>
 24. Dougall AL. Cancer: Lung. In: *Cambridge Handbook of Psychology, Health and Medicine*, Second Edition [Internet]. Cambridge University Press; 2014 [cited 2020 Oct 25]. p. 605–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482357/>
 25. Pabani A, Butts CA. Current landscape of immunotherapy for the treatment of metastatic non-small-cell lung cancer. *Curr Oncol* [Internet]. 2018 Jun 14 [cited 2019 Nov 23];25(Suppl 1):94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29910652>
 26. Kanwal B, Biswas S, Seminara RS, Jeet C. Immunotherapy in Advanced Non-small Cell Lung Cancer Patients: Ushering Chemotherapy Through the Checkpoint Inhibitors? *Cureus* [Internet]. 2018 Sep 4 [cited 2019 Nov 23];10(9):e3254. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30416904>

27. Reck M, Heigener DF, Mok T, Soria JC, Rabe KF. Management of non-small-cell lung cancer: Recent developments. *Lancet* [Internet]. 2013;382(9893):709–19. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61502-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61502-0)
28. Yang H, Liang SQ, Schmid RA, Peng RW. New horizons in KRAS-mutant lung cancer: Dawn after darkness. Vol. 9, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2019. p. 953.
29. Román M, Baraibar I, López I, Nadal E, Rolfo C, Vicent S, et al. KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: Clinical perspectives on the treatment of an old target [Internet]. Vol. 17, *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd.; 2018 [cited 2020 Aug 6]. Available from: </pmc/articles/PMC5817724/?report=abstract>
30. Marwitz S, Turkowski K, Nitschkowski D, Weigert A, Brandenburg J, Reiling N, et al. The Multi-Modal Effect of the Anti-fibrotic Drug Pirfenidone on NSCLC. *Front Oncol* [Internet]. 2020 Jan 21 [cited 2020 Aug 20];9. Available from: </pmc/articles/PMC6985561/?report=abstract>
31. Pang K, Ryan JF, Baxevanis AD, Martindale MQ. Evolution of the TGF- β signaling pathway and its potential role in the ctenophore, *mnemiopsis leidyi*. *PLoS One* [Internet]. 2011 Sep 8 [cited 2020 Oct 27];6(9). Available from: </pmc/articles/PMC3169577/?report=abstract>
32. Huminiecki L, Goldovsky L, Freilich S, Moustakas A, Ouzounis C, Heldin CH. Emergence, development and diversification of the TGF- signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Evol Biol* [Internet]. 2009 Feb 3 [cited 2020 Oct 27];9(1):28. Available from: <http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-9-28>
33. Massague J, Lo RS. TGF- β Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell*. 2000;103:295–309.
34. Miyazono K. Positive and negative regulation of TGF- β signaling. *J Cell Sci*. 2000;113(7):1101–9.
35. Massague J, Shi Y. Mechanisms of TGF- signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* [Internet]. 2003;113(Figure 2):685–700. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286740300432x>
36. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGF β activation [Internet]. Vol. 116, *Journal of Cell Science*. The Company of Biologists Ltd; 2003 [cited 2020 Oct 27]. p. 217–24. Available from: <https://jcs.biologists.org/content/116/2/217>
37. Massagué J. TGF- β signal transduction [Internet]. Vol. 67, *Annual Review of Biochemistry*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA ; 1998 [cited 2020 Oct 28]. p. 753–91. Available from: www.annualreviews.org
38. Massagué J, Gomis RR. The logic of TGF β signaling. *FEBS Lett*. 2006;580(12):2811–20.
39. Cells HOW, Tgf- R, Massagué J. REVIEWS. 2000;1(December).
40. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors [Internet]. Vol. 19, *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2005 [cited 2020 Oct 29]. p. 2783–810. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/>
41. Samanta D, Datta PK. Alterations in the Smad pathway in human cancers [Internet]. Vol. 17, *Frontiers in Bioscience*. NIH Public Access; 2012 [cited 2020 Oct 30]. p. 1281–93. Available from: </pmc/articles/PMC4281477/?report=abstract>

42. Sekimoto G, Matsuzaki K, Yoshida K, Mori S, Murata M, Seki T, et al. Reversible Smad-dependent signaling between tumor suppression and oncogenesis. *Cancer Res.* 2007;67(11):5090–6.
43. Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways [Internet]. Vol. 19, *Cell Research*. Nature Publishing Group; 2009 [cited 2020 Oct 29]. p. 71–88. Available from: www.cell-research.com
44. Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF- β signals [Internet]. Vol. 118, *Journal of Cell Science*. The Company of Biologists Ltd; 2005 [cited 2020 Oct 28]. p. 3573–84. Available from: <https://jcs.biologists.org/content/118/16/3573>
45. Massague J. Integration of Smad and MAPK pathways: a link and a linker revisited. *Genes Dev* [Internet]. 2003 Dec 15 [cited 2019 Nov 25];17(24):2993–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14701870>
46. Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J. A mechanism of repression of TGF β / Smad signaling by oncogenic Ras. 2015;1–13.
47. Burch ML, Zheng W, Little PJ. Smad linker region phosphorylation in the regulation of extracellular matrix synthesis. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(1):97–107.
48. Yoshida K, Kusuda T, Nishio A, Nakayama S, Okazaki K, Fukui T, et al. The specific linker phosphorylation of Smad2/3 indicates epithelial stem cells in stomach; particularly increasing in mucosae of Helicobacter-associated gastritis. *J Gastroenterol.* 2011;46(4):456–68.
49. Wrighton KH, Willis D, Long J, Liu F, Lin X, Feng XH. Small C-terminal domain phosphatases dephosphorylate the regulatory linker regions of Smad2 and Smad3 to enhance transforming growth factor- β signaling. *J Biol Chem.* 2006;281(50):38365–75.
50. Matsuzaki K. Smad phospho-isoforms direct context-dependent TGF- β signaling. Vol. 24, *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2013. p. 385–99.
51. La Cognata V, D'Agata V, Cavalcanti F, Cavallaro S. Splicing: is there an alternative contribution to Parkinson's disease? [Internet]. Vol. 16, *Neurogenetics*. Springer Verlag; 2015 [cited 2020 Oct 30]. p. 245–63. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10048-015-0449-x>
52. Chen M, Manley JL. Mechanisms of alternative splicing regulation: Insights from molecular and genomics approaches [Internet]. Vol. 10, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. NIH Public Access; 2009 [cited 2020 Oct 30]. p. 741–54. Available from: [/pmc/articles/PMC2958924/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19111111/)
53. Gene: SMAD2 (ENSG00000175387) - Splice variants - Homo sapiens - Ensembl genome browser 100 [Internet]. [cited 2020 Aug 13]. Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Splice?db=core;g=ENSG00000175387;r=18:47808957-47931146
54. SMAD2 SMAD family member 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2020 Aug 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4087>
55. Aragón E, Wang Q, Zou Y, Morgani SM, Ruiz L, Kaczmarek Z, et al. Structural basis for distinct roles of SMAD2 and SMAD3 in FOXH1 pioneer-directed TGF- β signaling. *Genes Dev* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2020 Oct 31];33(21–22):1506–24. Available from: [/pmc/articles/PMC6824466/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33212222/)
56. Waldrip WR, Bikoff EK, Hoodless PA, Wrana JL, Robertson EJ. Smad2 signaling in extraembryonic tissues

- determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell* [Internet]. 1998 Mar 20 [cited 2020 Oct 31];92(6):797–808. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867400814075/fulltext>
57. Faure S, Lee MA, Keller T, Ten Dijke P, Whitman M. Endogenous patterns of TGF β superfamily signaling during early *Xenopus* development. *Development*. 2000 Jul;127(13):2917–31.
 58. Weinstein M, Yang X, Li C, Xu X, Gotay J, Deng CX. Failure of egg cylinder elongation and mesoderm induction in mouse embryos lacking the tumor suppressor smad2. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1998 Aug 4 [cited 2020 Nov 1];95(16):9378–83. Available from: </pmc/articles/PMC21346/?report=abstract>
 59. Dennler S, Huet S, Gauthier JM. A short amino-acid sequence in MH1 domain is responsible for functional differences between Smad2 and Smad3. *Oncogene* [Internet]. 1999 Feb 25 [cited 2020 Nov 1];18(8):1643–8. Available from: <http://www.stockton-press.co.uk/onc>
 60. Dunn NR, Koonce CH, Anderson DC, Islam A, Bikoff EK, Robertson EJ. Mice exclusively expressing the short isoform of Smad2 develop normally and are viable and fertile. *Genes Dev* [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2020 Aug 9];19(1):152–63. Available from: </pmc/articles/PMC540233/?report=abstract>
 61. Alejandro Alcázar MA, Morty RE, Lenzian L, Vohlen C, Oestreicher I, Plank C, et al. Inhibition of TGF- β Signaling and Decreased Apoptosis in IUGR-Associated Lung Disease in Rats. Hartl D, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Oct 20 [cited 2020 Nov 2];6(10):e26371. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0026371>
 62. Wu S, Peng J, Duncan MR, Kasisomayajula K, Grotendorst G, Bancalari E. ALK-5 mediates endogenous and TGF- β 1-induced expression of connective tissue growth factor in embryonic lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2007 May 20 [cited 2020 Nov 2];36(5):552–61. Available from: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2006-0320OC>
 63. Zhao J, Lee M, Smith S, Warburton D. Abrogation of Smad3 and Smad2 or of Smad4 gene expression positively regulates murine embryonic lung branching morphogenesis in culture. *Dev Biol*. 1998 Feb 15;194(2):182–95.
 64. Schwarte-Waldhoff I. Funktionen des Tumorsuppressorgens SMAD4 in der mehrstufigen Karzinogenese. *BIOspektrum*. 2003;03:260–4.
 65. Zhang J, Tian X-J, Xing J. Signal Transduction Pathways of EMT Induced by TGF- β , SHH, and WNT and Their Crosstalks. *J Clin Med*. 2016;5(4):41.
 66. Brandl M, Seidler B, Haller F, Adamski J, Schmid RM, Saur D, et al. IKK α controls canonical TGF β -SMAD signaling to regulate genes expressing SNAIL and SLUG during EMT in Panc1 cells. *J Cell Sci* [Internet]. 2010 Dec 15 [cited 2020 Oct 31];123(24):4231–9. Available from: <https://jcs.biologists.org/content/123/24/4231>
 67. Goldmann T, Zissel G, Watz H, Drömann D, Reck M, Kugler C, et al. Human alveolar epithelial cells type II are capable of TGF β -dependent epithelial-mesenchymal-transition and collagen-synthesis. *Respir Res* [Internet]. 2018 Jul 24 [cited 2020 Aug 13];19(1):138. Available from: <https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-018-0841-9>
 68. Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res* [Internet]. 2005 Dec 9 [cited 2019 Nov 25];6(1):56.

- Available from: <http://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/1465-9921-6-56>
69. Katsuno Y, Meyer DS, Zhang Z, Shokat KM, Akhurst RJ, Miyazono K, et al. Chronic TGF- β exposure drives stabilized EMT, tumor stemness, and cancer drug resistance with vulnerability to bitopic mTOR inhibition. *Sci Signal*. 2019;12(570):1–18.
 70. Borowicz S, Van Scoyk M, Avasarala S, Karuppusamy Rathinam MK, Tauler J, Bikkavilli RK, et al. The soft agar colony formation assay. *J Vis Exp [Internet]*. 2014 Oct 27 [cited 2020 Oct 16];(92):51998. Available from: </pmc/articles/PMC4353381/?report=abstract>
 71. Haynes JL. Principles of flow cytometry. *Cytometry [Internet]*. 1988 Jan 1 [cited 2020 Oct 10];9(S3):7–17. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.990090804>
 72. Shapiro HM. Practical Flow Cytometry [Internet]. Practical Flow Cytometry. Wiley; 2003 [cited 2020 Oct 10]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0471722731>
 73. Parra ER, Jiang M, Solis L, Mino B, Laberiano C, Hernandez S, et al. Procedural requirements and recommendations for multiplex immunofluorescence tyramide signal amplification assays to support translational oncology studies [Internet]. Vol. 12, *Cancers*. MDPI AG; 2020 [cited 2021 Jan 26]. Available from: </pmc/articles/PMC7072187/?report=abstract>
 74. Parra ER, Francisco-Cruz A, Wistuba II. State-of-the-art of profiling immune contexture in the era of multiplexed staining and digital analysis to study paraffin tumor tissues [Internet]. Vol. 11, *Cancers*. MDPI AG; 2019 [cited 2021 Jan 26]. Available from: </pmc/articles/PMC6406364/?report=abstract>
 75. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct 1;150(1):76–85.
 76. Svasti J, Panijpan B. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis - A simple explanation of why it works. *J Chem Educ*. 1977;54(9):560–2.
 77. Walker JM, Smith BJ. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In: *Proteins [Internet]*. Humana Press; 2003 [cited 2020 Oct 10]. p. 41–56. Available from: <https://link.springer.com/protocol/10.1385/0-89603-062-8:41>
 78. Gibbons J. Western Blot: Protein transfer overview [Internet]. Vol. 6, *North American Journal of Medical Sciences*. North American Journal of Medical Sciences; 2014 [cited 2020 Oct 11]. p. 158–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3978941/>
 79. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol [Internet]*. 2006 Jan 31 [cited 2020 Oct 4];7:3. Available from: </pmc/articles/PMC1413964/?report=abstract>
 80. Zhang H, Zhang J, Lang Z, Botella JR, Zhu J-K. Genome Editing—Principles and Applications for Functional Genomics Research and Crop Improvement. *CRC Crit Rev Plant Sci [Internet]*. 2017 Jul 4 [cited 2020 Oct 4];36(4):291–309. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07352689.2017.1402989>
 81. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell [Internet]*. 2013 Sep 12 [cited 2020 Aug 24];154(6):1380–9. Available from: </pmc/articles/PMC3856256/?report=abstract>
 82. Györffy B, Surowiak P, Budczies J, Lánczky A. Online survival analysis software to assess the prognostic

- value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PLoS One* [Internet]. 2013 Dec 18 [cited 2020 Nov 6];8(12):82241. Available from: [/pmc/articles/PMC3867325/?report=abstract](#)
83. Victor A, Elsässer A, Hommel G, Blettner M. Übersichtsarbeit Wie bewertet man die p-Wert-Flut?: Hinweise zum umgang mit dem multiplen testen teil 10 der serie zur bewertung wissenschaftlicher publikationen. *Dtsch Arztebl.* 2010;107(4):50–6.
 84. Ding L, Cao J, Lin W, Chen H, Xiong X, Ao H, et al. The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer [Internet]. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020 [cited 2020 Aug 19]. Available from: [/pmc/articles/PMC7139603/?report=abstract](#)
 85. Delaval B, Doxsey SJ. Pericentrin in cellular function and disease [Internet]. Vol. 188, *Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press; 2010 [cited 2020 Nov 18]. p. 181–90. Available from: [/pmc/articles/PMC2812529/?report=abstract](#)
 86. Choi HS, Choi BY, Cho YY, Mizuno H, Kang BS, Bode AM, et al. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is indispensable for neoplastic cell transformation. *Cancer Res.* 2005;65(13):5818–27.
 87. Hans F, Dimitrov S. Histone H3 phosphorylation and cell division [Internet]. Vol. 20, *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2001 [cited 2020 Sep 3]. p. 3021–7. Available from: [www.nature.com/onc](#)
 88. Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, et al. In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2019 Jun 14 [cited 2020 Nov 26];7(JUN):107. Available from: [https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2019.00107/full](#)
 89. Kim D, Xing T, Yang Z, Dudek R, Lu Q, Chen Y-H. Epithelial Mesenchymal Transition in Embryonic Development, Tissue Repair and Cancer: A Comprehensive Overview. *J Clin Med* [Internet]. 2017 Dec 22 [cited 2020 Jul 6];7(1):1. Available from: [/pmc/articles/PMC5791009/?report=abstract](#)
 90. Ammerpohl O, Haake A, Kolarova J, Siebert R. Quantitative DNA methylation profiling in cancer. In: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. Humana Press Inc.; 2016 [cited 2021 Feb 23]. p. 75–92. Available from: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26667456/](#)
 91. Ammerpohl O, Martín-Subero JI, Richter J, Vater I, Siebert R. Hunting for the 5th base: Techniques for analyzing DNA methylation [Internet]. Vol. 1790, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. *Biochim Biophys Acta*; 2009 [cited 2021 Feb 23]. p. 847–62. Available from: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19364478/](#)
 92. Ammerpohl O, Bens S, Siebert R. Der Über-Code der DNA: Epigenetische Mechanismen und deren Bedeutung für die Entstehung von Krankheiten. *LaboratoriumsMedizin* [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2021 Feb 24];37(6):317–28. Available from: [http://de.wikipedia.](#)
 93. Chen L, Liu S, Tao Y. Regulating tumor suppressor genes: post-translational modifications [Internet]. Vol. 5, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2020 [cited 2020 Nov 3]. p. 1–25. Available from: [https://doi.org/10.1038/s41392-020-0196-9](#)
 94. Wang YC, Peterson SE, Loring JF. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells [Internet]. Vol. 24, *Cell Research*. Nature Publishing Group; 2014 [cited 2021 Feb 24]. p. 143–60. Available from: [www.cell-research.com](#)

95. Coldren CD, Helfrich BA, Witta SE, Sugita M, Lapadat R, Zeng C, et al. Baseline gene expression predicts sensitivity to gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2006 Aug [cited 2020 Aug 10];4(8):521–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16877703/>
96. Clairambault J, Shen S. Cell plasticity in cancer cell populations. Vol. 9, F1000Research. F1000 Research Ltd; 2020.
97. Anagnostou VK, Lowery FJ, Zolota V, Tzelepi V, Gopinath A, Liceaga C, et al. High expression of BCL-2 predicts favorable outcome in non-small cell lung cancer patients with non squamous histology. *BMC Cancer* [Internet]. 2010 May 9 [cited 2021 Feb 25];10(1):186. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-186>
98. Ueberham U, Lange P, Ueberham E, Brückner MK, Hartlage-Rübsamen M, Pannicke T, et al. Smad2 isoforms are differentially expressed during mouse brain development and aging. *Int J Dev Neurosci* [Internet]. 2009 Aug 16 [cited 2020 Aug 14];27(5):501–10. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.ijdevneu.2009.04.001>
99. Massagué J. Reviews: How cells read TGF-beta signals. *J Oral Implantol* [Internet]. 2010;36(4):328–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20824923>
100. Kishimoto M, Fukui T, Suzuki R, Takahashi Y, Sumimoto K, Okazaki T, et al. Phosphorylation of Smad2/3 at Specific Linker Threonine Indicates Slow-Cycling Intestinal Stem-Like Cells Before Reentry to Cell Cycle. *Dig Dis Sci*. 2015;60(2):362–74.
101. Liu Y, Cheng D, Li Z, Gao X, Wang H. The gene expression profiles of induced pluripotent stem cells (iPSCs) generated by a non-integrating method are more similar to embryonic stem cells than those of iPSCs generated by an integrating method. *Genet Mol Biol* [Internet]. 2012;35(3):693. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23055811>
102. Rizzino A. Sox2 and Oct-3/4: A Versatile Pair of Master Regulators that Orchestrate the Self-renewal and Pluripotency of Embryonic Stem Cells by Functioning as Molecular Rheostats. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009;
103. Keefe DL, Winkler N. Embryology. In: *General Gynecology*. Elsevier Inc.; 2007. p. 1–20.
104. Gu A Di, Wang Y, Lin L, Zhang SS, Wan YY. Requirements of transcription factor Smad-dependent and -independent TGF- β signaling to control discrete T-cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Jan 17 [cited 2021 Jan 9];109(3):905–10. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1108352109
105. Yang X. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta. *EMBO J* [Internet]. 1999 Mar 1 [cited 2021 Jun 26];18(5):1280–91. Available from: <https://www.embopress.org/doi/full/10.1093/emboj/18.5.1280>
106. Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, et al. Smad2 and Smad3 Are Redundantly Essential for the TGF- β -Mediated Regulation of Regulatory T Plasticity and Th1 Development. *J Immunol* [Internet]. 2010 Jul 15 [cited 2020 Sep 6];185(2):842–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20548029/>
107. Sandberg Y, Verhaaf B, van Gastel-Mol EJ, Wolvers-Tettero ILM, de Vos J, MacLeod RAF, et al. Human T-cell lines with well-defined T-cell receptor gene rearrangements as controls for the BIOMED-2 multiplex

- polymerase chain reaction tubes. *Leukemia*. 2007;21(2):230–7.
108. Yoon JH, Sudo K, Kuroda M, Kato M, Lee IK, Han JS, et al. Phosphorylation status determines the opposing functions of Smad2/Smad3 as STAT3 cofactors in T_H17 differentiation. *Nat Commun* [Internet]. 2015;6(May):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms8600>
 109. Wang R, Yang L, Zhang C, Wang R, Zhang Z, He Q, et al. Th17 cell-derived IL-17A promoted tumor progression via STAT3/NF- κ B/Notch1 signaling in non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* [Internet]. 2018 Nov 2 [cited 2021 Jun 12];7(11). Available from: </pmc/articles/PMC6205058/>
 110. Tu E, Chia CPZ, Chen W, Zhang D, Park SA, Jin W, et al. T Cell Receptor-Regulated TGF- β Type I Receptor Expression Determines T Cell Quiescence and Activation. *Immunity* [Internet]. 2018 Apr 17 [cited 2020 Sep 6];48(4):745-759.e6. Available from: </pmc/articles/PMC5911925/?report=abstract>
 111. Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. Vol. 50, *Immunity*. Cell Press; 2019. p. 924–40.
 112. Dahmani A, Delisle J-S. TGF- β in T Cell Biology: Implications for Cancer Immunotherapy. 2018; Available from: www.mdpi.com/journal/cancers
 113. Alberto Rodríguez-Castillo J, Bravo Pérez D, Ntokou A, Seeger W, Morty RE, Ahlbrecht K. Understanding alveolarization to induce lung regeneration. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0837-5>
 114. Lin C, Song H, Huang C, Yao E, Gacayan R, Xu S-M, et al. Alveolar Type II Cells Possess the Capability of Initiating Lung Tumor Development. Morrisey E, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Dec 20 [cited 2021 Jan 14];7(12):e53817. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0053817>
 115. Galli F, Aguilera JV, Palermo B, Markovic SN, Nisticò P, Signore A. Relevance of immune cell and tumor microenvironment imaging in the new era of immunotherapy [Internet]. Vol. 39, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. BioMed Central Ltd.; 2020 [cited 2021 Mar 17]. p. 1–21. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01586-y>
 116. Smith J, Zyoud A, Allegrucci C. *cancers A Case of Identity: HOX Genes in Normal and Cancer Stem Cells*. 2019;
 117. Wang J, Li D, Cang H, Guo B. Crosstalk between cancer and immune cells: Role of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Med* [Internet]. 2019 Aug 20 [cited 2021 Mar 17];8(10):4709–21. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cam4.2327>
 118. XU F, WEI Y, TANG Z, LIU B, DONG J. Tumor-associated macrophages in lung cancer: Friend or foe? [Internet]. Vol. 22, *Molecular Medicine Reports*. Spandidos Publications; 2020 [cited 2021 May 9]. p. 4107–15. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2020.11518/abstract>
 119. Zheng X, Weigert A, Reu S, Guenther S, Mansouri S, Bassaly B, et al. Spatial density and distribution of tumor-associated macrophages predict survival in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* [Internet]. 2020 Oct 15 [cited 2021 May 9];80(20):4414–25. Available from: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/80/20/4414>
 120. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer [Internet]. Vol. 7, *American Journal of Cancer Research*. E-Century Publishing Corporation; 2017 [cited 2021 Jan 17]. p. 1016–36. Available from: www.ajcr.us/ISSN:2156-6976/ajcr0053932

121. Yang F, Camp DG, Gritsenko MA, Luo Q, Kelly RT, Clauss TRW, et al. Identification of a novel mitotic phosphorylation motif associated with protein localization to the mitotic apparatus. *J Cell Sci* [Internet]. 2007 Nov 15 [cited 2021 Jan 24];120(22):4060–70. Available from: <https://jcs.biologists.org/content/120/22/4060>
122. Kamato D, Little PJ. Smad2 linker region phosphorylation is an autonomous cell signalling pathway: Implications for multiple disease pathologies. Vol. 124, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS; 2020. p. 109854.
123. Hirschhorn T, Barizilay L, Smorodinsky NI, Ehrlich M. Differential regulation of Smad3 and of the type II transforming growth factor- β receptor in mitosis: Implications for signaling. Guerrero-Hernandez A, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Aug 22 [cited 2021 Jan 15];7(8):e43459. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0043459>
124. Komar D, Juszczynski P. Rebelled epigenome: histone H3S10 phosphorylation and H3S10 kinases in cancer biology and therapy [Internet]. Vol. 12, *Clinical Epigenetics*. BioMed Central Ltd; 2020 [cited 2021 Jan 9]. p. 147. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00941-2>
125. Guerrero-Martínez JA, Ceballos-Chávez M, Koehler F, Peiró S, Reyes JC. TGF β promotes widespread enhancer chromatin opening and operates on genomic regulatory domains. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Mar 19];11(1):1–20. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19877-5>
126. Coda DM, Gaarenstroom T, East P, Patel H, Miller DSJ, Lobley A, et al. Distinct modes of SMAD2 chromatin binding and remodeling shape the transcriptional response to NODAL/Activin signaling. *Elife*. 2017 Feb 13;6.
127. Zahm J-M, Kaplan H, Hérard A-L, Doriot F, Pierrot D, Somelette P, et al. Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium. *Cell Motil Cytoskeleton* [Internet]. 1997 Jan 1 [cited 2021 Mar 11];37(1):33–43. Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1997\)37:1%3C33::AID-CM4%3E3.0.CO;2-I](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0169(1997)37:1%3C33::AID-CM4%3E3.0.CO;2-I)
128. Gardner A, Borthwick LA, Fisher AJ. Lung epithelial wound healing in health and disease. *Expert Rev Respir Med*. 2010;4(5):647–60.
129. Schaeffer D, Somarelli JA, Hanna G, Palmer GM, Garcia-Blanco MA. Cellular Migration and Invasion Uncoupled: Increased Migration Is Not an Inexorable Consequence of Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2014;34(18):3486. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25002532>
130. Kim BN, Ahn DH, Kang N, Yeo CD, Kim YK, Lee KY, et al. TGF- β induced EMT and stemness characteristics are associated with epigenetic regulation in lung cancer. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Mar 11];10(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67325-7>
131. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF- β signaling [Internet]. Vol. 19, *Cell Research*. NIH Public Access; 2009 [cited 2020 Oct 28]. p. 128–39. Available from: </pmc/articles/PMC2635127/?report=abstract>
132. Zhang J, Tian XJ, Chen YJ, Wang W, Watkins S, Xing J. Pathway crosstalk enables cells to interpret TGF- β duration. *npj Syst Biol Appl* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2020 Oct 10];4(1):18. Available from: www.nature.com/npjbsa

133. Borowicz S, Van Scoyk M, Avasarala S, Karuppusamy Rathinam MK, Tauler J, Bikkavilli RK, et al. The soft agar colony formation assay. *J Vis Exp* [Internet]. 2014 Oct 27 [cited 2020 Nov 27];(92):51998. Available from: [/pmc/articles/PMC4353381/?report=abstract](#)
134. Horibata S, Vo T V., Subramanian V, Thompson PR, Coonrod SA. Utilization of the soft agar colony formation assay to identify inhibitors of tumorigenicity in breast cancer cells. *J Vis Exp* [Internet]. 2015 May 20 [cited 2021 Mar 11];2015(99):52727. Available from: [/pmc/articles/PMC4542786/](#)
135. Aragón E, Wang Q, Zou Y, Morgani SM, Ruiz L, Kaczmarek Z, et al. Structural basis for distinct roles of SMAD2 and SMAD3 in FOXH1 pioneer-directed TGF- β signaling. *Genes Dev* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2020 Aug 16];33(21–22):1506–24. Available from: [/pmc/articles/PMC6824466/?report=abstract](#)
136. Pandey K, An HJ, Kim SK, Lee SA, Kim S, Lim SM, et al. Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: A review. Vol. 145, *International Journal of Cancer*. Wiley-Liss Inc.; 2019. p. 1179–88.
137. Jiang YJ. The Role of SMAD2/3 in Human Embryonic Stem Cells. *Front. Cell Dev Biol* [Internet]. 2020;8:653. Available from: [www.frontiersin.org](#)
138. Liu L, Liu X, Ren X, Tian Y, Chen Z, Xu X, et al. Smad2 and Smad3 have differential sensitivity in relaying TGF β signaling and inversely regulate early lineage specification. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(September 2015):1–14. Available from: [http://dx.doi.org/10.1038/srep21602](#)
139. Watt AC, Cejas P, DeCristo MJ, Metzger-Filho O, Lam EYN, Qiu X, et al. CDK4/6 inhibition reprograms the breast cancer enhancer landscape by stimulating AP-1 transcriptional activity. *Nat Cancer* [Internet]. 2021;2(1):34–48. Available from: [http://dx.doi.org/10.1038/s43018-020-00135-y](#)
140. Nie H, Zhou X, Shuzhang D, Nie C, Zhang X, Huang J. Palbociclib overcomes afatinib resistance in non-small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother*. 2019 Jan 1;109:1750–7.
141. Qin Q, Li X, Liang X, Zeng L, Wang J, Sun L, et al. CDK4/6 inhibitor palbociclib overcomes acquired resistance to third-generation EGFR inhibitor osimertinib in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer* [Internet]. 2020 Sep 16 [cited 2021 May 11];11(9):2389–97. Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1759-7714.13521](#)
142. Deng J, Wang ES, Jenkins RW, Li S, Dries R, Yates K, et al. CDK4/6 inhibition augments antitumor immunity by enhancing T-cell activation. *Cancer Discov* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2021 Mar 7];8(2):216–33. Available from: [www.aacrjournals.org](#)
143. Lai AY, Sorrentino JA, Dragnev KH, Weiss JM, Owonikoko TK, Rytlewski JA, et al. CDK4/6 inhibition enhances antitumor efficacy of chemotherapy and immune checkpoint inhibitor combinations in preclinical models and enhances T-cell activation in patients with SCLC receiving chemotherapy. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2020;8:847. Available from: [http://jitc.bmj.com/](#)
144. Oronsky B, Ma PC, Morgensztern D, Carter CA. Nothing But NET: A Review of Neuroendocrine Tumors and Carcinomas [Internet]. Vol. 19, *Neoplasia (United States)*. Neoplasia Press, Inc.; 2017 [cited 2021 Mar 11]. p. 991–1002. Available from: [/pmc/articles/PMC5678742/](#)
145. Sequist L V., Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* [Internet]. 2011 Mar 23 [cited 2020 Aug 28];3(75):75ra26. Available from:

- /pmc/articles/PMC3132801/?report=abstract
146. Jung E, Alfonso J, Monyer H, Wick W, Winkler F. Neuronal signatures in cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2020 Dec 15 [cited 2021 Jun 19];147(12):3281–91. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.33138>
 147. Cervantes-Villagrana RD, Albores-García D, Cervantes-Villagrana AR, García-Acevez SJ. Tumor-induced neurogenesis and immune evasion as targets of innovative anti-cancer therapies. Vol. 5, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2020. p. 1–23.
 148. Arese M, Bussolino F, Pergolizzi M, Bizzozero L, Pascal D. Tumor progression: the neuronal input. *Ann Transl Med* [Internet]. 2018 Mar [cited 2020 Jul 29];6(5):89–89. Available from: </pmc/articles/PMC5890045/?report=abstract>
 149. Zhang S, Guo D, Luo W, Zhang Q, Zhang Y, Li C, et al. TrkB is highly expressed in NSCLC and mediates BDNF-induced the activation of Pyk2 signaling and the invasion of A549 cells. *BMC Cancer* [Internet]. 2010 Feb 16 [cited 2021 Jun 19];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20156366/>
 150. Okamura K, Harada T, Wang S, Ijichi K, Furuyama K, Koga T, et al. Expression of TrkB and BDNF is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* [Internet]. 2012 Oct [cited 2021 Jun 20];78(1):100–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22906736/>
 151. Kimura S, Harada T, Ijichi K, Tanaka K, Liu R, Shibahara D, et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB is associated with poor prognosis and a malignant phenotype in small cell lung cancer. *Lung Cancer* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2021 Jun 20];120:98–107. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29748024/>
 152. Berns K, Berns A. Awakening of “Schlafen11” to Tackle Chemotherapy Resistance in SCLC. Vol. 31, *Cancer Cell*. Cell Press; 2017. p. 169–71.
 153. Inno A, Stagno A, Gori S. Schlafen-11 (SLFN11): a step forward towards personalized medicine in small-cell lung cancer? *Transl Lung Cancer Res* [Internet]. 2018;7(Suppl 4):S341. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30705850>
 154. Oser MG, Niederst MJ, Sequist L V, Engelman JA. Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. *Lancet Oncol* [Internet]. 2015;16(4):e165. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25846096>
 155. Li R, Zhou M, Li J, Wang Z, Zhang W, Yue C, et al. Identifying EGFR-expressed cells and detecting EGFR multi-mutations at single-cell level by microfluidic chip. *Nano-Micro Lett* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2021 Jan 14];10(1):1–10. Available from: <http://doi.org/10.1007/s40820-017-0168-y>
 156. Yang CH, Chou HC, Fu YN, Yeh CL, Cheng HW, Chang IC, et al. EGFR over-expression in non-small cell lung cancers harboring EGFR mutations is associated with marked down-regulation of CD82. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2015 Jul 1;1852(7):1540–9.
 157. Yu T, Xia Q, Gong T, Wang J, Zhong D. Molecular mechanism of acquired drug resistance in the EGFR-TKI resistant cell line HCC827-TR. *Thorac Cancer* [Internet]. 2020 May 12 [cited 2021 Jun 11];11(5):1129–38. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1759-7714.13342>
 158. Terai H, Soejima K, Yasuda H, Nakayama S, Hamamoto J, Arai D, et al. Activation of the FGF2-FGFR1 autocrine pathway: A novel mechanism of acquired resistance to gefitinib in NSCLC. *Mol Cancer Res*

- [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2021 Jun 10];11(7):759–67. Available from: <http://mcr.aacrjournals.org/>
159. Zhou Y, Wu C, Lu G, Hu Z, Chen Q, Du X. FGF/FGFR signaling pathway involved resistance in various cancer types. Vol. 11, *Journal of Cancer*. Ivyspring International Publisher; 2020. p. 2000–7.
160. Dunfield LD, Nachtigal MW. Inhibition of the antiproliferative effect of TGF β by EGF in primary human ovarian cancer cells. *Oncogene* [Internet]. 2003 Jul 24 [cited 2021 Jun 10];22(30):4745–51. Available from: www.nature.com/onc
161. Kuo M-H, Lee A-C, Hsiao S-H, Lin S-E, Chiu Y-F, Yang L-H, et al. Cross-talk between SOX2 and TGF β Signaling Regulates EGFR–TKI Tolerance and Lung Cancer Dissemination. *Cancer Res* [Internet]. 2020 Oct 15 [cited 2020 Dec 31];80(20):4426–38. Available from: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/80/20/4426>
162. Chou Y-T, Lee C-C, Hsiao S-H, Lin S-E, Lin S-C, Chung C-H, et al. The Emerging Role of SOX2 in Cell Proliferation and Survival and Its Crosstalk with Oncogenic Signaling in Lung Cancer. *Stem Cells* [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2020 Jun 12];31(12):2607–19. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/stem.1518>
163. Velcheti V, Schalper K, Yao X, Cheng H, Kocoglu M, Dhodapkar K, et al. High SOX2 Levels Predict Better Outcome in Non-Small Cell Lung Carcinomas. *PLoS One* [Internet]. 2013 Apr 19 [cited 2021 Jun 10];8(4). Available from: [/pmc/articles/PMC3631238/](http://pmc/articles/PMC3631238/)
164. Zhang S, Xiong X, Sun Y. Functional characterization of SOX2 as an anticancer target [Internet]. Vol. 5, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2020 [cited 2021 Mar 12]. p. 1–17. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00242-3>

9. Anhänge

Anhang I: Verwendete Reagenzien, Chemikalien & Kits

| Bezeichnung | Firma | Verwendung |
|--|-----------------------|----------------------------|
| 2-Well Self-Insertion Culture Einsätze | Ibidi | Wundheilungs-Assay |
| 4',6'-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) | BioLegend | IFM; DFZ |
| Accutase | MilliPore | AECII |
| Agarose UltraPure™ | Thermo Fisher | Allgemein |
| Agarose UltraPure™ Low Melting Point | Thermo Fisher | Kolonieformations-Assay |
| AllPrep™ DNA/RNA Mini Kit | Qiagen | DNA/RNA-Extraktion |
| Ampicillin | Thermo Fisher | CRISPR/Cas9 |
| Antibody Diluent | Zytomed Systems | mIHC |
| Antigen-Retrieval Puffer (pH6) | Akoya Bioscience | mIHC |
| Aqua ad iniectabilia | B. Braun | Zellkultur, Allgemein |
| Biocoll | Biochrom | AECII; T-Zellen Extraktion |
| Bovine Serum Albumin (BSA) | Merck | IFM |
| Bromphenolblau | Biochrom | Agarose-Gelelektrophorese |
| CD45-Beads, human | Miltenyi Biotech | AECII |
| CDK1-Inhibitor (S7747) | Selleckchem | Zellkultur |
| CDK2-Inhibitor (S8100) | Selleckchem | Zellkultur |
| CDK4/6-Inhibitor (S1116) | Selleckchem | Zellkultur |
| Cell Recovery Solution | Corning | Invasions-Assay |
| CellTrace™ Far Red | Thermo Fisher | Proliferations-Assay |
| Chameleon® Duo pre-stained Ladder | LiCOR | Western Blot |
| CutSmart Puffer | New England Biolabs | CRISPR/Cas9 |
| Cyanine-3 | Agilent | Transkriptom |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma Aldrich | Zellkultur |
| Di-natriumhydrogenphosphat | Merck | Allgemein |
| Di-natriumhydrogenphosphat | Merck | Allgemein |
| Dispase II | Roche Applied Science | AECII |
| Dithiotreitol (DTT) | Sigma Aldrich | SDS-Gelelektrophorese |
| DNA Ladepuffer (6x) | Thermo Fisher | Agarose-Gelelektrophorese |
| DNase I | Roche Applied Science | AECII |
| dNTP-Mix | Invitrogen | PCR |
| E. coli DHα (kompetent) Kit | New England Biolabs | CRISPR/Cas9 |
| Eisessig (100%) | Merck | Allgemein |
| Ethanol (100%) | Merck | Allgemein |
| Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA) | Merck | Allgemein |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Biochrom | Zellkultur |
| Fluoromount G | Thermo Fisher | IFM |
| Gasket Slides | Agilent | Transkriptom |
| Gene Expression Hybridization Kit | Agilent | Transkriptom |
| GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus | Thermo Fisher | Agarose-Gelelektrophorese |
| Gibco™ DYNAL™ Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 | Thermo Fisher | T-Zellen Extraktion |
| Glukose | Sigma Aldrich | Allgemein |
| Glycerol | Merck | Allgemein |
| Haell | New England Biolabs | CRISPR/Cas9 |
| HiPure Plasmid Mini Kit | Thermo Fisher | CRISPR/Cas9 |
| Human GE 4x44K V2 Microarrays | Agilent | Transkriptom |
| Hybridisierungskammern | Agilent | Transkriptom |
| Hybridisierungssofen | Agilent | Transkriptom |
| Hybridisierungspuffer Kit | Agilent | Transkriptom |

| | | |
|--|-----------------------------|---------------------------------------|
| Kaliumchlorid | Merck | Allgemein |
| Kalium-di-hydrogenphosphat | Merck | Allgemein |
| Kalziumchlorid | Roth | Allgemein |
| Kalziumchlorid-di-hydrat | Merck | Allgemein |
| LD-Säulen | Miltenyi | AECII |
| Low Input Quick Amp Labeling Kit | Agilent | Transkriptom |
| Luria-Bertani Agar | Thermo Fisher | CRISPR/Cas9 |
| Magnesiumsulfat-heptahydrat | Roth | Allgemein |
| Mammalian Protein Extraktions Reagenz (M-PER) | Thermo Fisher | Proteinbestimmung |
| Matrigel (growth factor reduced) | Corning | Invasions-Assay |
| Maxima™ cDNA Synthesis Kit | Thermo Fisher | cDNA-Synthese |
| Methanol (100%) | Merck | Durchflusszytometrie |
| Midori Green | Biozym | Agarose-Gelelektrophorese |
| Natriumchlorid | Roth | Allgemein |
| C-Chip Neubauer-Zählkammer (improved) | Thermo Fisher | Zellkultur |
| Novex™ NuPAGE™ Antioxidants | Thermo Fisher | SDS-Gelelektrophorese |
| Novex™ Tris-Glycin Transferpuffer | Thermo Fisher | Western Blot |
| Nucleofactor-System | Lonza | CRISPR/Cas9 |
| NuPAGE™ Bis-Tris Gradientgel (4-12%) | Thermo Fisher | SDS-Gelelektrophorese |
| Nucleofactor Solution Kit | Lonza | CRISPR/Cas9 |
| Nylongase (50 µm, 20 µm) | Frank Eckert GmbH | AECII |
| Oligonukleotide | Integrated DNA Technologies | CRISPR/Cas9 |
| OneTaq® 2x Master Mix | New England Biolabs | CRISPR/Cas9 |
| Opal™ HRP Polymer (M & Rb) | Akoya Bioscience | mIHC |
| Opal™ Polaris 7-Color Kit | Akoya Bioscience | mIHC |
| pBR322 DNA-MspI Digest | New England Biolabs | Agarose-Gelelektrophorese |
| PCR-Puffer (10x) | Invitrogen | PCR |
| Penicillin/Streptomycin-Lösung, 100x | PAN Biotech | Zellkultur |
| Petrischalen | Thermo Fisher | CRISPR/Cas9 |
| Pierce™ BCA™ Protein Kit | Thermo Fisher | Proteinbestimmung |
| Pipettenspitzen | Greiner/Eppendorf/Sarstedt | Allgemein |
| Pirfenidon | TCI Chemicals | Zellkultur |
| Primer | Eurofins | RT-PCR; Kolonie-PCR; CRISPR/Cas9 |
| Prolong Gold Mounting Solution | Thermo Fisher | mIHC |
| Protease/Phosphatase Cocktail | Thermo Fisher | Kinase-Assay; Proliferations-Assay |
| Protein-Thyrosin Array (PTK) | PamGene | Kinase-Assay |
| Proteome Profiler Humal XL Oncology Array Kit | RnD Systems | Protein-Array |
| Protran® Nitrocellulosemembran (0,45 µm) | Fisher Scientific | Western Blot |
| PX458-Vektor | Addgene | CRISPR/Cas9 |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen | cDNA-Gelextraktion |
| QuickExtract™ DNA Solution | Lucigen | CRISPR/Cas9 |
| Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml) | Sarstedt | Allgemein |
| Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml) | Sarstedt | Allgemein |
| Repair-Template (HDR) | Integrated DNA Technologies | CRISPR/Cas9 |
| Rhodamine-Phalloidin | Molecular Probes | IFM |
| RNA 6000 Nano Kit | Agilent | Transkriptom |
| RNeasy Mini-Kit | Qiagen | Transkriptom |
| Roti-Block (10x) | Carl Roth | Western Blot |
| RPMI 1640 | PAN Biotech | Zellkultur |
| SDS-3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)-Puffer | Thermo Fisher | SDS-Gelelektrophorese |
| Serin-Theronin Array (STK) | PamGene | Kinase-Assay |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Sigma Aldrich | Western Blot |

| | | |
|----------------------------------|-------------------|-----------------|
| Spike In Kit, One Color RNA | Agilent | Transkriptom |
| Stable Glutamin 200 mM | PAN Biotech | Zellkultur |
| STK/PTK Kinase-Assay Kit | PamGene | Kinase-Assay |
| Transkriptomq-Polymerase PCR Kit | Thermo Fisher | RT-PCR |
| TGFβ1 | PeptoTech | Zellkultur |
| Trans-Well Platten | Corning | Invasions-Assay |
| Triton X-100 | Sigma | IFM |
| Trypanblau | Gibco | Zellkultur |
| Trypsin-EDTA (10x) | PAN Biotech | Zellkultur |
| Tween20™ | Sigma Aldrich | Western Blot |
| Waschpuffer-System (1 + 2) | Agilent | Transkriptom |
| Wasserstoffperoxid (3%) | Merck | mIHC |
| Zellkulturgefäße | Corning/ Sarstedt | Zellkultur |

mIHC = *Multiplex*-Immunhistochemie; IFM = Immunfluoreszenzmikroskopie

Anhang II: Verwendete Geräte

| Bezeichnung | Hersteller | Verwendung |
|-----------------------------------|---------------|----------------------------------|
| Ariall FACS | BD | CRISPR/Cas9 |
| Array-Halterung | Agilent | Transkriptom |
| Atoklav | Schlumbohm | Allgemein |
| Bioanalyzer 2100 | Agilent | Transkriptom |
| Brutschrank HERA Cell 150 | Heraeus | Zellkultur |
| CCD-Kamera S6X11 | INTAS | CRISPR/Cas9; RT-PCR; Kolonie-PCR |
| Durchfluszytometer MACSQuant10 | Miltenyi | Durchfluszytometrie |
| Elektroporation Nucleofactor I | Lonza | CRISPR/Cas9 |
| Elektrophorese-Kammer | Bio-Rad | Gelelektrophorese |
| Fluoreszenzkamera DFC450 C | Leica | IFM |
| Fluoreszenzmikroskop Eclipse 80i | Nikon | IFM |
| Fotometer Magellan | Tecan | Proteinbestimmung |
| Gefrierschrank (-20°C) | NordCap | Allgemein |
| Gefrierschrank (-80°C) V86-240.1 | Ewald | Allgemein |
| Heizblock mit Schüttelfunktion | Eppendorf | Allgemein |
| Horizontalschüttler Typ 2000 | unbekannt | Allgemein |
| Huawei P9 | Huawei | Kolonieformations-Assay |
| Hybridisierungs-ofen | Agilent | Transkriptom |
| Kanülen | BD | Allgemein |
| Kühlschrank | NordCap | Allgemein |
| Lichtmikroskop LABOVERT | Leitz | Allgemein |
| Lichtquelle INTENSILIGHT C-HGF1 | Nikon | IFM |
| MACS-Magnet (Midi) | Miltenyi | AECII |
| MACS-Magnet Halterung Multi-Stand | Miltenyi | AECII |
| Magnetrack (1,5 ml Gefäße) | Thermo Fisher | T-Zellen Extraktion |
| Magnetrührer KAMAG RET | IKA | Allgemein |
| Microarray Scanner SureScan | Agilent | Transkriptom |
| Mikrowelle 7017 | Privileg | Gelelektrophorese |
| Mikrowelle inverter NN-CD87KS | Panasonic | mIHC |
| Odyssee Clx Scanner | LiCOR | Western Blot |
| Pam Station 12 | PamGene | Kinase-Array |
| pH-Meter pH537 | WTW | Allgemein |
| Pipetten (diverse) | Eppendorf | Allgemein |
| Reinstwasser MilliQ Academic | Merck | Allgemein |
| Smartphone-Adapter | Itian | Kolonieformations-Assay |

| | | |
|----------------------------------|-------------------|----------------------------------|
| Spannungsgeber | Bio-Rad | SDS-PAGE |
| Spannungsgeber | Biometra | Agarose-Gelelektrophorese |
| Sterilbank Lamin Air HBL 2472 GS | Haraeus | Allgemein |
| Themocycler | Biometra | DNA/RNA |
| UV-Spektrometer | DeNovix | DNA/RNA; Transkriptom |
| UV-Spektrometer NanoDrop 2000 | Thermo Scientific | Transkriptom |
| UV-Transilluminator UST30M-8KE | INTAS | CRISPR/Cas9; RT-PCR |
| Vectra Polaris | Akoya Biosciences | mIHC |
| Vortex | IKA | Allgemein |
| Waage (exelence) | Satorious | Allgemein |
| Waage (Kern ABS) | Kern & Sohn | Allgemein |
| Wippschüttler | Faust LabScience | Protein-Array |
| X-cell Sure Lock Kammern | Bio-Rad | SDS-PAGE |
| Zentifugen-Rotor 19/D 11150 | Sigma | Zellkultur; AECII; DFZ |
| Zentrifuge 4K15 | Sigma | Zellkultur; AECII; DFZ |
| Zentrifuge EBA12 | Hettich | Transkriptom; RNA/DNA-Extraktion |
| Zentrifuge mini Spin | Eppendorf | Transkriptom; RNA/DNA-Extraktion |

mIHC = *Multiplex-Immunhistochemie*; IFM = *Immunfluoreszenzmikroskopie*; DFZ = *Durchflusszytometrie*; RT_PCR = *Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion*; AECII = *Alveolarepithelzellen Typ II Extraktion*; SDS_PAGE = *Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese*

Anhang III: Puffer & Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden vor ihrem Gebrauch autoklaviert oder steril filtriert (0,2 µM).

| Bezeichnung | Zusammensetzung | Methode |
|--|---|---------------------------|
| 1x PBS (pH 7,2) | 160 mM NaCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 4,7 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O | Allgemein |
| 1x SDS-Probenladepuffer (pH 6,8) reduzierend (v/v) | 50 mM TRIS-HCl 100 mM DTT 70 mM SDS 0,15 mM Bromphenolblau 10 ml Glycerol ad 100 ml ddH ₂ O | Western Blot |
| 1x TAE-Puffer (pH 8) | 40 mM TRIS 1 mM EDTA 20 mM Essigsäure | Agarose-Gelelektrophorese |
| 1x TBS-Puffer (pH 8) | 0,1 M TRIS-HCl 0,15 M NaCl | Western Blot |
| 1x TBST-Lösung (pH 8) | 0,1 M TRIS-HCl 0,15 M NaCl 5 ml Tween 20 | Western-Blot |
| 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Stammlösung | 10,9 mM | DFZ |
| AECII-Puffer (pH 6,6) | 1,9 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O 1,3 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O 137mM NaCl 5,4 mM KCl 6,2 mM Glucose 2,6 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 10 mM Hepes | AECII Extraktion |
| Flow cytometry Waschpuffer (WP) | 2,5 ml fetales Kälberserum (FCS) ad 250 ml 1x PBS | DFZ |

| | | |
|---|--|------------------------|
| Isolationspuffer (IB) pH 7,4 (v/v) | 2 ml FCS 2 mM EDTA ad 100 ml 1x PBS | T-Zellen Extraktion |
| MACS-Puffer (w/v; v/v) | 2 g 0,5% BSA 1,6 ml EDTA (0,5 M) ad 400 ml 1x PBS | AECII Extraktion |
| Paraformaldehyd-Lösung (PFA) 2% (w/v) | 2g ad 100 ml 1x PBS | Allgemein |
| RPMI ⁺ -Medium (v/v) | 50 ml fetales Kälberserum (FCS) 5 ml stabile Glutamin-Lösung (200 mM) 5 ml Penicillin (1000 U/ml)-Streptomycin (10 mg/ml)-Lösung ad 500 ml RPMI 1640 | Zellkultur |
| RPMI ⁻ -Medium (v/v) | 5 ml stabile Glutamin-Lösung (200 mM) 5 ml Penicillin (1000 U/ml)-Streptomycin (10 mg/ml)-Lösung ad 500 ml RPMI 1640 | Zellkultur |
| RPMI-Medium zur Lagerung von Lungengewebe (v/v) | 10 ml stabile Glutamin-Lösung (200 mM) 10 ml Penicillin (1000 U/ml)-Streptomycin (10 mg/ml)-Lösung ad 500 ml RPMI 1640 | AECII- Extraktion |
| Triton-Lösung (0,25 %) (v/v) | 1,25 ml Triton X-100 ad 500 ml 1x PBS | |
| Trypsin/EDTA-Lösung (T/E) (v/v) | 100 ml 10x Trypsin (0,5 %)-EDTA (0,2 %)- Lösung in PBS ad 1000 ml ddH ₂ O | Zellkultur |

DFZ=Durchflusszytometrie; AECII = Alveolarepithelzellen Typ II; IFM = Immunfluoreszenzmikroskopie; w/v = *Weight per volume*; v/v = *Volume per volume*

Anhang IV: Patientenmaterial mIHC-Kohorte

| Geschlecht | Histologie | Stage | Grading | OS (Monate) | DFS (Monate) |
|---------------|------------|----------|----------|--------------------|-------------------|
| Männlich: 116 | ADC : 106 | IA : 46 | G1 : 2 | Median : 31.80 | Median : 26.40 |
| Weiblich: 81 | SQC: 91 | IB : 49 | G2 : 56 | Mittelwert : 32.99 | Mittelwert: 29.01 |
| | | IIA : 31 | G3 : 137 | | |
| | | IIB : 28 | NA: 2 | | |
| | | IIIA: 40 | | | |
| | | IIIB: 3 | | | |

NA = *Data not available*; OS = *Overall survival*; DFS = *Disease free survival*; ADC = Adenokarzinom; SQC = Plattenepithelkarzinom

Anhang V: Patientenmaterial AECII-Extraktion

| Laufende Nr. | Histologie |
|--------------|------------|
| 1 | ADC |
| 2 | ADC |
| 3 | ADC |

ADC = Adenokarzinom

11. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------------------|---|
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µM | Mikromolar |
| µm | Mikrometer |
| IL2; -17 | Interleukin 2; -17 |
| SMAD2; -3 | SMAD2; -3-Gesamtprotein |
| CDK1; -2; -4/6 | <i>Cyclin dependent kinase1; -2; -4/6</i> |
| CDKN1A | <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A</i> |
| CDKN2B | <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B</i> |
| CD3; -28 | <i>Cluster of differentiation 3; -28; -45</i> |
| AF488; -647 | Alexa Fluor 488; -647 |
| SMAD1; -2; -3; -4; -5; -6; -7; 8 | <i>Small mother against decapentaplegic-1; -2; -3; -4; -5; -6; -7; -8</i> |
| A | Area |
| A549 ^{sub} | A549-Zellen mit einer SMAD2 Linker-Substitution des Serin-Tripletts |
| A549 ^{WT} | A549-Wildtyp Zellen |
| ADC | <i>Adenocarcinoma</i> |
| AECII | Alveolarepithelzellen Typ II |
| ALK | <i>Anaplastic lymphoma kinase</i> |
| ANOVA | <i>Analysis of variance</i> |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| B1 | Blauer Laser 488 nm |
| BAMBI | <i>BMP and activin membrane-bound inhibitor</i> |
| BCA | <i>Bicinchoninic acid</i> |
| BCL2L1 | <i>B-Cell CLL/Lymphoma 2 Like-1</i> |
| BDNF | <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> |
| BF | Bonferroni |
| BH | Benjamini-Hochberg |
| BLASTn | <i>Basic Local Alignment Search Tool nucleotide database</i> |
| BMP(R) | <i>Bone morphogenetic protein (receptor)</i> |
| bp | Basenpaare |
| BSA | <i>Bovine serum albumin</i> |
| <i>C. elegans</i> | <i>Caenorhabditis elegans</i> |
| Cas9 | <i>CRISPR associated protein 9</i> |
| CCD | <i>Charge coupled device</i> |
| CDKN1A | <i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i> |
| CDKN2B | <i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2B</i> |
| cDNA | <i>Complementary DNA</i> |
| COPD | <i>Chronic obstructive pulmonary disease</i> |
| Co-SMAD | <i>Common-SMAD</i> |
| CRISPR | <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> |
| cRNA | <i>Complementary RNA</i> |
| Cy3 | Cyanine-3 |
| <i>D. melanogaster</i> | <i>Drosophila melanogaster</i> |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| ddH2O | Di-destiliertes Wasser |
| DFS | <i>Disease free survival</i> |
| DFZ | Durchflusszytometrie |

| | |
|------------------|---|
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| dNTP | <i>Desoxyribonukleosid-triphosphate</i> |
| DSB | Doppelstrangbruch |
| DTT | Dithiotreitol |
| DZL | Deutsches Zentrum für Lungenforschung |
| E3 | Exon 3 |
| ECM | <i>Extra cellular matrix</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF(R) | <i>Epidermal growth factor (receptor)</i> |
| EMT | <i>Epithelial-mesenchymal transition</i> |
| ERK | <i>Extracellular signal regulated kinase</i> |
| EtOH | Ethanol |
| FACS | <i>Fluorescent activated cell sorting</i> |
| FC | <i>Fold change</i> |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> |
| FDR | <i>False discovery rate</i> |
| FITC | Fluorescein-isothiocyanat |
| FSC | <i>Forward scatter</i> |
| fwd | Forward |
| g | Erdbeschleunigung |
| G | Goat/Ziege |
| G0/G1 | <i>Gap 0/Gap 1-phase</i> |
| G2/M | <i>Gap 2-phase/Mitose</i> |
| GDF | <i>Growth and differentiation factor</i> |
| gDNA | <i>Genomic DNA</i> |
| GEO | <i>Gene Expression Omnibus</i> |
| GEPIA2 | <i>Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2</i> |
| GFP | <i>Green fluorecent protein</i> |
| GO_BP | <i>Gene Ontology Biological Process</i> |
| GSEA MSigDB | <i>Gene Set Enrichment Analysis Molecular Sigantures Database</i> |
| GSK3 β | <i>Glycogen synthase kinase 3-β</i> |
| GTE _x | <i>Genotype-Tissue Expression</i> |
| h | <i>Hour/Stunde</i> |
| H | <i>Height</i> |
| HDR | <i>Homology directed repair</i> |
| HMEL | <i>Human mammary epithelial cell line</i> |
| IB | <i>Isolation buffer</i> |
| IFM | Immunofluoreszenzmikroskopie |
| InDel | <i>Insertion deletion</i> |
| I-SMAD | <i>Inhibitory-SMAD</i> |
| JNK | <i>C-JUN N-terminal kinase</i> |
| KRAS | <i>Kirsten rat sarcoma</i> |
| LAP | <i>Latency associated peptide</i> |
| LCC | <i>Large cell carcinoma</i> |
| log | Logarithmus zur Basis 10 |
| log ₂ | Logarithmus zur Basis 2 |
| LTBP | <i>Latent TGFβ binding protein</i> |
| M | Mouse/Maus |
| M2 | Typ 2 Makrophage |

| | |
|-------------------|--|
| MAD | <i>Mother against decapentaplegic</i> |
| MAPK | <i>Mitogen activated protein kinase</i> |
| mESC | <i>Murine embryonic stem cells</i> |
| MH1, -2 | <i>Mad homology 1; -2</i> |
| mIHC | <i>Multiplex-Immunhistochemie</i> |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mm ² | Quadratmillimeter |
| MMP | <i>Matrix-Metalloprotease</i> |
| MOPS | SDS-3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure |
| M-PER | <i>Mammalian Protein Extraction Reagent</i> |
| MTOR | <i>Mechanistic Target of Rapamycin</i> |
| MQ10 | MACSQuant 10 Durchflusszytometer |
| mRNA | <i>Messenger RNA</i> |
| MYC | <i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i> |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NCBI | <i>National Center of Biotechnology Information</i> |
| NHEJ | <i>Non-homologous end joining</i> |
| nm | Nanometer |
| NSCLC | <i>Non-small cell lung carcinoma</i> |
| OS | <i>Overall survival</i> |
| PAM | <i>Protospacer adjacent motif</i> |
| panCK | Pan-Cytokeratin |
| PBMC | <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> |
| PBST | <i>Phosphate buffered saline with Tween</i> |
| PCNT | Pericentrin |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PD-1 | <i>Programmed cell death 1</i> |
| PDL-1 | <i>Programmed cell death ligand 1</i> |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pH | Potential hydrogen |
| pHH3 | Phospho-Histon H3 (Serin 10) |
| PI3K | <i>Phosphoinositol-3 kinase</i> |
| PIRF | <i>Pirfenidon</i> |
| pmol | Pikomol |
| PMT | <i>Photomultiplier tubes</i> |
| PPM1A | <i>Protein phosphatase (magnesium-dependent) 1A</i> |
| pS2C | Phospho-SMAD2 C-terminal (S464/467) |
| pS2L | Phospho-SMAD2-Linker Ser245/250/255 |
| pS2L ⁺ | Subpopulation von pS2L-positiven Zellen in der G/M-Phase mit vielfach höheren Signalintensitäten |
| PTK | Protein-Tyrosin Kinase |
| R | Tumorrand |
| R1 | Roter Laser 635 nm |
| RAF | <i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i> |
| RAS | <i>Rat sarcoma</i> |
| Rb | <i>Rabbit/Kaninchen</i> |

| | |
|----------------------------|--|
| rev | <i>Reverse</i> |
| RIN | <i>RNA integrity number</i> |
| RM | <i>Repeated measures</i> |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> |
| RPMI ⁺ | RPMI 1640 +FCS +Pen/Strep +Glutamin |
| R-SMAD | Rezeptor-regulierte SMAD |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion |
| S2 ^{FL} | SMAD2 <i>full length</i> |
| S2 ^{ΔE3} | SMAD2 <i>delta Exon 3</i> |
| SARS-CoV-2 | <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i> |
| SBE | <i>SMAD binding element</i> |
| SCLC | <i>Small cell lung carcinoma</i> |
| SCP | <i>Small C-terminal domain phosphatase</i> |
| SD | <i>Standard deviation</i> |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| sek | Sekunde |
| Ser | Serin |
| sgRNA | <i>Single guide RNA</i> |
| SLFN11 | Schlafen 11 |
| Smad3 ^{null/null} | Smad3 Knockout beider Allele (<i>homozygot</i>) |
| SOC | <i>Super optimal broth with catabolite repression</i> |
| S-Phase | DNA-Synthese Phase |
| SQC | <i>Squamous cell carcinoma</i> |
| SOX2 | <i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i> |
| SSC | <i>Side scatter</i> |
| ssDNA | <i>single strand DNA</i> |
| SSXS | Serin-Motiv (C-Terminus) |
| STK | Serin-Threonin Kinase |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TBS(T) | <i>Tris buffered saline (with Tween)</i> |
| TCGA | <i>The Cancer Genome Atlas Program</i> |
| TE | Trypsin/EDTA |
| Temp | Temperatur |
| TF | Transkriptionsfaktor |
| TGFβ | <i>Transforming growth factor beta</i> |
| Thr | Threonin |
| TKI | Tyrosin-Kinase-Inhibitor |
| TMA | <i>Tissue microarray</i> |
| TRITC | Tetramethylrhodamin-isothiocyanat |
| TRKB | <i>Tropomyosin receptor kinase B</i> |
| TβR-I/-II | TGFβ-Transmembranrezeptor Typ I/-II |
| ü. N. | Über Nacht |
| U | <i>Units</i> |
| U/ml | <i>Units/ml</i> |
| UV | Ultra violett |
| V | Volt |
| v/v | <i>Volume per volume</i> |
| w/v | <i>Weight per volume</i> |
| V1 | Violetter Laser 405 nm |

| | |
|------------------|----------------------------------|
| WB | Western Blot |
| WHO | <i>World health organisation</i> |
| WP | Waschpuffer |
| <i>X. laevis</i> | <i>Xenopus laevis</i> |
| Z | Tumorzentrum |
| λ ex | <i>Lambda exitation</i> |

10. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abb. 1: TGFβ Liganden-Bindung und Rezeptoraktivierung. | 5 |
| Abb. 2: Der TGFβ-Signalweg & Kreuzvernetzungen zu anderen Signalkaskaden. | 7 |
| Abb. 3: R-SMAD Phospho-Isoformen, SMAD2-Domänen und -Spleißvarianten. | 10 |
| Abb. 4: Vereinfachter Ablauf der AECII-Extraktion aus Lungengewebe. | 18 |
| Abb. 5: Gating-Strategien DFZ-Analysen. | 28 |
| Abb. 6: Schematischer Ablauf der mIHC. | 31 |
| Abb. 7: Prinzip des CRISPR/Cas9-Systems zur Genom-Editierung. | 46 |
| Abb. 8: Einfluss von SMAD2-Genexpressionen auf das Gesamtüberleben in NSCLC-Kohorten. | 55 |
| Abb. 9: SMAD2 und Phospho-Isoformen in NSCLC-Zelllinien. | 57 |
| Abb. 10: SMAD2 und Phospho-Isoformen in Proteinlysaten von NSCLC-Zelllinien. | 58 |
| Abb. 11: SMAD2-Spleißvarianten und Phospho-Isoformen in NSCLC-Zelllinien. | 59 |
| Abb. 12: pS2L-, pHH3-, panCK- und CD45-positive Zellen/mm ² in Tumor vs. Stroma und Tumorzentrum- vs. – rand von NSCLC-Geweben. | 62 |
| Abb. 13: Einfluss von pS2L-positiven Zellen auf das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben von NSCLC- Patienten. | 64 |
| Abb. 14: Zellzyklusphasen in somatischen Zellen. | 66 |
| Abb. 15: Effekte von CDK-Inhibitoren und PIRF auf den Zellzyklus von NSCLC-Zellen. | 67 |
| Abb. 16: SMAD2 und Phospho-Isoformen in stimulierten NSCLC-Zelllinien. | 69 |
| Abb. 17: SMAD2 und Phospho-Isoformen in der G0/G1- und G2/M-Phase unstimulierter NSCLC-Zellen. | 71 |
| Abb. 18: SMAD2 Linker-Phosphorylierungen in der Interphase und Mitose von A549-Zellen. | 73 |
| Abb. 19: Kolokalisationen von Pericentrin und pHH3 mit pS2L in mitotischen A549-Zellen. | 74 |
| Abb. 20: pS2L und pHH3 in unstimulierten NSCLC-Zelllinien. | 75 |
| Abb. 21: Korrelation von pS2L ⁺ - und pHH3 ⁺ -Zellpopulationen stimulierter NSCLC-Zellen. | 76 |
| Abb. 22: Verifizierung erfolgreicher SMAD2-Linker Substitutionen in A549-Zellen. | 79 |
| Abb. 23: Abundanzen des SMAD2-Gesamtproteins und -Spleißvarianten in A549 ^{WT} - und A549L ^{sub} -Zellen. | 81 |
| Abb. 24: Phospho-Isoform Niveaus in unstimulierten A549 ^{WT} - und A549L ^{sub} -Zellen. | 82 |
| Abb. 25: SMAD2-Spleißvarianten in stimulierten A549 ^{WT} - und A549L ^{sub} -Zellen. | 83 |
| Abb. 26: SMAD2 Phospho-Isoformen in stimulierten A549 ^{WT} - und A549L ^{sub} -Zellen. | 84 |
| Abb. 27: Einfluss von S2 ^{FL} - und S2 ^{ΔE3} -Expressionen auf das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben von NSCLC- Patienten. | 87 |
| Abb. 28: Transkripte von SMAD2-Spleißvarianten in A549 ^{WT} - vs. A549L ^{sub} -Zellen. | 88 |
| Abb. 29: SMAD2-Spleißvarianten und Phospho-Isoformen in AECII. | 90 |
| Abb. 30: Reinheit, Zellzyklusanalysen sowie SMAD2-Spleißvarianten und Phospho-Isoformen aktivierter und nicht-aktivierter T-Zellen gesunder Spender. | 92 |
| Abb. 31: Funktionelle Zellanalysen von A549L ^{sub} vs. A549 ^{WT} . | 95 |
| Abb. 32: Heatmaps Array-basierter Analysen verschiedener biologischer Ebenen von A549 ^{WT} vs. A549L ^{sub} . | 98 |
| Abb. 33: Expansion signifikant differenzieller Zielmoleküle der Protein- und Kinase-Arrays von A549 ^{WT} - vs. A549L ^{sub} -Zellen mittels STRING DB. | 100 |
| Abb. 34: GO_BP-Anreicherungsanalysen differenzieller Zielstrukturen von A549 ^{WT} vs. A549L ^{sub} verschiedener biologischer Ebenen. | 102 |
| Abb. 35: KEGG-Analyse differenziell interagierender Zielstrukturen von A549L ^{sub} vs. A549 ^{WT} . | 105 |
| Abb. 36: Einfluss differenziell exprimierter Gene von A549 ^{WT} vs. A549L ^{sub} und deren Einfluss auf das OS und DFS von NSCLC- und Gliom-Kohorten. | 107 |
| Abb. 37: Differenzielle Genexpressionen von assoziierten Genen mit EMT, Zellmotilität und Embryonalentwicklung in A549L ^{sub} - vs. A549 ^{WT} -Zellen. | 109 |
| Abb. 38: TGFβ-Signalwegintegrität in A549L ^{sub} - und A549 ^{WT} -Zellen. | 111 |
| Abb. 39: Transkriptomanalysen TGFβ1-stimulierter A549 ^{WT} - und A549L ^{sub} -Zellen zur Erstellung von TGFβ- Signaturen. | 113 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 40: Differenzielle Genregulationen in TGFβ1 stimulierten A549 ^{WT} vs. A549L ^{sub} -Zellen. | 116 |
| Abb. 41: GO_BP-Analysen TGFβ1-stimulierter A549L ^{sub} vs. A549 ^{WT} -Zellen. | 117 |
| Abb. 42: Stammzell-assoziierte Gene TGFβ1-stimulierter A549L ^{sub} - und A549 ^{WT} -Zellen. | 119 |
| Abb. 43: Venn Diagramm stammzell-assoziiierter Genregulationen TGFβ-stimulierter A549L ^{sub} vs. A549 ^{WT} -Zellen. | 120 |
| Abb. 44: Einfluss differenziell regulierter stammzell-assoziiierter Gene TGFβ-stimulierter A549L ^{sub} - und A549 ^{WT} -Zellen auf das Gesamtüberleben in ADC- und SQC-Kohorten. | 121 |
| Abb. 45: Hypothese: Einfluss hoher TGFβ-Konzentrationen auf Tumor- und T-Zellen in NSCLCs. | 127 |
| Abb. 46: Zunahmen von SMAD2- und Phospho-Isoformen von der G0/G1- zur G2/M-Phase in NSCLC-Zelllinien. | 131 |
| Abb. 47: Ergebnisse funktioneller phospho-SMAD2-Linker-abhängiger Prozesse. | 137 |
| Abb. 48: Auswirkungen konstitutiv unterbundener pS2L-Signale auf SMAD2-Spleißvarianten in A549-Zellen. | 139 |
| Abb. 49: Modulationen von SMAD2-Spleißvarianten und Linker-Phosphorylierungen durch Stimulationen mit CDK-Inhibitoren und PIRF in A549 ^{WT} - und A549L ^{sub} -Zellen. | 144 |
| Abb. 50: Hypothese: Herabgesetzte CyclinD-CDK4/6-Aktivitäten durch Inhibitoren oder eine verkürzte G1-Phase beeinflussen SMAD2 Linker-Phosphorylierungen und S2 ^{ΔE3} -Niveaus. | 150 |
| Abb. 51: Hypothese: Therapie-induzierte Veränderungen von SMAD2 Linker-Phosphorylierungen und S2 ^{ΔE3} -Abundanzen tragen zu erworbenen Resistenzen in Krebszellen bei. | 156 |
| Abb. 52: Hypothese: Potenzielle synergistische Effekte von NSCLC-Kombinationstherapien auf das Gesamtüberleben durch S2 ^{ΔE3} - und pS2L-Modulationen. | 159 |

12. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass diese Dissertation, abgesehen von der Beratung durch die Betreuer, inhaltlich und formal selbstständig erstellt wurde. Die Arbeit oder Teile daraus wurden weder anderweitig in einem Prüfungsverfahren vorgelegt, noch veröffentlicht oder zu diesem Zweck eingereicht. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Ich habe mich bisher keinem Promotionsverfahren unterzogen, noch wurde mir zuvor ein akademischer Grad aberkannt.

Bad Segeberg, den __29.06.2021__

Unterschrift

13. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich auf meinem Weg zur Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt und motiviert haben.

Die Arbeiten wurden hauptsächlich im DZL-Primärzelllabor und der Pathologie des FZBs durchgeführt. Daher möchte ich mich bei Herrn Prof. Sven Perner als Leiter der Forschungsgruppe für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit bedanken. Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Holger Heine und Herrn Prof. Thomas Röder und für die Begutachtung und Begleitung durch das Prüfungsverfahren. Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Norbert Reiling für die Übernahme der Betreuung im Rahmen des BBRS Graduiertenprogramms bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Torsten Goldmann und Herrn Dr. Sebastian Marwitz als Betreuer dieser Arbeit und die Überlassung des spannenden Themas. Darüber hinaus ebenfalls für die langjährige Unterstützung, konstruktive Kritik, Diskussionsbereitschaft und fachlichen Kompetenzen. Insbesondere die freie Arbeitsweise bei der Bearbeitung des Themas hat mich auf persönlicher und fachlicher Ebene vorangebracht.

Für eine hervorragende technische Unterstützung möchte ich mich ganz besonders bei Frau Bettina Lühr, Herrn Christian Rosero, Frau Jasmin Tiebach und Frau Elisabeth Seibel bedanken. Ebenfalls danke ich an dieser Stelle Frau Tanja Mengden für ihre überaus warmherzige und hilfsbereite Art auch außerhalb des Labors. Darüber hinaus hat die ein oder andere lustige PA22-Kaffeepause die oft langen Labortage erheitert und werden mir in sehr guter Erinnerung bleiben. Insgesamt gebührt allen Mitarbeitern der Laborgruppe ein großer Dank für das angenehme Klima und die Unterstützung.

Für Kooperationen am FZB bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Holger Heine, Herrn Dr. Tim Viebuchen und der gesamten Forschungsgruppe „Angeborene Immunität“ sowie Herrn Prof. Dr. med. Florian Maurer und Frau Dr. Doris Hillemann des NRZs. Darüber hinaus möchte ich recht herzlich Herrn Dr. Thomas Scholzen, Herrn Dr. Jochen Behrends und Frau Martina Hein für die Unterstützung bei der Durchflusszytometrie und Zellsortierung danken.

Im Rahmen des Deutschen Zentrums für Lungenforschung möchte ich mich für Kooperationen über das Forschungszentrum Borstel hinaus recht herzlich bei Herrn Prof. Ole Ammerpohl und Frau Corinna Waider bedanken. Des Weiteren gilt mein Dank ebenfalls Herrn Prof. Klaus F. Rabe, Herrn Prof. Martin Reck und Herrn Dr. Christian Kugler sowie Herrn Prof. Georgios Stathopoulos und Frau Dr. Kristina Arendt.

Aus meinem persönlichen Umfeld gilt mein liebevoller Dank meiner Familie und Freunden. Insbesondere möchte ich meinen Eltern und meinem Verlobten Carsten Merz für ihre langjährige und vielfältige Unterstützung danken. Des Weiteren gilt mein Dank meinen beiden „Perlen“ Franziska Knoop und Lisa-Marie Philipp für ihre langjährigen und unschätzbar wertvollen Freundschaften.