

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Proteomik und Bioanalytik

## **Die Rolle der Notch Signaltransduktion bei der Tumorgenese des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms *in vitro* und im KRAS<sup>G12D</sup>-induzierten Mausmodell**

Anja Baumgart

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

*Doktors der Naturwissenschaften*

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. A. Schnieke, Ph.D.  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. B. Küster  
2. Priv.-Doz. Dr. T. N. Dechow

Die Dissertation wurde am 15.03.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.07.2011 angenommen.





# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>8</b>
1.1. Das Lungenkarzinom .....	8
1.2. Der Notch Signalweg.....	9
1.2.1. Die Struktur des Notch Rezeptors.....	10
1.2.2. Die Notch Signaltransduktion.....	11
1.2.3. Der Notch Signalweg und Tumorentstehung.....	13
1.2.4. Die Rolle von Notch im Lungenkrebs .....	15
1.3. Der Epidermis-Wachstumsfaktor Signalweg.....	15
1.3.1. Der EGF Signalweg und Tumorentstehung.....	17
1.4. Die Metalloproteinase ADAM17 .....	18
1.5. Kras als Onkogen im Lungenkrebs.....	20
1.5.1. Onkogenes Ras .....	22
1.5.2. Das Kras <sup>G12D</sup> -induzierte Lungentumor Mausmodell.....	22
1.6. Fragestellung der Arbeit .....	25
<b>2. Materialien und Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.1. Materialien .....	26
2.1.1. Chemikalien und biogene Substanzen.....	26
2.1.2. Medien und Supplemente für die Zellkultur .....	28
2.1.3. Zelllinien .....	28
2.1.3.1. Lungenkarzinomzellen .....	29
2.1.4. Humane Gewebeproben.....	29
2.1.5. Antikörper .....	29
2.1.6. Enzyme .....	30
2.1.7. Membranen .....	31
2.1.8. Bakterienstämme.....	31
2.1.9. Vektoren und DNA Konstrukte .....	31
2.1.10. Inhibitoren.....	32
2.1.11. Oligonukleotide in 5'→3' .....	32
2.1.12. Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine.....	33
2.1.13. Molekularbiologische Kitsysteme .....	33
2.1.14. Mausstämme .....	33
2.1.15. Tierexperimentelle Materialien.....	33
2.1.16. Geräte .....	34
2.1.17. Lösungen und Puffer .....	35
2.2. Molekularbiologische Methoden .....	38
2.2.1. Agarosegelelektrophorese .....	38
2.2.2. Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen und Geweben .....	38
2.2.3. Isolierung genomischer DNA .....	39
2.2.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	39
2.2.5. Polymerase-Kettenreaktion.....	39
2.2.6. Reverse Transkription zur Generierung von cDNA .....	40
2.2.7. Real time PCR (RT-PCR) .....	40
2.3. Arbeiten mit Bakterien .....	40
2.3.1. Kultivierung von Bakterien .....	40
2.3.2. Transformation von Bakterien durch Hitzeschock .....	41
2.3.3. Isolierung von Plasmid DNA (Mini und Maxi Präparation).....	41
2.4. Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	42
2.4.1. Kultivierung von Zelllinien.....	42

2.4.2.	Kryokonservierung von Zellen.....	42
2.4.3.	Auftauen von Zellen.....	42
2.4.4.	Bestimmung der Zellzahl .....	43
2.4.5.	Transfektionsmethoden .....	43
2.4.5.1.	Lipofektion.....	43
2.4.5.2.	Gewinnung von viralem Überstand und virale Transduktion .....	44
2.5.	Proteinbiochemische Methoden .....	45
2.5.1.	Herstellung von Zelllysaten.....	45
2.5.2.	Herstellung von Lysaten aus murinem Gewebe .....	45
2.5.3.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	45
2.5.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	46
2.5.5.	Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western Blot) .....	47
2.5.6.	Immunchemischer Nachweis von transferierten Proteinen.....	47
2.5.7.	Entfernen gebundener Antikörper von der Membran .....	47
2.6.	Biologische Untersuchungen.....	48
2.6.1.	Soft Agar Assay .....	48
2.6.2.	Nachweis toter Zellen mittels Durchflusszytometrie .....	48
2.6.2.1.	PI-Färbung .....	49
2.6.3.	Proliferationsassay .....	50
2.7.	Tiermodell/ Grundlegende tierexperimentelle Techniken.....	50
2.7.1.	Haltung und Zucht der Mäuse.....	50
2.7.2.	Genotypisierung .....	51
2.7.3.	Tumorinduktion.....	51
2.7.4.	Aufbereitung von Organen.....	52
2.7.5.	Xenografts in Nacktmäusen.....	52
2.8.	Histologische Untersuchungen.....	53
2.8.1.	Anfertigung von Paraffin-Gewebeschnitten .....	53
2.8.2.	Anfertigung von Gefrierschnitten.....	53
2.8.3.	Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	53
2.8.4.	Immunhistochemie.....	54
2.8.5.	X-Gal Färbung .....	55
2.8.6.	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	55
2.8.7.	Quantifizierung der Lungentumorfläche .....	56
2.8.8.	Analyse der Tumordifferenzierung der Lungenkarzinome .....	56
2.9.	Statistische Auswertung .....	57
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
3.1.	Charakterisierung der ADAM17 abhängigen Signalkaskaden und Transformation im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) .....	58
3.1.1.	ADAM 17 vermittelte EGFR abhängige Signaltransduktion.....	58
3.1.1.1.	Einfluss von ADAM17 Expression auf die Transformation .....	60
3.1.1.2.	Einfluss von ADAM17 auf die Proliferation .....	62
3.1.1.3.	Einfluss von ADAM17 auf das Überleben von NSCLC Zellen.....	63
3.1.2.	ADAM 17 vermittelte EGFR-unabhängige Signaltransduktion .....	64
3.1.2.1.	ADAM17 aktiviert Notch1 in NSCLC Zellen <i>in vitro</i> .....	65
3.1.3.	Einfluss von ADAM17 auf das Wachstum von Tumoren in Nacktmäusen .....	67
3.1.4.	Notch1 Signaltransduktion als kritischer Faktor für den transformierten Phänotyp von NSCLC Zellen.....	68
3.1.4.1.	<i>Knockdown</i> von Notch1.....	68
3.1.4.2.	Ektopische Überexpression von Notch1 .....	69
3.1.4.3.	Notch1 reguliert die EGFR Proteinexpression .....	71
3.1.4.4.	EGFR-abhängige Signaltransduktion in Notch1 <i>Knockdown</i> Zellen.....	74
3.1.5.	ADAM17 und Notch als potentielle molekulare Ziele therapeutischer Intervention	76
3.1.6.	ADAM17 und Notch1 Expression in humanem Gewebe .....	77

---

3.2.	Charakterisierung der Rolle von Notch im Kras <sup>G12D</sup> -induzierten Mausmodell.....	80
3.2.1.	Molekularbiologische Überprüfung der Cre-vermittelten Exzision .....	82
3.2.2.	Notch2 Expression beeinflusst das Überleben .....	83
3.2.3.	Analyse der Größe der Tumorareale.....	85
3.2.4.	Analyse der Tumordifferenzierung .....	88
3.2.5.	Notch2 Deletion führt zu Unterschieden in der Tumormorphologie .....	90
3.2.6.	Analyse der Proliferation.....	91
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>94</b>
4.1.	Die Bedeutung von ADAM17 für die Tumorgenese des NSCLC .....	96
4.2.	Die Bedeutung von Notch1 für die Tumorgenese des Lungenkarzinoms .....	97
4.3.	Notch1 vermittelte Regulation des EGFR.....	100
4.4.	Der Einfluss von Notch2 Deletion auf den Phänotyp .....	103
4.5.	Funktionelle und Strukturelle Diversität des Notch1 und Notch2 Rezeptors .....	104
4.6.	Therapeutische Ansätze zur Behandlung von Lungenkarzinomen .....	106
4.6.1.	Therapeutischer Einsatz von ADAM17 Inhibitoren .....	107
4.6.2.	Therapeutischer Einsatz von Notch Inhibitoren .....	108
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>110</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>112</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>122</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>126</b>
<b>9.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>128</b>
<b>10.</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>129</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>131</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Lungenkarzinom

Das Lungenkarzinom ist mit 1,3 Mio. Fällen jährlich, eine der häufigsten malignen Erkrankungen weltweit. Rechnet man die jährlichen Neuerkrankungen von Männern und Frauen zusammen, ist es sogar die am stärksten vertretene Krebserkrankung des Menschen<sup>1,2</sup>. Eine Besonderheit ist die starke Zunahme der Lungenkrebsfälle bei Frauen von 337100 Fälle im Jahr 2000<sup>3</sup> auf 513000 Fälle 2008<sup>2</sup>. Die im Tabakrauch enthaltenen Karzinogene sind mit 85% der häufigste Auslöser eines Lungenkarzinoms<sup>4</sup>. Die restlichen 15% setzen sich aus Fällen zusammen, in denen eine genetische Prädisposition vorlag, aus Personen, die respiratorischen Karzinogenen wie Asbest oder Radon ausgesetzt waren oder auch Fälle ohne erkennbare Ursache. Die fehlende Symptomatik im Anfangsstadium der Tumorerkrankung führt dazu, dass ein Lungenkarzinom meist erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird, wenn eine vollständige Resektion und Therapie nicht mehr möglich ist. Ein fortgeschrittenes Stadium in Kombination mit fehlenden effektiven therapeutischen Optionen bewirkt, dass Lungenkrebs die höchste Sterblichkeitsrate aller Krebsleiden hat. Die 5-Jahr Überlebensprognose liegt bei nur etwa 10%<sup>5</sup>.

Anhand der Histologie unterscheidet man 2 Haupttypen von Lungenkarzinomen, das kleinzellige Bronchialkarzinom (*small cell lung cancer*, SCLC) und das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (*non small cell lung cancer*, NSCLC). NSCLC nimmt dabei mit 80-85% der Lungenkrebsfälle den größten Anteil ein. Die am häufigsten vorkommenden Untergruppen des NSCLC sind Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome und das großzellige Bronchialkarzinom. Zusätzlich gibt es noch weitere Untergruppen, die aber seltener auftreten. Im Bronchus gibt es verschiedene Zelltypen, dazu gehören die Clara Zellen, alveolare Typ II Zellen und pluripotente Stammzellen. Jedoch ist noch unklar von welcher Ursprungszelle die Karzinome ausgehen<sup>6</sup>.

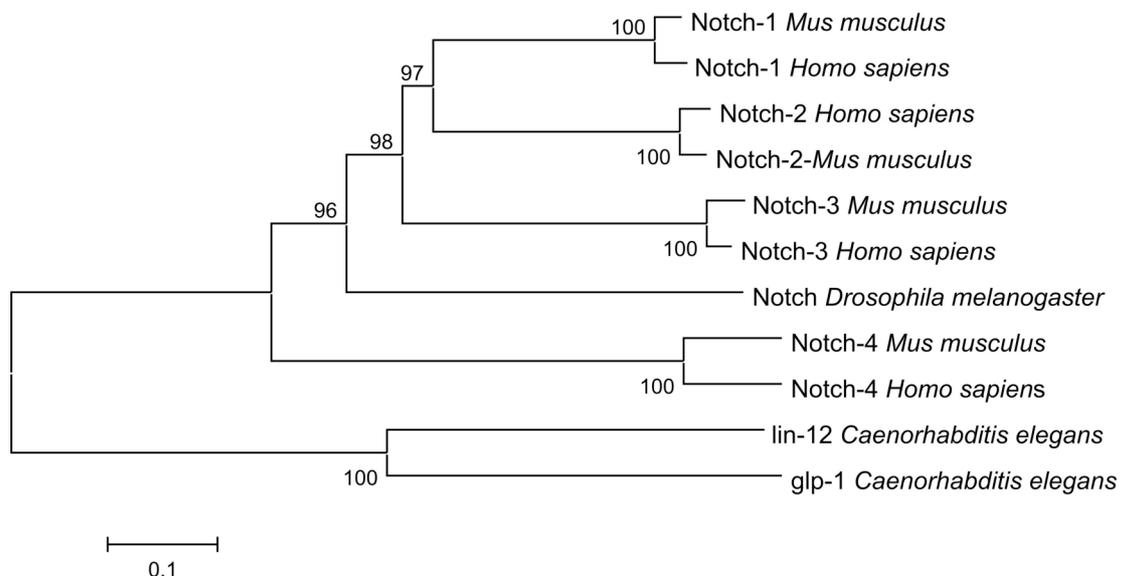
In Lungenkarzinomen wurden bisher viele genetische Unregelmäßigkeiten entdeckt<sup>7</sup>. Diese konnten bereits in präneoplastischen Läsionen des Bronchialepithels nachgewiesen werden. Der Prozess der Tumorgenese vollzieht sich durch diverse Schritte, zu denen Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen gehört. Damit folgt auch das Lungenkarzinom dem von Hanahan und Weinberg propagierten Multistep Modell der Tumorgenese<sup>8</sup>. Einige der häufigsten molekularen Veränderungen sind Mutationen im Ras Gen<sup>9</sup>, Überexpression des Epidermis-Wachstumsfaktor Rezeptors (*epidermal growth factor*,

EGFR)<sup>10</sup>, Mutationen im Tumorsuppressor p53<sup>11</sup> oder Verlust der Heterogenität auf Chromosom 3p<sup>12</sup>.

Dennoch ist die genaue Entstehung eines Lungenkarzinoms noch immer unklar. Da in der Literatur sehr viele molekulare Strukturen beschrieben wurden, ist es notwendig, diese nach und nach zu analysieren.

## 1.2. Der Notch Signalweg

Notch ist bei vielzelligen Tieren (*Metazoa*) ein in der Evolution stark konservierter Signalweg, der an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt ist. Dazu gehören u.a. Differenzierung, Proliferation, Apoptose, Angiogenese, Epitheliale-Mesenchymale Transition, aber auch Prozesse in der frühen Embryogenese und in der neuronalen Entwicklung<sup>13</sup>. Beschrieben wurde Notch erstmals 1917 von Morgan und Kollegen<sup>14</sup>. Diese entdeckten, dass bei Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) mit einer Kerbe (engl. *notch*) im Flügel, eine Haploinsuffizienz in einem Gen vorlag, dass sie daher *Notch* nannten. Das *Notch* Gen kodiert einen 300 kDa großen Transmembranrezeptor. Fruchtfliegen besitzen nur einen Notch Rezeptor, Würmer der Gattung *Caenorhabditis elegans* haben 2 (LIN-12, GLP-1) und Säugetiere exprimieren 4 Notch Rezeptoren (Notch1-4), die sowohl überlappende als auch spezifische Funktionen haben<sup>13</sup>. In Abb. 1.1 ist ein Stammbaum der einzelnen Notch Rezeptoren dargestellt.



**Abb. 1.1 Stammbaum der Notch Rezeptoren**

*Neighbor Joining* Stammbaum (*Bootstrap Values* erzeugt mit 1000-facher Wiederholung) generiert, der mit MEGA4 Software basierend auf einem multiplen Sequenzalignment (Clustal W).

Man erkennt, dass besonders Notch1 und Notch2 bei Säugetieren eine große Übereinstimmung in ihrer Sequenz zeigen, während zu Notch3 und -4 sowie zu den Rezeptoren der anderen Spezies etwas größere sequenzielle Unterschiede vorliegen.

Zu den membranständigen Liganden der Notch Rezeptoren zählen bei Säugetieren Jagged1 und Jagged2 sowie Delta-like1,-3 und -4 und bei *D.melanogaster* Delta und Serrate.

*Knockout* Studien mit transgenen Mäusen belegen, dass das Vorhandensein der Notch Rezeptoren und der Liganden essentiell für das Überleben ist. So sind Mäuse mit Deletion von *Notch1* oder *Notch2*, sowie Deletion von *Jagged1* oder *Delta-like1* embryonal lethal und Mäuse mit Deletion in *Jagged2* und *Delta-like3* perinatal lethal. Lediglich *Notch3* und *Notch4* scheinen bei Mäusen entbehrlich zu sein und Mäuse mit *Knockouts* dieser Gene zeigen eine normale Entwicklung<sup>15</sup>.

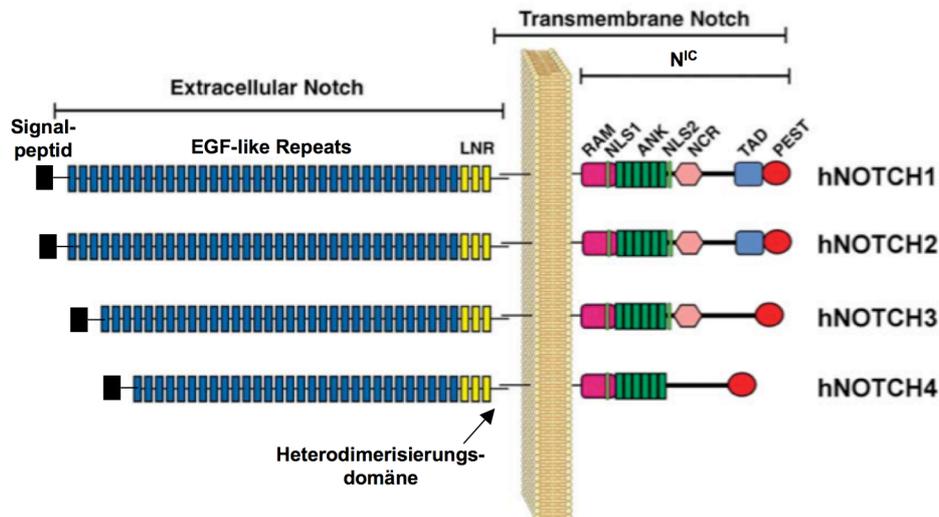
### 1.2.1. Die Struktur des Notch Rezeptors

Notch Rezeptoren werden als Vorläufer Proteine synthetisiert und bereits beim Transport durch den Golgi Apparat erstmals durch eine Furin-Konvertase an der Schnittstelle 1 (S1) geschnitten<sup>16</sup>. Notch wird an der Zelloberfläche als Heterodimer exprimiert<sup>17</sup>. Der Rezeptor (Abb.1.2) besteht dabei aus einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne (180 kDa), welche mit einer kleineren C-terminalen transmembranen Domäne (N<sup>TM</sup>, 120 kDa) nicht-kovalent verbunden ist. Diese transmembrane Domäne wird unterteilt in einen kurzen extrazellulären Rest, einem transmembranen Bereich und dem intrazellulären Fragment (N<sup>I</sup>C).

Die extrazelluläre Domäne besteht bei Säugetieren je nach Rezeptor aus 29 bis 36 *Epidermis growth factor-like Repeats (EGF-like Repeats)*<sup>18,19</sup> und 3 Wiederholungen von Cystein-reichem Notch/Lin12 (*Lin repeats*; LNR). Dabei sind die *EGF-like-Repeats* für die Bindung mit den Notch-spezifischen Liganden zuständig<sup>20</sup>, während die *Lin-Repeats* die Weiterleitung von Signalen in Abwesenheit der Liganden verhindert<sup>21</sup>.

Der transmembrane Bereich besteht aus der Heterodimerisierungsdomäne, während sich intrazellulär vor allem Bereiche befinden, die für die Signalweiterleitung in den Kern und Protein-Protein Interaktionen notwendig sind. Direkt an die Heterodimerisierungsdomäne schließt die RAM23 (RAM) Domäne, welche die Proteinstabilität reguliert und eine Bindungsstelle für das DNA-bindende Protein CSL (CBF im Menschen, RBPJ-κ in der Maus, *Suppressor of Hairless* in *D.melanogaster*, Lag1 in *C. elegans*) ist<sup>22</sup>. Anschließend folgen die von Kernlokalisationssignalen 1 und 2 (*nuclear localisation signal*, NLS) flankierten 6 *Ankryn-Repeats (ANK, auch cdc10 Repeats)*. Diese vermitteln Protein-Protein Interaktionen und sind insbesondere am ordnungsgemäßen Zusammenbau des Transkriptionskomplexes bestehend aus Notch, CSL und *Mastermind-like (MAML)* Proteinen beteiligt<sup>23</sup>. Die *notch*

*cytokin response* Sequenzen (NCR) bei Notch1 bis -3 binden an transkriptionelle Ko-Aktivatoren<sup>24</sup>. Daran schließt sich bei Notch1 und Notch2 eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne (TAD) an, welche für die Transkription einiger Zielgene notwendig ist<sup>25</sup>. Am C-terminale Ende befindet sich noch eine PEST Sequenz, welche die Ubiquitinierung vermittelt und damit für die Proteinstabilität verantwortlich ist<sup>26,27</sup>.



**Abb. 1.2 Struktur der humanen Notch Rezeptoren (modifiziert nach Allenspach *et al.*<sup>28</sup>)**

Der Notch Rezeptor wird als Heterodimer exprimiert. Die extrazelluläre Domäne ist dabei mit der transmembranären Domäne nicht kovalent in der Heterodimerisierungsdomäne verbunden. Extrazellulär befindet sich das Signalpeptid, gefolgt von vielen *EGF-like Repeats* welche die Ligandenbindungsdomäne darstellen und den *Lin12 Repeats* (LNR) welche die Weiterleitung von Signalen in Abwesenheit von Liganden verhindern. Auf dem intrazellulären Teil (N<sup>IC</sup>) befinden sich 2 Kernlokalisationssignale (NLS1, NLS2), die RAM23 (RAM), die PEST Domäne für die Regulation der Proteinstabilität und *Ankryn Repeats* (ANK) für Protein-Interaktionen. Humanes Notch1, -2 und -3 haben zusätzlich *notch cytokin response* (NCR) Sequenzen und Notch1 und -2 eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne (TAD).

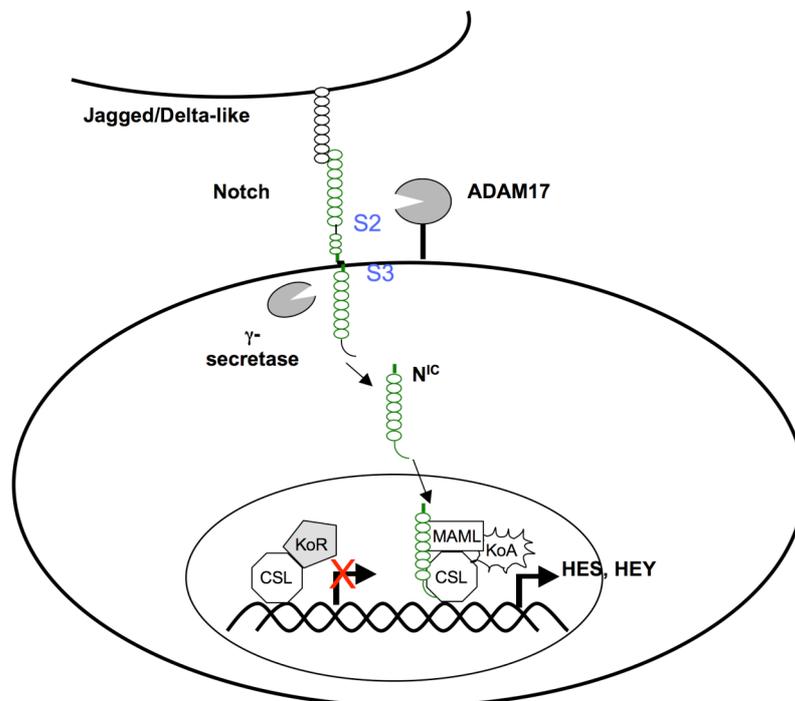
### 1.2.2. Die Notch Signaltransduktion

Die Notch Signaltransduktion wird durch die Rezeptor-Ligand Interaktion zwischen benachbarten Zellen initiiert (Abb. 1.3). Dabei werden 2 proteolytische Schritte in Gang gesetzt. Zunächst schneidet die Metalloproteinase ADAM17 (*a disintegrin and metalloproteinase 17*) an der Schnittstelle 2 (S2) kurz oberhalb der Transmembrandomäne<sup>29</sup>. Der verbleibende Rezeptoranteil bildet dadurch ein Substrat für einen  $\gamma$ -Sekretase-Presenilin Komplex, welcher Notch an der Schnittstelle 3 (S3) in der Transmembranregion spaltet<sup>30</sup>. Während die abgespaltene extrazelluläre Domäne durch die Liganden-exprimierende Zelle durch Endozytose aufgenommen wird, transloziert der frei gewordene zytoplasmatische Anteil des Notch Rezeptors (N<sup>IC</sup>) in den Zellkern<sup>31</sup>. Dort interagiert es mit dem DNA-bindenden Protein CSL. Ohne die Bindung von N<sup>IC</sup> an CSL ist dieses mit einem Ko-

Repressor Komplex (KoR) assoziiert. Dieser besteht u. a. aus dem *silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor* (SMRT), *Nuclear receptor CoRepressor* (N-CoR), *SMRT and HDAC associated repressor protein* (SHARP), *CBF-interacting repressor* (CIR) und der Histondeacetylase1 (HDAC-1)<sup>32-34</sup>.

Nach erfolgter Bindung von N<sup>IC</sup> an CSL werden die Ko-Repressoren durch Ko-Aktivatoren ersetzt, wodurch CSL von einem Repressor in einen transkriptionellen Aktivator konvertiert wird<sup>35</sup>. Der Ko-Aktivator Komplex (KoA) besteht dabei aus verschiedenen Histon Acetyltransferasen (HAT), wie PCAF und GCN5<sup>36</sup> und wird von *Mastermind-like* (MAML) Proteinen stabilisiert<sup>35</sup>.

Neben CSL-abhängigen Mechanismen konnte gezeigt werden, dass auch CSL-unabhängige Aktivierung von Zielgenen möglich sind<sup>37</sup>.



**Abb. 1.3 Der Notch Signalweg (modifiziert nach Radtke und Raj.<sup>38</sup>)**

Nach direktem Zell-Zellkontakt mit dem membranständigen Notch Liganden auf der Nachbarzelle finden 2 proteolytische Schnitte statt. Zuerst schneidet die Metalloproteinase ADAM17 an der S2 Schnittstelle, dann wird der verbleibende Notch Rezeptoranteil zum Substrat für den  $\gamma$ -Sekretasekomplex, der die S3 Schnittstelle proteolytisch prozessiert. Das intrazelluläre Notch Fragment (N<sup>IC</sup>) wird frei, transloziert in den Nucleus und bindet an CSL. Dieses wird durch Rekrutierung des MAML und weiterer Moleküle von einem Ko-Repressor (KoR) zu einem Ko-Aktivator (KoA) und startet als Transkriptionsfaktor die Expression der Zielgene.

In Hinblick auf die zahlreichen Prozesse die von Notch reguliert werden, ist es erstaunlich, dass bis heute nur wenige direkte Notch Zielgene identifiziert wurden. Dazu zählen vor allem die basischen helix-loop-helix (bHLH) transkriptionellen Repressoren der *Hairy/Enhancer of Split* (HES) Familie und der *Hairy/Enhancer of Split-like with Y-motif* (HEY) Familie<sup>39,40</sup>.

Durch HES1 reprimiert werden z.B. die Gene *MyoD* und *Mash1*, welche in der Myogenese bzw. der Neurogenese eine Rolle spielen<sup>41,42</sup>. Im Mausgenom gibt es 7 *HES* Gene (*HES1-7*) und 3 *HEY* Gene (*HEY1, -2 und -L*) von denen aber nur *HES1, -5 und -7* und die *HEY* Gene durch Notch Aktivierung induziert werden. Weitere direkte Zielgene von Notch sind *CD25*<sup>43</sup> und der Transkriptionsfaktor *GATA3*<sup>44</sup>, welche für die Entwicklung von T-Zellen wichtig sind. Zusätzlich sind Zielgene bekannt, die in Verbindung mit Tumorerkrankungen gebracht werden. Dazu gehören *c-myc*<sup>45,46</sup>, *cyclinD1*<sup>47</sup> und *p21*<sup>Waf1/Cip1</sup><sup>48</sup>.

### 1.2.3. Der Notch Signalweg und Tumorentstehung

Wie schon beschrieben, hat Notch vielfältige Funktionen in einer großen Anzahl zellulärer Prozesse und ist damit ein wichtiger Bestandteil in der Entwicklung jedes Organismus. Es ist daher nicht verwunderlich, dass eine Fehlregulation des Notch Signalweges oder Mutationen seiner Komponenten mit zahlreichen Krankheiten und Tumoren assoziiert sind. Ein interessanter Aspekt von Notch ist der scheinbar gegensätzliche Effekt, den die Signalgebung auf die Tumorentstehung hat. So können Mitglieder der Notch Familie sowohl als Tumorpromotor in Erscheinung treten als auch als Tumorsuppressoren. Diese duale Rolle ist meist abhängig vom Zeitpunkt, Zelltyp und Kontext. Allerdings können auch innerhalb eines Organsystems Unterschiede auftreten. So wurde in humanen embryonalen Gehirntumoren für Notch 1 eine tumorsuppressive Rolle beschrieben während Notch 2 onkogenes Potential besitzt<sup>49</sup>. Es ist sogar möglich, dass nur ein Mitglied der Notch Familie beide Rollen in einem Organsystem erfüllen kann. So ist Notch1 in der Haut ein Tumorpromotor im Melanom<sup>50</sup> aber ein Tumorsuppressor in Plattenepithelkarzinomen der Keratinozyten<sup>51</sup>.

#### Notch als Onkogen

Der erste Nachweis für eine onkogene Rolle von Notch wurde 1991 erbracht<sup>52</sup>. Ellisen *et al.* fanden heraus, dass bei der T-Zell-akuten lymphatischen Leukämie (*T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma*, T-ALL) eine chromosomale Translokation und Fusion des 3' Endes des humanen *Notch1* Gens mit dem *T-Zell Rezeptor β* (TCRB) Locus stattfand [t (7; 9) (q34;q34.3)]. Dies führt zur Expression einer verkürzten, konstitutiv aktiven Form von Notch1, welche die T-ALL verursacht. Heute ist bekannt, dass weitere Formen von Aktivierungsmutationen im Notch1 Gen vorkommen können, die bei bis zu 60% der T-ALL Patienten gefunden werden<sup>53</sup>. Die abnorme Notch Signaltransduktion führt wahrscheinlich über Aktivierung von CyclinD und Myc sowie Inhibition von p53, zu verstärkter Proliferation und Überleben der T-ALL Zellen<sup>54</sup>. Neben Notch1 wurden aber auch Mutationen in Notch2

mit Leukämien in Verbindung gebracht. So wurden in Lymphomen von Katzen aktivierte Notch2 Proteine entdeckt, die mit dem Felinen Leukämie Virus (FeLV) infiziert waren<sup>55</sup>.

Neben hämatologischen Tumorerkrankungen, zeigt Notch aber auch in soliden Tumoren onkogenes Potential. Den ersten Hinweis darauf lieferte die Untersuchung neoplastischer Transformationen von Brustdrüsen bei Mäusen. Innerhalb des *Notch4* Gens (früher *int-3*) liegt eine wichtige Integrationsstelle des *Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV). Dies führt zur Überexpression von Notch4 und schließlich zur Transformation des Brustgewebes<sup>56</sup>. Weiterführende Studien zeigten, dass durch Überexpression von Notch4 im Brustgewebe, die Morphogenese und Differenzierung der Brustdrüsen inhibiert wird<sup>57</sup>. Beim Menschen kann ebenfalls eine Überexpression von Notch4, aber auch von Notch1 bei Brustkrebspatienten gefunden werden<sup>58</sup>.

Notch1 spielt auch in der Tumorgenese von Melanomen eine wichtige Rolle. Diese entstehen aus Melanozyten, die sich neben den basalen Keratinozyten in der Haut befinden. In Melanomen wird durch Notch1 die Expression von  $\beta$ -catenin und N-cadherin reguliert, welche zu verstärktem Wachstum, Überleben und Metastasierung führen<sup>50,59</sup>.

Doch auch in anderen Tumoren wurde Überexpression der Notch Rezeptoren gefunden. Dazu gehören u. A. Lungenkarzinome<sup>60</sup>, Neuroblastome<sup>61</sup>, Pankreaskarzinome<sup>62</sup>, Cervixkarzinome<sup>63</sup>, Prostatakarzinome<sup>64</sup>, und Nierenzellkarzinome<sup>65</sup>.

### Notch als Tumor Suppressor

Der Notch Signalweg kann jedoch auch abhängig von Zelltyp und Kontext zu Wachstumsarrest oder Apoptose führen und hat damit tumorsuppressive Eigenschaften. Das Organsystem in dem dies am Besten charakterisiert ist, ist die Haut. In der Maus induziert Notch1 in primären Keratinozyten Zellzyklusarrest und aktiviert die Differenzierung der Zellen<sup>48</sup>. Der konditionelle *Knockdown* von Notch1 hingegen führt zur Entstehung von Karzinomen der Haut<sup>66</sup>. Biochemisch wird dieser tumorsuppressive Effekt von Notch durch Induktion von p21<sup>Waf1/Cip1</sup> vermittelt, einem wichtigen Inhibitor des Zellzyklus<sup>48</sup>. Zusätzlich inhibiert Notch1 den Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweg. Dieser ist assoziiert mit der Homöostase von Krebsstammzellen in der Haut<sup>67</sup>.

Mögliche therapeutische Ansatzpunkte zur Behandlung von Tumoren, die durch fehlregulierte Notch Signaltransduktion gekennzeichnet sind, ist die Inhibition der Proteine, welche die proteolytische Spaltung der Notch Rezeptoren vermitteln. Im Fokus sind dabei derzeit besonders  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren (GSI)<sup>68</sup>. Diese inhibieren alle Notch Rezeptoren gleichmäßig. Der Nachteil einer GSI Therapie ist daher, dass die unterschiedlichen Funktionen der verschiedenen Notch Rezeptoren in den Geweben nicht berücksichtigt werden kann. Die Zukunft der Notch Inhibition könnte daher eher in der Verwendung

selektiver Notch Antikörper bestehen. Diese werden seit April 2010 in präklinischen Studien getestet<sup>69</sup>.

#### 1.2.4. Die Rolle von Notch im Lungenkrebs

Quantitative Expressionsanalysen zeigen eine Zunahme in der Expression der 4 Notch Rezeptoren und der Liganden Delta-like1 und Jagged1 von der murinen fötalen Lunge bis zur adulten Maus<sup>15</sup>, wodurch ein Einfluss dieses Signalweges auf die Entwicklung und Homöostase des Lungengewebes impliziert wird. Über eine biologische Funktion der Notch Signaltransduktion bei der Entstehung von Tumoren in der Lunge, gibt es bisher jedoch nur wenige Erkenntnisse. So wurde bisher gezeigt, dass vor allem Notch3 überexprimiert wird und eine onkogene Rolle im NSCLC hat<sup>68</sup>. Konishi *et al.* inhibierten Notch3 und konnten damit die Proliferation von Tumorzelllinien reduzieren und Apoptose induzieren<sup>68</sup>. Außerdem zeigten sie in einer nachfolgenden Arbeit, dass Notch3 mit dem EGFR Signalweg kooperiert, um Apoptose in den Tumorzellen zu inhibieren<sup>70</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass konstitutiv aktives Notch3 die Morphologie der Lunge verändert und die terminale Differenzierung der Epithelzellen inhibiert<sup>71</sup>.

Ebenfalls wurde in NSCLC Zelllinien verstärkte Proteinexpression der anderen Notch Rezeptoren, der Liganden und des Notch Zielgenes HES1 gezeigt<sup>68</sup>. Neben Notch3 hat auch Notch1 eine onkogene Rolle im NSCLC<sup>72</sup>. Chen *et al.* zeigten, dass Notch1 vor allem unter Sauerstoffmangelbedingungen (Hypoxie) induziert wird und die NSCLC Zellen vor Apoptose schützt<sup>73</sup>. Den selben Zusammenhang sahen auch Elias *et al.*, welche zusätzlich noch zeigten, dass das Überleben von Lungenkarzinomzellen über die Aktivierung des *Insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF-1R) stimuliert wird<sup>74</sup>. Neben Überexpression von Notch1, wurden vor kurzem auch Aktivierungsmutationen in Notch1 in NSCLC Biopsaten von Patienten gefunden<sup>75</sup>. Dieselbe Arbeitsgruppe fand weiterhin in einigen Biopsaten auch den Verlust des negativen Notch Regulators NUMB. Sowohl die Aktivierungsmutation als auch der Verlust des negativen Regulators, führen zu einer verstärkten Notch1 Signaltransduktion und HES1 Expression im NSCLC<sup>75</sup>. Über Notch2 und Notch4 in Lungentumoren gibt es dagegen bisher kaum funktionelle Daten.

#### 1.3. Der Epidermis-Wachstumsfaktor Signalweg

Der Epidermis-Wachstumsfaktor (*Epidermis Growth Factor*, EGF) - Signalweg spielt eine tragende Rolle in der zellulären Homöostase. Er vermittelt Signale zum Wachstum, Zellteilung, Überleben sowie Differenzierung und stellt einen zentralen Punkt in einem komplexen Netzwerk weiterer Signaltransduktionswege dar. Die Familie der im Menschen

vorkommenden EGF-Rezeptoren besteht aus vier strukturell nah verwandten Rezeptortyrosinkinasen (RTK), dem EGFR, auch humaner EGF Rezeptor HER1 (oder ErbB1), HER2/neu (ErbB2), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4). RTKs sind Transmembranproteine mit einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer einzelnen Transmembran-Region und einer zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne<sup>76</sup>. Die RTK-Familien unterscheiden sich dabei hauptsächlich in den strukturellen Motiven der Ligandenbindungsdomäne.

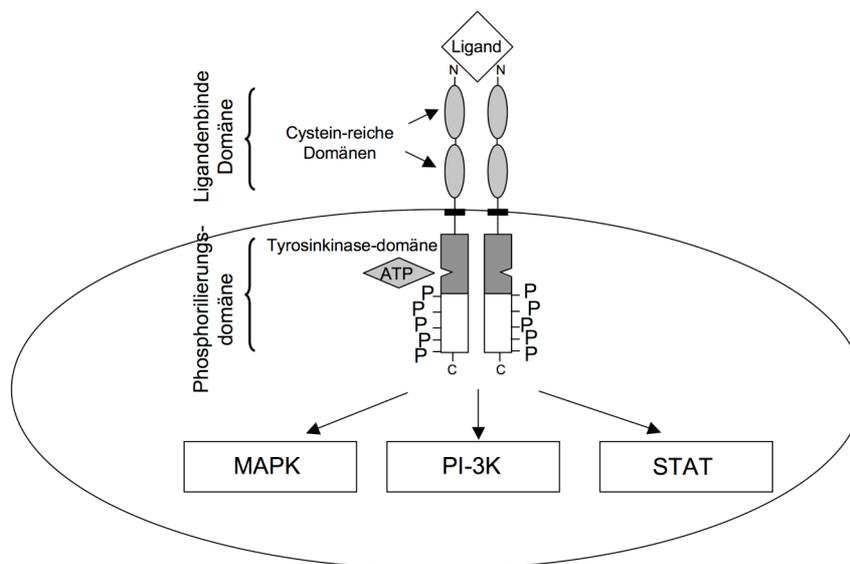
Die Rezeptoren des EGF Signalweges haben ein Molekulargewicht von 170kDa und kommen auf fast allen Säugetierzellen vor<sup>77,78</sup>. Extrazellulär befinden sich Cystein-reiche Domänen, zwischen denen sich die Bindungsstellen für die Liganden befinden. Intrazellulär befindet sich eine Tyrosinkinasedomäne, welche den Transfer des  $\gamma$ -Phosphats von ATP auf Hydroxylgruppen von Tyrosinen der Zielproteine überträgt. Von den EGF-Rezeptoren haben jedoch nur der EGFR, HER2 und HER4 Kinaseaktivität. Bei HER3 ist die Kinase Domäne verkürzt und nicht funktionsfähig.

Bislang sind 11 Liganden beschrieben die an die Rezeptoren des EGF-Signalweges binden. Zu ihnen gehören u.a. EGF, *Heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF), *Transforming growth factor alpha* (TGF $\alpha$ ), Amphiregulin, Betacellulin, Epiregulin, Epigen und Neuregulin<sup>79</sup>. Die meisten dieser Liganden werden zunächst als membranständige Vorformen exprimiert. Erst die Aktivität einer Proteinase überführt die Liganden in soluble Mediatoren, wodurch sie durch autokrine und parakrine Mechanismen an den entsprechenden Rezeptor binden und ihn aktivieren können. Verantwortlich dafür sind Proteinase der ADAM Familie<sup>80</sup>, mit ADAM17 und ADAM10 als wichtigste Proteinase für Liganden der EGF Rezeptoren<sup>81,82</sup>. Beide Proteinase haben dabei ein spezifisches Spektrum an EGF Rezeptor Liganden, die sie prozessieren. So fanden Sahin *et al.* heraus, dass EGF und Betacellulin hauptsächlich durch ADAM10 prozessiert werden, während das bei Epiregulin, TGF $\alpha$ , Amphiregulin und HB-EGF ADAM17 ist<sup>83</sup>.

Unstimuliert liegen die EGF Rezeptoren als Monomere vor. Die Konformation des Rezeptors verhindert durch sterische Inhibition die Dimerisierung und damit dessen Aktivierung. Nach erfolgter Bindung mit einem Liganden, wird dann die Dimerisierung des Rezeptors induziert. Dabei entstehen Homo- oder Heterodimere aus verschiedenen EGF Rezeptoren, mit HER2 als favorisierten Dimerisierungspartner<sup>84</sup>. Man geht davon aus, dass der Ligand die Wahl der Dimerisierungspartner beeinflusst und dies auch die weitere Signaltransduktion modulieren kann<sup>85</sup>. Die Dimerisierung führt zur Auto- und Transphosphorylierung von Tyrosinresten am C-Terminus der Rezeptoren. Diese Domäne wiederum interagiert mit anderen Proteindomänen, um die verschiedenen zellulären Prozesse zu regulieren, wobei sowohl die Phosphotyrosine als auch die nicht phosphorylierten Peptidsequenzen eine Rolle spielen können<sup>86</sup>. Die src Homologie 2 (SH2) Domäne ist dabei die am meisten genutzte

Interaktionsdomäne für phosphorylierte Tyrosinreste und dient als Bindestellen für Proteine, die ebenfalls eine SH2 - Domäne besitzen<sup>87</sup>. Proteine mit SH2 Domäne sind z.B. Phospholipase C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), Src und GAP (Ras GTPase Aktivierung)<sup>87</sup>.

Daraufhin werden verschiedene Signalkaskaden ausgelöst, von denen die wichtigsten der *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK) – Signalweg, der Phosphoinositol-3-Kinase (PI-3K) Signalweg und der *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) - Signalweg sind (Abb. 1.4). Die Effektorproteine der jeweiligen Signalwege translozieren in den Zellkern und binden dort an spezifische DNA-Elemente und regulieren so die Expression ihrer Zielgene.



**Abb. 1.4 Schematische Darstellung des EGFR und der EGFR-vermittelten Signaltransduktion**

Der EGFR besteht aus extrazellulären Cystein-reichen Domänen mit der Liganden Bindungsstelle und der intrazellulären Phosphorylierungsdomäne. Kommt es zur Bindung mit einem Liganden, erfolgt zunächst die Dimerisierung mit einem weiteren Rezeptor der EGF Rezeptorfamilie. Die Tyrosinkinasedomäne vermittelt anschließend die Auto- und Trans-Phosphorylierung im C-terminalen Bereich des Rezeptors. Durch Bindung von Proteinen an diese Domäne werden die nachgeschalteten Signalwege aktiviert. P = Phosphorylierungsstellen

### 1.3.1. Der EGF Signalweg und Tumorentstehung

Der EGF Signalweg spielt jedoch nicht nur in der Homöostase normaler Zellen eine entscheidende Rolle, sondern auch in zahlreichen Tumorzellen. Oft führen Überexpression der Rezeptoren, Aktivierungsmutationen oder autokrine Überstimulation zu Tumorerkrankungen. Als Folge der fehlregulierten Signaltransduktion können weitere genomische Abnormalitäten in Zellen akkumulieren, da diese Zellen nun z.B. durch Inhibition der Apoptose und Missachtung mitotischer *Checkpoints* überleben. So wird Überexpression von HER2 mit einer aggressiveren Form des Mammakarzinoms in Verbindung gebracht<sup>88</sup>, während HER3 bei der Tumorgenese des Lungenkarzinoms eine Rolle spielt<sup>89</sup>. Doch neben

HER3 ist es vor allem die Überexpression oder konstitutive Aktivierung des EGFR, welche häufig auch bei NSCLC Patienten gefunden werden. Im Fall der Überexpression trifft dies auf bis zu 60%<sup>10,90-92</sup> der NSCLC Fälle zu, während EGFR Mutationen in 5-10% kaukasischer Patienten<sup>93,94</sup> und bis zu 30% bei asiatischen Patienten<sup>93</sup> auftreten. Die Überexpression des EGFR ist dabei sowohl das Produkt von Gen-Amplifikationen, als auch von transkriptionellen und post-transkriptionellen Prozessen<sup>92</sup>. Seit vielen Jahren steht der EGFR daher im Fokus gezielter therapeutischer Strategien gegen NSCLC.

1985 wurde von Drebin und Kollegen zum ersten Mal ein monoklonaler Antikörper (mAk) gegen die Liganden-bindende Domäne von HER2 verwendet<sup>95</sup>. Daraufhin beobachteten sie die Abnahme der HER2 Expression auf der Zelloberfläche und eine Reversion des transformierten Phänotyps der Zellen. Aktuell sind mAk ein wichtiger Teil der gezielten Krebstherapie und neue Kombinationen von mAk mit traditionellen Chemotherapeutika Bestandteil klinischer Studien<sup>96,97</sup>. Für NSCLC Patienten werden so u. a. die mAk Cetuximab<sup>98</sup> und Panitumumab<sup>99</sup> verwendet, die spezifisch gegen die Liganden-bindende Domäne des EGFR gerichtet sind. Auch gegen die Tyrosinkinase Domäne des Rezeptors sind Inhibitoren im Einsatz. Für die Therapie von NSCLC Patienten werden die Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) Gefitinib und Erlotinib verwendet, die sich bei mutiertem EGFR als effektiv erwiesen haben<sup>100,101</sup>. Leider bringen diese Therapien für den Großteil der Patienten keinen großen Überlebensvorteil oder es erfolgt ein Rückfall nach zunächst geglückter Remission<sup>102,103</sup>. Die Erforschung neuer molekulare Strukturen und effektiver Strategien für die Behandlung des NSCLC ist daher von immenser Bedeutung.

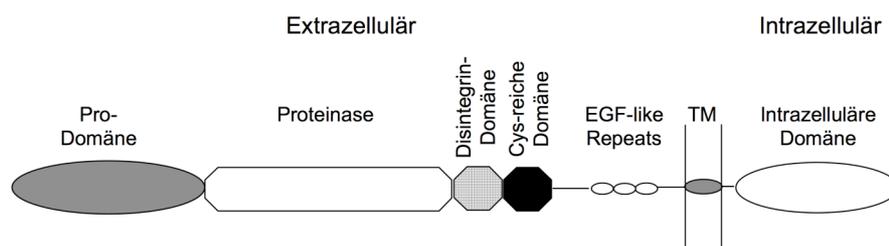
### **1.4. Die Metalloproteinase ADAM17**

Lösliche Proteine werden bei vielen Prozessen zellulärer Kommunikation benötigt. Nicht immer werden diese Proteine auch löslich sezerniert, sondern werden zunächst als Transmembranproteine an der Zelloberfläche exprimiert. Da sie erst proteolytisch geschnitten werden müssen, erhält die Zelle eine weitere Ebene regulatorischer Kontrolle in der Signaltransduktion. Für diese proteolytische Prozessierung (*shedding*) sind sogenannte Sheddasen verantwortlich, die hauptsächlich zur ADAM Familie gehören<sup>104,105</sup>. Diese gehören zur Unterfamilie der Adamlysin aus der Superfamilie Zink-abhängiger Matrix Metalloproteinasen (MMP)<sup>106</sup>. Durch ihre regulierende Funktion spielen sie eine fundamentale Rolle in vielen biologischen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Migration.

ADAM Gene wurden in einer großen Anzahl von Arten gefunden und es existieren mehr als 30 Orthologe. 21 davon kommen im Menschen vor, wobei jedoch nur 13 von ihnen auch katalytische Aktivität zeigen<sup>105</sup>. Das am besten charakterisierte Protein der ADAM Familie ist

ADAM17. Dieses wurde ursprünglich als Konvertase des Tumornekrosefaktors  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) identifiziert und wird daher auch *Tumour necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme* (TACE) genannt<sup>107,108</sup>.

Synthetisiert wird ADAM17 als inaktive Vorstufe mit einer speziellen Pro-Domäne, welche die katalytisch aktive Domäne des Proteins zunächst blockiert. Während des Transports an die Zelloberfläche wird die Pro-Domäne durch eine *Furin-like* Pro-Protein Konvertase entfernt<sup>109</sup>. Weitere Domänen von ADAM17 sind die katalytische Proteinase-Domäne mit dem namensgebenden Zink-Ion, die Disintegrin-Domäne, eine Cystein reiche Domäne, den *EGF-like Repeats*, die transmembran Region und dem intrazellulären Bereich (Abb.1.5).



**Abb. 1.5 Schematische Darstellung der Metalloproteinase ADAM17 (modifiziert nach Black und White<sup>110</sup>)**

ADAM17 ist ein Transmembranprotein bei dem sich extrazellulär eine Pro-Domäne, die katalytisch aktive Proteinase Domäne, die Disintegrin Domäne, Cystein-reiche Domäne und die *EGF-like Repeats* befinden. Anschließend an die Transmembran Region (TM) folgt die intrazelluläre Domäne.

ADAM17- vermitteltes *Shedding* kann über verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Dazu zählen Phorbol ester, Apoptose oder Aktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren<sup>80,111,112</sup>. ADAM17 wird in sehr vielen Geweben exprimiert und es besitzt ein sehr breites Substratspektrum. Dazu gehören u. a. Wachstumsfaktoren wie Amphiregulin, HB-EGF und TGF $\alpha$ , Zytokine wie TNF $\alpha$  und CX3CL-1, Adhäsionsproteine wie CD44 und L-Selektin und auch Rezeptoren wie der IL-6 Rezeptor, der TNF Rezeptor und CD30<sup>105,113</sup>. Erstaunlich ist, dass es keine Konsensus Sequenz für die proteolytische Prozessierung gibt und die Substrate sehr unterschiedlich und strukturell nicht verwandt sind.

Die zahlreichen Substrate zusammen mit Ergebnissen aus *Knockout* Studien zeigen, wie essentiell ADAM17 zum Überleben ist. ADAM17 *Knockout* Mäuse sind nicht lebensfähig und sterben direkt nach der Geburt. Dabei zeigen sie schwere phänotypische Veränderungen, wie Defekte bei der Haar- und Hautentwicklung, mangelhafte Augenlidentwicklung sowie abnorme Lungen- und Herzentwicklung<sup>104,114,115</sup>. ADAM17 *Knockout* Mäuse zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie TGF $\alpha$  *Knockout* Mäuse<sup>104</sup>.

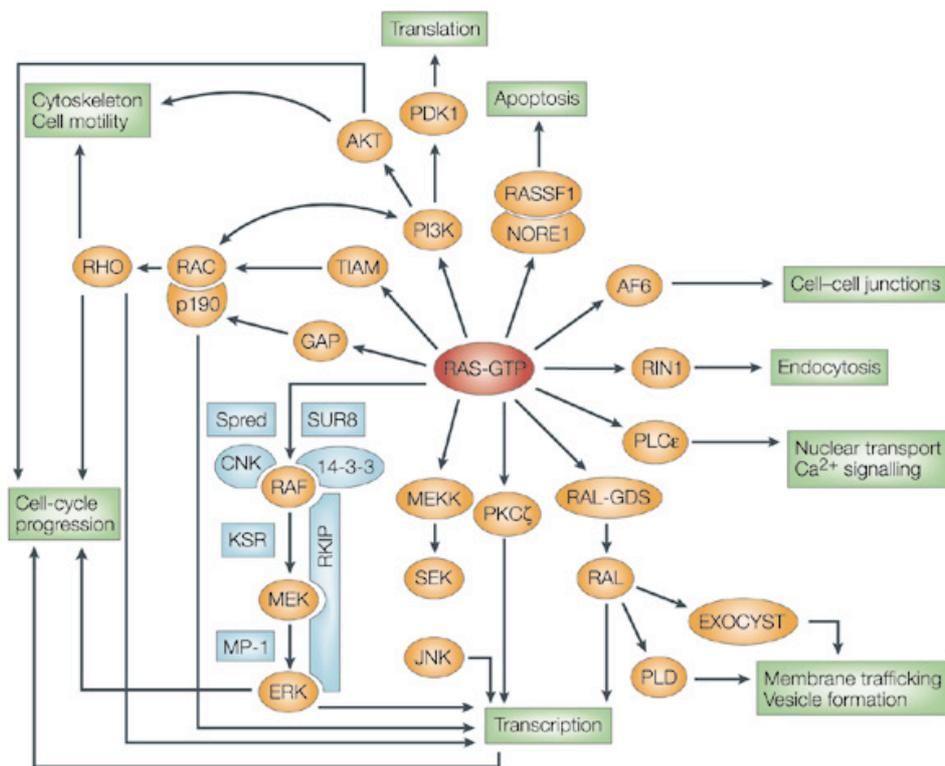
ADAM17 konnte auch mit der Entstehung von Tumoren wie dem Lungenkarzinom, Mammakarzinom, Kolonkarzinom und Nierenzellkarzinom in Verbindung gebracht werden<sup>81,89,111,116-118</sup>. So trägt ADAM17 z.B. durch die Regulation der Verfügbarkeit von

EGFR Liganden, entscheidend zur Aktivierung dieses für viele epitheliale Tumoren wichtigen Signalweges bei.

Da es eine prominente Rolle am Anfang verschiedener Signalkaskaden spielt, wäre ADAM17 ein möglicher neuer Ansatzpunkt für pharmakologische Inhibition.

### 1.5. Kras als Onkogen im Lungenkrebs

Ras Proteine sind eine Untergruppe der Ras Superfamilie und sind 21kDa große, membrangebundene Guanosin Triphosphatasen (GTPasen). Durch ihre Position in der Signalkaskade als Effektormoleküle von RTKs stehen sie als molekularer Schalter zwischen extrazellulären Veränderungen und der intrazellulären Signaltransduktion<sup>119</sup>. Sie interagieren mit einer Vielzahl von nachgeschalteten Signaltransduktionswegen (Abb. 1.6), zu denen u.a. der MAPK- und PI-3K Signalweg zählen. Dadurch haben Ras Proteine Einfluss auf elementare zelluläre Prozesse der Zelle wie Proliferation, Überleben, Differenzierung und Migration<sup>120</sup>.



**Abb. 1.6 Ras-vermittelte Aktivierung von Signaltransduktionswegen nach Malumbres und Barbacid<sup>121</sup>**

Ras vermittelt als Effektormolekül von RTKs die extrazellulären Stimuli und leitet diese an zelluläre Signalnetzwerke weiter. Ras aktiviert u.a. den MAPK Signalweg (Raf-MEK1/2-ERK1/2) und den PI-3K Signalweg und vermittelt somit Signale für die Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zellen.

Das erste Ras Protein wurde 1964 entdeckt und zunächst als Onkogen beschrieben. Harvey *et al.* fanden heraus, dass das genetische Material eines Retrovirus bei Ratten ein Sarkom

hervorrufft. Dieses Ratten-Sarkom (ras)-induzierende Virus wurde nach dem Entdecker Harvey als Harvey-ras (Hras) bezeichnet<sup>122</sup>. 1967 wurde ein weiteres Ras-induzierendes Virus von Kirsten *et al.* entdeckt und daraufhin als Kras (nach Kirsten – ras) bezeichnet<sup>123</sup>. Anfang der 1980er Jahre konnten dann auch die humanen Homologe dieser Proteine aus Krebszelllinien isoliert werden<sup>124,125,126</sup> und es wurde ein weiteres Mitglied, das Neuroblastoma-Ras (Nras), entdeckt<sup>127</sup>. Insgesamt gibt es damit bei Säugetieren 3 verschiedene, funktionelle Ras Gene, die sich auf unterschiedlichen Chromosomen befinden. *Knockout* Studien mit Mäusen zeigen, dass nur *Kras* essentiell für die Entwicklung ist. So sind Mäuse mit Deletion in diesem Gen embryonal lethal<sup>128,129</sup>. Von *Kras* existieren 2 bekannte *Splicing* Varianten: *Kras4a* und *Kras4b*. Diese besitzen verschiedene Funktionen in der Signalaktivierung und Embryonalentwicklung und nur *Kras4b* ist für die Embryonalentwicklung tatsächlich essentiell<sup>130</sup>.

Für die Weiterleitung extrazellulärer Signale zu den Ras Proteinen wird zunächst - nach erfolgter Stimulation der RTKs - das *Growth factor receptor binding protein 2* (Grb2) aktiviert. Dieses bindet an die phosphorylierten Tyrosinreste der RTKs und assoziiert anschließend mit den Ras- Guanosin Nukleotid Wechsel Proteinen (*Guanosin Exchange Factors*, GEF)<sup>131,132</sup>. GEF's (z.B. SOS1, SOS2) katalysieren dann die Abspaltung von Guanosin Diphosphat (GDP) vom Ras Protein<sup>133</sup>. In der leeren Bindetasche des Ras Proteins kann nun das reichlich in der Zelle vorhandene Guanosin Triphosphat (GTP) binden. Durch Hydrolyse des GTP wird das aktive Ras wieder inaktiv. Obwohl Ras selbst geringe GTPase Aktivität besitzt, wird dieser Prozess zusätzlich durch GTPase aktivierende Proteine (GAP) katalysiert<sup>134</sup>. Im aktiven Zustand von Ras bewirkt das zusätzliche Phosphat des GTP eine Konformationsänderung des Proteins, wodurch eine erhöhte Affinität für die Effektorproteine erzielt wird<sup>135</sup>. Daraufhin werden nachgeschaltete Signalwege aktiviert.

Die am besten charakterisierte Ras-vermittelte Signaltransduktion ist die Aktivierung des MAPK Signalweges. Dafür bindet aktiviertes GTP-Ras an die *rapidly growing fibrosarcoma* (Raf) Kinase. Diese wird dadurch an die Zellmembran rekrutiert, wo zusätzliche Phosphorylierung von Raf stattfindet. Anschließend phosphoryliert Raf MEK1/2, welches wiederum die *extracellular regulated kinase* (Erk1/2) phosphoryliert. Das so aktivierte Erk1/2 transloziert in den Zellkern und führt über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der *E-twenty six* (Ets) –Familie zur Transkription von Zielgenen<sup>136</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass hyperaktives Ras über den MAPK Signalweg zu Entwicklungsstörungen<sup>137</sup> oder zu Seneszenz<sup>138</sup> führen kann.

Weiterhin ist der PI-3K Signalweg sehr gut untersucht. Über die Aktivierung von Akt werden hier pro-apoptotische Proteine gehemmt und damit Einfluss auf das Überleben der Zelle ausgeübt<sup>139</sup>.

### 1.5.1. Onkogenes Ras

Ras Proteine sind klassische Proto-Onkogene bei denen Punktmutationen in den Codons 12, 13 und 61 zu konstitutiver Aktivierung und damit zu deregulierter konstitutiver Signaltransduktion führen<sup>140,141</sup>.

Mutierte Ras Proteine werden in vielen Krebsarten gefunden. Dazu gehören vor allem Pankreaskarzinome (90% Inzidenz)<sup>142</sup> und Kolonkarzinome (40-50% Inzidenz)<sup>143,144</sup> aber auch Lungenkarzinome (30% Inzidenz)<sup>9</sup>, wobei Kras im Gegensatz zu den anderen Ras Proteinen am häufigsten mutiert ist<sup>140</sup>. Zusätzlich belegen in vitro Studien, dass Kras auch das größte Potential für die Transformation von Zelllinien hat<sup>145</sup>.

Von einer Mutation ist besonders häufig Codon 12 (GGT – Glycin, G) betroffen. Diese Punktmutation führt an Stelle von Glycin zur Translation zu Aspartat (G12D) oder Valin (G12V). Das bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins nahe der Bindungsdomäne für die GAP. Dadurch wird die Hydrolyse von GTP zu GDP gehemmt und das Kras Protein erfährt eine konstitutive Aktivierung<sup>146</sup>. Dadurch werden auch die nachgeschalteten Signalwege konstitutiv aktiviert, was in unkontrollierter Proliferation und Inhibition der Apoptose resultiert.

In der Lunge werden Kras Mutationen hauptsächlich in Adenokarzinomen gefunden, während sie in den anderen Unterformen des NSCLC oder auch im SCLC eher selten auftreten<sup>9,147</sup>. Bei Nichtrauchern treten dabei hauptsächlich Transitionsmutationen (G→A) auf, während es bei Rauchern Transversionsmutationen (G→T, G→C)<sup>148</sup> sind.

### 1.5.2. Das Kras<sup>G12D</sup>-induzierte Lungentumor Mausmodell

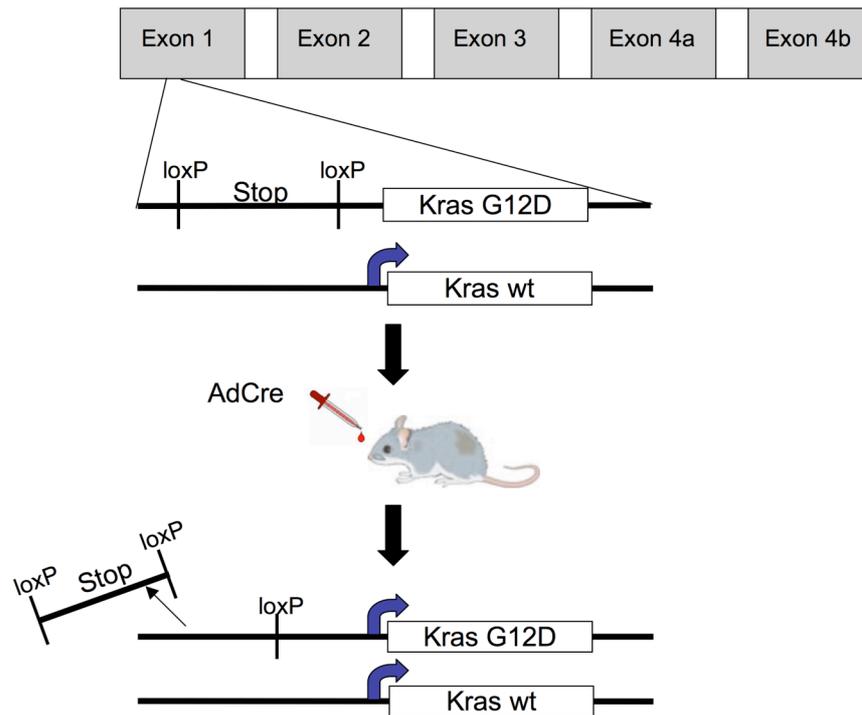
Um die Entstehung und Entwicklung von Lungentumoren genauer zu untersuchen, werden neben Zellkulturexperimenten vielfach auch Mausmodelle verwendet. Dadurch wird eine noch genauere Entschlüsselung der Mechanismen unter verschiedenen Bedingungen *in vivo* ermöglicht.

Für die Untersuchung von Bronchialkarzinomen wurden verschiedene Mausmodelle generiert. Zunächst gibt es Modelle, die spontan Lungentumoren entwickeln. Diese Mausstämme besitzen häufig Polymorphismen im 2. Intron des *Kras* Gens, wodurch die Sensitivität zur spontanen Entwicklung von Tumoren gesteigert wird<sup>149</sup>. Auch durch gezielte Exposition mit Karzinogenen, wie polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen lassen sich Lungentumoren auslösen<sup>150</sup>. Nachteil dieser Modelle ist die fehlende Kontrolle über den Zeitpunkt der Tumorentstehung und die Zufälligkeit der Mutagenese, wodurch die zugrundeliegenden Prozesse nur schwer untersucht werden können. Von besonderem Interesse sind daher die transgenen Mausmodelle, bei denen genetische Veränderungen

gezielt eingeführt wurden, um Tumorwachstum auszulösen<sup>150</sup>. So exprimierten Geick *et al.* *c-myc* unter dem CC10 Promotor, welcher nur in Clara Zellen in der Lunge vorkommt. Das Ergebnis dieser Experimente war die Entwicklung bronchioalveolarer Hyperplasien in Clara Zellen<sup>151</sup>. DeMayo *et al.* exprimierten ein weiteres Onkogen, *SV40 large T antigen* unter der Kontrolle eines Promotors, der nur in den Alveolar Typ II Zellen der Lunge vorkommt und erhielten Hyperplasien und Adenokarzinome<sup>152</sup>. Der Nachteil dieser transgenen Mausmodelle ist, dass alle Zellen gleichmäßig das eingeführte Onkogen exprimieren. Die Krebserkrankungen beim Menschen sind jedoch dadurch gekennzeichnet, dass meistens nur eine Zelle entartet und klonal expandiert.

Für noch gezieltere Manipulation der Gene im adulten Tier, wurden Mausmodelle mit konditionellen Allelen entwickelt. Hier kann zusätzlich zum Zelltyp auch der Zeitpunkt der Tumoringenese bestimmt werden. Eine Möglichkeit für konditionelle Allele ist es, die entsprechenden Gene mit Hormonrezeptoren zu fusionieren<sup>153</sup> oder unter die Kontrolle von Antibiotika induzierten Promotoren zu stellen<sup>154</sup>. In einem solchen Ansatz fusionierten Fisher *et al.* *Kras*<sup>G12D</sup> hinter einen Clara Zell spezifischen, Doxzyklin sensiblen Promotor (CCSP-rtTA-*Kras*<sup>G12D</sup>). Nach Behandlung mit Doxzyklin entwickelten adulte Mäuse Adenome und Adenokarzinome. Nach Abbruch der Antibiotika Behandlung reduzierte sich die *Kras*<sup>G12D</sup> Expression und eine Regression der Tumoren wurde beobachtet<sup>155</sup>. Vorteil dieses Systems ist, dass durch Aktivierung des konditionellen Allels die Tumorigenese gezielt initiiert wird. Damit wird einer spontanen somatischen Mutation beim Menschen nachempfunden. Ein weiterer Vorteil ist, dass man nach Abbruch der Antibiotikabehandlung analysieren kann, ob ein Gen nicht nur für die Initiation, sondern auch für die Aufrechterhaltung eines Tumors notwendig ist.

Das in dieser Arbeit verwendete System ist ein weiteres Beispiel eines konditionellen Mausmodells und eines der am besten beschriebenen Mausmodelle für die Untersuchung von Lungentumoren. In dem von Jackson *et al.* entwickelten Mausmodell bedient man sich der *Cre/loxP* Technologie<sup>156,157</sup>. Dafür werden *loxP* DNA Elemente in die DNA inseriert, sodass sie spezifische Genabschnitte flankieren. Diese werden durch die Cre Rekombinase (Cre) erkannt und deletiert. Bei der *Lox-Stop-Lox Kras*<sup>G12D</sup> (*LSL-Kras*<sup>G12D</sup>) Maus wurde in Codon 12 eine Transitionsmutation von GGT zu GAT durchgeführt, wodurch das Glycin (G) durch ein Aspartat (D) ausgetauscht wird (*Kras*<sup>G12D</sup>). Dadurch kommt es zur Konformationsänderung von *Kras* und zur konstitutiven Aktivierung des Proteins. Im ersten Exon des *Kras*<sup>G12D</sup> befindet sich eine von *LoxP* Elementen umgebene „Stop Kasette“, welche transkriptionelle Stop Elemente enthält. Dadurch wird die Expression des onkogenen *Kras*<sup>G12D</sup> zunächst verhindert (Abb. 1.7).



**Abb. 1.7 Schematische Darstellung der konditionell exprimierten  $Kras^{G12D}$  Allele**

Expression des  $Kras$  Allels mit Mutation im Codon 12 ( $Kras^{G12D}$ ) wird durch eine gefloخته Stopkassette, welche transkriptionelle Stopelemente enthält, inhibiert. Diese Stopkassette befindet sich im ersten Exon vor der Mutation. Das WT  $Kras$  Allel dagegen wird exprimiert. Nach Applikation des AdCre erfolgt die Exzision der gefloخته Stopkassette durch die Cre.  $Kras^{G12D}$  wird im Bronchialepithel exprimiert.

Die Cre spezifische Deletion der Stop-Kassette im Bronchialepithel erfolgt nach Applikation von Adenoviren, welche einen adenoviralen Cre-Expressionsvektor (AdCre) tragen. Dadurch wird die  $Kras^{G12D}$ -vermittelte Tumorgenese in der Lunge initiiert. Bereits nach 4 Wochen beobachtete Jackson *et al.* Hyperplasien, die sich später zu Adenokarzinomen entwickelten<sup>156</sup>. Vorteil dieses Systems ist, dass sich die Anzahl der tumorinitierenden Zellen leicht durch die Dosis des AdCre beeinflussen lässt. Weiterhin lässt sich durch den gezielten Start der Tumorinitiation die Tumorprogression beobachten. Zusätzlich sind hier Tumorzellen von normalen, gesunden Zellen umgeben, was einer spontanen Erkrankung beim Menschen nahe kommt.

Um die biologische Funktion weiterer Gene *in vivo* in der  $Kras^{G12D}$ -induzierten Tumorgenese zu untersuchen, können die  $Kras^{G12D}$  Mäuse mit anderen Mäusen, die weitere konditionell exprimierte Gene tragen, gekreuzt werden.

## 1.6. Fragestellung der Arbeit

Lungenkarzinome sind sehr aggressiv und haben eine extrem schlechte Prognose. Daher ist es sehr wichtig, geeignete molekulare Ziele für die NSCLC Therapie zu finden. Ein häufiges Merkmal bei NSCLC Patienten ist die Überexpression oder Mutation des EGFR. ADAM17 ist eine essentielle Proteinase für die Aktivierung dieses Rezeptors und damit auch essentiell in der Regulation dieses Signalweges.

Zunächst sollte daher untersucht werden, welche biologische Rolle ADAM17 bei der Tumorgenese des NSCLC hat. Um diese Frage zu beantworten, sollte ADAM17 sowohl stimuliert als auch inhibiert (pharmakologisch/shRNA-Technologie) werden. Die Auswirkung auf NSCLC Zelllinien hinsichtlich ihrer Apoptose, Transformationspotential, Proliferation und Aktivierungsstatus der EGFR Signaltransduktion sollte in verschiedenen biologischen und biochemischen Assays, untersucht werden. Die Ergebnisse zeigten, dass es neben dem EGFR Signalweg einen weiteren ADAM17 induzierten Signalweg gibt, der an der Tumorgenese beteiligt ist. Dieser wurde als Notch Signalweg identifiziert.

Der Notch Signalweg spielt in der Entwicklung der Lunge eine wesentliche Rolle. Da die deregulierte Expression zunehmend mit der Pathogenese diverser Tumoren in Verbindung gebracht wird, war das weitere Ziel dieser Arbeit, die biologische Funktion der Notch1 Signaltransduktion in der Tumorgenese des NSCLC zu analysieren und das Zusammenspiel zwischen Notch1 und dem EGFR Signalweg zu untersuchen. Des Weiteren sollten auch primäre humane NSCLC Proben auf Proteinexpression von Notch1, EGFR und ADAM17 untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte ein murines  $Kras^{G12D}$ - induziertes Lungentumormodell etabliert werden, um die biologischen Eigenschaften des Notch1 und Notch2 Rezeptors im Hinblick auf ihre Rolle in der Tumorgenese von Adenokarzinomen *in vivo* zu untersuchen. Dafür sollte die Expression von onkogenem  $Kras$  an die parallele Deletion von Notch1 oder Notch2 gekoppelt werden. Durch die Expression der Cre-Rekombinase mittels intranasaler Applikation von Adenoviren (AdCre), sollten Bronchialepithelien mit AdCre infiziert und damit genetisch verändert werden. Von besonderem Interesse sollte dabei der Vergleich der verschiedenen Phänotypen, die durch Deletion von Notch1 und Notch2 hervorgerufen werden, sein.

Insgesamt sollten neue Einsichten in die komplexe Notch Signaltransduktion *in vivo* gewonnen werden. Zusätzlich sollen die Ergebnisse aus dieser Hinweise liefern, ob Notch Rezeptoren geeignete therapeutische Ziele für die Behandlung von NSCLC Patienten darstellen.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien und biogene Substanzen

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Fermentas, St. Leon-Rot
Acrylamid/Bisacrylamid Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Fluka, Taufkirchen
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aqua ad injectabilia, steril	Braun, Melsungen
$\beta$ -Mercaptoethanol, 50mM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Bacto Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA, Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics, Penzberg
$\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol (THC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Difco Agar Noble	BD Biosciences, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Heidelberg
dNTP-Mix, 10 mM	Fermentas, St. Leon-Rot
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Millipore, Schwalbach/Ts
Eosin	Waldeck, Münster
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel-de Haën, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe

Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Taufkirchen
Formaldehyd, 37%-ig	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerol	Fluka, Taufkirchen
Glycerol-2-phosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Merck, Darmstadt
Hämalaun (Mayers)	eBioscience, San Diego, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Fluka, Taufkirchen
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Fluka, Taufkirchen
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Fluka, Taufkirchen
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyrophosphat	Fluka, Taufkirchen
Pertex Einbettlösung	Medite, Burgdorf
<i>Phosphat buffered saline</i> (PBS), 10-fach, fest	Biochrom AG, Berlin
PMSF	Roche, Penzberg
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNAlater Stabilization Reagent	Qiagen, Hilden
RNAse A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SuperSignal Substrate (pico, dura, femto)	Thermo Scientific, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka, Taufkirchen
Tissue Tek	Sakura Finetek, Torrance, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka, Taufkirchen
Trockenmilchpulver	Fluka, Taufkirchen
Tween 20	Fluka, Taufkirchen
Xylol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylolcyanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 2.1.2. Medien und Supplemente für die Zellkultur

DMEM, Zellkulturmedium	PAA, Pasching, Österreich
Diphtherietoxin	Calbiochem, MerckAG, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS) Gold	PAA, Pasching, Österreich
G418 (Neomycin-Analogen)	Calbiochem, MerckAG, Darmstadt
D+ Glucose wasserfrei	Merck, Darmstadt
L-Glutamin, 100-fach	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
HEPES 1mM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Hygromycin B, 50mg/ml in PBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IMDM Pulver, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
KSFM, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lipofectamin 2000, Transfektionsreagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat-Lösung 7,5%	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natriumpyruvat-Lösung 100mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Opti-Mem Serum-reduziertes Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin Lösung	PAA, Pasching, Österreich
Phosphate buffered saline (PBS), 10-fach, steril	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Puromycin Dihydrochlorid	Calbiochem, MerckAG, Darmstadt
RPMI 1640 (high Glucose, Glutamin)	PAA, Pasching, Österreich
Trypanblau, 0,4% Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung, 10-fach	PAA, Pasching, Österreich

### 2.1.3. Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
HEK293T	Humane embryonale Nierenkarzinomzellen	ATCC, Middlesex, UK
Phoenix A	retrovirale amphotrophe Verpackungs-Zelllinie (Helfervirus-frei): HEK293T Zellen, stabil transfiziert mit Moloney GagPol-IRES-Lyt2 Konstrukt unter der transkriptionellen Kontrolle des RSV-Promotors (Selektion mit Hygromycin B) und Moloney <i>amphotropic envelope Gen</i> unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV-Promotors (Selektion mit Diphtherietoxin)	G. P. Nolan, Stanford, USA



Erk1/2	Cell Signaling, Beverly, USA
pErk1/2 (Thr-202/Tyr-204)	Cell Signaling, Beverly, USA
flag	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HES1	Abcam, Cambridge, USA
Jagged1 (C-20)	Santa Cruz, USA
Notch1 <sup>IC</sup> (cleaved Notch1, Val-1744)	Cell Signaling, Beverly, USA
Notch1 <sup>TM</sup> (mN1A)	Santa Cruz, USA
Notch2 (c651.6DbHN)	Developmental Studies Hybridoma Bank [DSHB] Iowa City, USA)
Notch3 (M-134)	Santa Cruz, USA
p53 (CM5)	Novocastra (Leica Microsystems), Wetzlar
phospho-Tyrosin Py20	BD Pharmingen, Heidelberg
phospho-Tyrosin 4G10	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA

Als Sekundär-Antikörper werden die Meerrettich Peroxidase-gekoppelten Antikörper von der Firma Amersham Biosciences, Freiburg verwendet.

### Antikörper für den immunhistochemischen Nachweis von Proteinen

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
ADAM17 (807-823)	1:40	Chemicon, Temecula, USA
EGFR (E30)	1:20	DAKO Glostrup Dänemark
pEGFR	1:100	Invitrogen Karlsruhe
HES1	1:100	T.Sudo, Torey Industries Inc., Tokyo, Japan
Ki67 (Tec-3)	1:50	DAKO Glostrup Dänemark
Notch1 (C20)	1:80	Santa Cruz, USA

### **2.1.6. Enzyme**

#### DNA Polymerasen

Dream Taq DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot

#### andere Enzyme

Proteinase K	Qiagen, Hilden
--------------	----------------

### 2.1.7. Membranen

PVDF Membran (Immobilon P)

Millipore, Schwalbach/Ts

### 2.1.8. Bakterienstämme

*E. Coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>

Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.9. Vektoren und DNA Konstrukte

#### Vektoren

Vektor	Beschreibung	Herkunft
pLXSN	Expressionsleervektor für retroviralen Gentransfer mit Neomycin Resistenz	Clontech, Palo Alto, USA
pLXSN-Notch1 <sup>IC</sup>	Expressionsvektor für Überexpression des aktiven Notch1 Fragments	N. Schatz
pSR	Expressionsleervektor für retroviralen Gentransfer mit Puromycin Resistenz	Addgene, Cambridge, USA
pSR-shADAM17	Expressionsvektor mit shRNA gegen ADAM17	N. Schatz
pSR-shKon	Expressionsvektor mit shRNA gegen das Luciferase Gen	N. Schatz
pLKO.1	Expressionsleervektor für lentiviralen Gentransfer mit Puromycin Resistenz	Addgene, Cambridge, USA
pLKO.1-shNotch1	Expressionsvektor mit shRNA gegen Notch1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

#### DNA Konstrukte in 5'→3'

shADAM17: GAT CCC CGT GCC AGG AGG CGA TTA ATT TCA AGA GAA TTA  
ATC GCC TCC TGG CAC TTT TTA

shNotch1: CCG GCT TTG TTT CAG GTT CAG TAT TCT CGA GAA TAC TGA ACC  
TGA AAC AAA GTT TTT

### 2.1.10. Inhibitoren

Inhibitor	Beschreibung	Herkunft
BMS-561,392	2R-2-((3R)-3-amino-3(4-[2-methyl-4-quinolinyl)-methoxy]-phenyl)-2-oxopyrrolidinyl)-N-hydroxy-4-methylpentanamide spezifischer Inhibitor gegen ADAM17	Bristol-Myers-Sqibb, New York City, USA
Batimastat BB-94	[4-(N-hydroxyamino)-2R-isobutyl-3S-(thiopen-2-ylthiomethyl)-succinyl]-L-phenylalanine-N-methylamide, Breitband-Metalloproteinase Inhibitor	K.Maskos, MPI für Biochemie, Martinsried
Cetuximab	mAK gegen Ligandenbindende Domäne des EGFR	Merck, Darmstadt
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester $\gamma$ -Sekretase Inhibitor	MerckAG, Darmstadt
MG132	Cabobenzoxy-L-leucyl-L-lucyl-L-leucinal Proteasom Inhibitor	Calbiochem, MerckAG, Darmstadt

### 2.1.11. Oligonukleotide in 5'→3'

#### Oligonukleotide für die RT-PCR

EGFR<sup>158</sup>: for: CGC AAG TGT AAG AAG TC GAA  
rev: CGT AGC ATT TAT GGA GAG TGA GTC

HES1: for: TGA TTT TGG ATG CTC TGA AGA AAG ATA  
rev: GCT GCA GGT TCC GGA GGT

#### Oligonukleotide zur Genotypisierung der Mäuse

KrasG12D: for: AGC TAG CCA CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC A  
rev: CCT TTA CAA GCG CAC GCA GAC TGT AGA

Notch1: for: CTG ACT TAG TAG GGG GAA AAC  
rev: AGT GGT CCA GGG TGT GAG TGT

Notch2: for: GTG AGA TGT GAC ACT TCT GAG C  
rev: GAG AAG CAG AGA TGA GCA GAT G

lacZ: for: GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC  
rev: AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT

Die verwendeten Oligonukleotide werden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg synthetisiert. Oligonukleotide für das Kontrollgen GAPDH aus Giulietti et al.<sup>159</sup>

### 2.1.12. Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler 100bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

### 2.1.13. Molekularbiologische Kitsysteme

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Direct PCR-Tail Kit	Peqlab, Erlangen
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Peroxidase Substrate Kit (DAB)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG	Invitrogen, Karlsruhe
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder homogenizer Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
Streptavidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

### 2.1.14. Mausstämme

C57bl/6	Harlan Winkelmann GmbH, Borchon
Kras <sup>G12D wt/f</sup>	J. Siveke, Klinikum r.d.Isar, München
Notch1 <sup>ff</sup>	J. Siveke, Klinikum r.d.Isar, München
Notch2 <sup>ff</sup>	J. Siveke, Klinikum r.d.Isar, München
Rosa26 LacZ <sup>ff</sup>	J. Siveke, Klinikum r.d.Isar, München
Balb/c <sup>nu/nu</sup>	Harlan Winkelmann GmbH, Borchon

### 2.1.15. Tierexperimentelle Materialien

Einbettkassette	Carl Roth, Karlsruhe
Gießform	Carl Roth, Karlsruhe

Käfigsystem IVC	Tecniplast, Hoheneißenberg Sterican
Objektträger (Superfrost Plus)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Standarddiät Tierfutter	Altromin, Lage
Sub-Q, sterile PP Spritze, 1ml, 26G 1/	BD Biosciences, Heidelberg
Vasofix Safety Verweilkanüle	Braun, Melsungen

### 2.1.16. Geräte

ABI PRISM 7700	Applied Biosystems, Foster City, USA
Agarosegel Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Analysenwaage BP 221S	Satorius, Göttingen
CO <sub>2</sub> -Inkubator SW J 500 TV BB	Nunc, Wiesbaden
Digitalwaage LC 1200 S	Satorius, Göttingen
Dispergierwerkzeug ULTRA TURRAX	IKA-Werke, Staufen
Durchflusszytometer (EPICS XL)	Beckman-Coulter, Krefeld
Entwickler Optimax	Protec, Oberstenfeld
Heizblock 5436	Eppendorf, Hamburg
Incubator-Shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlzentrifuge J2-HS, Rotor JA-14	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifugen 5417R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
LKB Ultraspec III, Spektralphotometer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Mikroskop Axio Imager A1	Zeiss, Jena
Mikroskop V 200	Hund, Wetzlar
Mikrotom HM560	Mikrom, Walldorf
Mirax Desk Scanner	Zeiss, Jena
Multi-Gel Long Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Reichert, New York, USA
PCR-Thermocycler Primus 96	Peqlab, Erlangen
pH-Meter Φ32	Beckman, Fullerton, USA
Refrigerated Incubator-Shaker Innova	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen
Spectrophotometer (Nanodrop)	Peqlab, Erlangen
Sterile Werkbank, HeraSafe	Thermo Scientific, Karlsruhe
Stromgenerator, Powerpack P25	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Transfer Electrophoresis Unit	Hofer, San Fransisco, USA

Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge, Rotor VTI 80	Beckman, Fullerton, USA
UV Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla, USA
UV-Lampe TI 2	Biometra, Göttingen
Vortex Genie2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel

### 2.1.17. Lösungen und Puffer

Ampicillin-Stammlösung:	50 mg/ml in A.d.
DNA-Probenpuffer (6-fach):	30% Glycerin (v/v) 0,25% Bromphenolblau (w/v) 0,25% Xylolecyanol 50 mM EDTA in A.d.
Luria-Bertani (LB) Medium (flüssig):	1% Bacto-Trypton 0,5% Bacto-Hefeextrakt 1% NaCl in A.d. mit 1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt autoklaviert
LB-Medium (fest):	1,5% Bacto-Agar in LB-Medium (flüssig)
Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 130 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5% Triton X-100 20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,5) 10 mM Natriumpyrophosphat (pH 7) 1 mM Natriumorthovanadat 20 mM Natriumflourid 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.

Propidiumiodid-Lösung:	50 µg/ml PI 200 µg/ml RNaseA in PBS
Sammelgelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	0,5 M Tris (pH 6,8) 0,4 % SDS in A.d.
Soft Agar Assay Lösungen:	
2xIMDM	3,5% IMDM Pulver in A.d. 0,6% Natriumhydrogencarbonat Lösung sterilfiltriert
Mix1	88% 2xIMDM 10% FCS 2% Penicillin/Streptomycin Lösung
Mix2	70% 2xIMDM 26,6% FCS 3,4% Penicillin/Streptomycin Lösung
SDS-Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in A.d.
SDS-Probenpuffer (2-fach):	1 M Tris/HCl (pH 6,8) 200 mM DTT 4% SDS 0,2% Bromphenolblau 20% Glycin in A.d.
TAE-Puffer (10-fach):	0,4 M Tris 1,1% Essigsäure 2% 0,5 M EDTA (pH 8) in A.d.
Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in A.d. 20% Ethanol in A.d.

Trenngelpuffer für SDS-Gele (4-fach):      1,5 M Tris (pH 8,8)  
0,4% SDS in A.d.

## **2.2. Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1. Agarosegelelektrophorese**

TAE-Puffer: 0,4 M Tris, 1,1% Essigsäure, 2% 0,5 M EDTA in A.d.

DNA-Probenpuffer (6-fach): 30% Glycerin (v/v), 0,25% Bromphenolblau (w/v), 0,25% Xylolcyanol, 50 mM EDTA in A.d.

Diese Methode wird verwendet um Nukleinsäuren ihrer Größe nach zu trennen und zu identifizieren. Dabei ist Agarose das wichtigste Trägermaterial für die Elektrophorese. Durch Aufkochen in wässriger Lösung (TAE-Puffer) wird Agarose gelöst und geliert beim wiederabkühlen. Aus dem Polysaccharid bilden sich Doppelhelices, die sich in Gruppen zu relativ dicken Fäden zusammenlagern. Dadurch entstehen Agarosegele hoher Stabilität, deren Porengröße durch die Agarosekonzentration bestimmt werden kann. Für analytische Zwecke werden 1 bis 2%-ige Agarosegele verwendet. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgt durch Vergleich der Laufstrecken mit geeigneten DNA-Molekulargewichtsmarkern. Durch Zugabe DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Ethidiumbromid, wird die Visualisierung der DNA-Fragmente ermöglicht. Ethidiumbromid kann durch UV-Licht (254-366 nm) angeregt werden und emittiert Licht im orange-roten Bereich (590 nm). Zur Herstellung von Agarosegelen wird die Agarose in TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Lösung klar und schlierenfrei war. Nach Abkühlen auf 50 °C wird die Lösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und auf einem Gelträger mit Taschenschablone ausgegossen. Nach Erstarren des Gels, wird die Taschenschablone entfernt und zur Auftrennung der DNA Fragmente in eine mit TAE-Puffer gefüllte DNA-Elektrophoresekammer überführt. Die zu ladenden Proben werden mit einem Fünftel ihres Volumens mit DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese erfolgt durch Anlegen einer Spannung von 20-210 V an die DNA-Elektrophoresekammer. Beim Lauf durch das Gel interkaliert das Ethidiumbromid mit der DNA. Das Ergebnis kann durch Anregung des Ethidiumbromids visualisiert und fotografisch dokumentiert werden.

### **2.2.2. Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen und Geweben**

Die Aufreinigung von RNA aus eukaryotischen Zellen und murinen Geweben erfolgt nach Herstellerangaben des „RNeasy Plus Mini Kit“ (Qiagen). Die Elution der RNA erfolgte in EB-Puffer. Diese kann dann bei -80°C gelagert werden.

### 2.2.3. Isolierung genomischer DNA

Die Gewinnung genomischer DNA aus murinem Gewebe erfolgt nach Angaben des Herstellers mit dem „DNeasy Blood & Tissue Kit“ (Qiagen) und die Gewinnung genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen mit dem „Direct PCR-Tail Kit“ (Pqlab).

### 2.2.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgt mittels eines Spektralphotometers durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Da das Absorptionsmaximum von Proteinen in wässriger Lösung bei 280 nm liegt, kann durch zusätzliche Messung bei 280 nm außerdem die Reinheit der Nukleinsäurelösung überprüft werden. Dabei ist das Verhältnis der Absorptionswerte zwischen 260 nm und 280 nm ein Maß für die Reinheit und verringert sich mit zunehmender Verunreinigung. Bei Werten zwischen 1,7 und 2,0 handelt es sich um eine reine Nukleinsäurelösung.

### 2.2.5. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode, um einen genau definierten Teil eines DNA-Strangs *in vitro* zu vervielfältigen<sup>160</sup>. Das Prinzip der PCR beruht auf der Thermostabilität von DNA-Polymerasen und deren Fähigkeit einen DNA-Strang durch semikonservative Replikation zu verdoppeln. Zur Durchführung der Amplifikation sind außerdem zwei Oligonukleotide als *Primer* essentiell, die auf beiden Seiten der Sequenz jeweils an einen der DNA-Stränge binden können sowie einzelne Nukleosidtriphosphat-Moleküle (dNTPs). Zu Beginn jedes Amplifikationszyklus wird die doppelsträngige Matrizen-DNA (*Template*) durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Beim anschließenden Abkühlen auf die Anlagerungstemperatur können die Primer spezifisch an die Einzelstränge hybridisieren (*annealing*). Während der DNA-Synthesephase werden die DNA Stränge, unter Anwesenheit von (dNTPs) durch die Polymerase in 5'→3' Richtung ergänzt (Elongation). Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte wird die Matrize exponentiell amplifiziert. Bei der Durchführung einer PCR ist eine sorgfältige Auswahl der Annealing-Temperatur für die Anlagerung der Primer erforderlich, da es bei zu hoher Temperatur zu keiner Hybridisierung, bei zu niedriger hingegen zu einer unspezifischen Bindung kommen kann. Die Annealing-Temperatur ist im wesentlichen abhängig von der Länge und dem G/C-Gehalt des Primers. Durchgeführt wird die PCR in einem Thermozykler, dessen automatische Steuerung ein individuell programmierbares zyklisches Temperaturprogramm regelt.

### 2.2.6. Reverse Transkription zur Generierung von cDNA

Für die Umschreibung von mRNA in cDNA (reverse Transkription) bedient man sich der Eigenschaft des Enzyms Reverse Transkriptase. Dieses ist in der Lage mRNA als Matrize für die Synthese eines komplementären cDNA-Strang zu benutzen. Für die Synthese wird 2 µg RNA eingesetzt und die Synthese nach Herstellerangaben mit dem „First Strand cDNA Synthesekit“ (Fermentas) mit Oligo(dT)-Primern durchgeführt. Die 15 – 20 Basenpaare langen Oligo(dT)-Primer hybridisieren dabei an den Poly(A)-Bereich am 3'-Ende der mRNA. Damit kann sämtliche RNA, unabhängig von der Sequenz, als Matrize dienen. Die fertige cDNA wird vor dem Einsatz für die RT-PCR durch Zugabe von Wasser 10-fach verdünnt.

### 2.2.7. Real time PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR ermöglicht die Amplifikation von cDNA mit zusätzlicher Quantifizierung. Die Amplifikation der DNA beruht dabei auf den Prinzipien der herkömmlich PCR (Kapitel 2.2.5.) Für die Quantifizierung wird dem Reaktionsansatz ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) zugefügt, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert und nach jedem Elongationsschritt bestimmt wird. Die Fluoreszenz steigt somit proportional mit dem Anstieg des PCR-Produkts. Die RT-PCR wird nach Herstellerangaben des „Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG“ Kit (Invitrogen) durchgeführt und auf einem ABI Prism 7700 analysiert. Zur Quantifizierung werden die erhaltenen Daten auf das Kontrollgen GAPDH normiert. Die Berechnung der absoluten Werte erfolgt anhand der Gleichung  $2^{\Delta\text{CtWert GAPDH} - \Delta\text{CtWert Zielgen}}$ . Auf diese Weise kann der cDNA-Gehalt eines Gens, in Bezug auf GAPDH, bei verschiedenen Proben direkt miteinander verglichen werden.

## 2.3. Arbeiten mit Bakterien

### 2.3.1. Kultivierung von Bakterien

LB-Medium: 1% Bacto-Trypton; 1% NaCl; 0,5% Bacto-Hefeextrakt in A.d.; autoklaviert; pH 7,0

LB-Agarplatten: 1,5% Bactoagar in LB-Medium; autoklaviert

Antibiotika: 50 mg/m Ampicillin

Das Luria-Bertani (LB)-Medium wird entsprechend der Vorschrift angesetzt und autoklaviert. Flüssigkulturen werden bei 37°C mit 250 Upm geschüttelt. Für Kulturplatten werden dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (m/V) Bactoagar zugesetzt und ebenfalls bei 37°C kultiviert. Zur Selektion von Bakterien, die ein resistenz-vermittelndes Plasmid tragen, werden Antibiotika zugegeben.

### 2.3.2. Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Mit Transformation bezeichnet man die Übertragung fremder DNA (z.B. Vektoren) auf Empfänger wie Bakterien oder Hefezellen. Während einige Bakterien eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von Fremd-DNA besitzen, gibt es auch Möglichkeiten die Transformationseffizienz bei nicht kompetenten Bakterien hervorzurufen. Diese werden dafür mit hohen Konzentrationen zweiwertiger Metallkationen (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ) behandelt (Chemische Kompetenz). Mit einem Hitzeschock oder durch Elektroporation kann die Aufnahme der DNA zusätzlich gesteigert werden.

Für die Transformation werden 50  $\mu\text{l}$  chemisch kompetent Bakterien (*E.coli DH5 $\alpha$* ) auf Eis aufgetaut und mit 1  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA versetzt. Während der 20-30 minütigen Inkubation auf Eis lagert sich die DNA an die Bakterienzellwände an. Es folgt ein Hitzeschock von 30 sek. bei 42°C, durch den die DNA in die Zellen aufgenommen wird. Nach weiteren 2 min Inkubation auf Eis, wird der komplette Transformationsansatz auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten werden anschließend bei 37°C für 12-16 h inkubiert.

### 2.3.3. Isolierung von Plasmid DNA (Mini und Maxi Präparation)

Die Aufreinigung von Plasmid DNA aus *E.coli* Kulturen erfolgt je nach gewünschter DNA-Menge entweder mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (<20  $\mu\text{g}$  DNA) oder dem „QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben.

Für die Minipräparation wird eine Einzelkolonie von der LB-Agarplatte aus dem Transformationsansatz (Kapitel 2.3.2.) in 5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Für die Maxipräparation impft man eine Einzelkolonie in 200 ml antibiotikahaltiges LB-Medium an. Am darauf folgenden Tag, werden die Bakterienzellen für 10 min bei 4°C und 4000 Upm zentrifugiert und die Plasmid DNA aufgereinigt. Die hier verwendeten Methoden, basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und der selektiven Adsorption der DNA auf eine Silica-Gel Membran unter Hochsalzbedingungen. Nach Reinigung der DNA von interferierenden Substanzen wie zellulären Proteinen, RNA oder Metaboliten erfolgt die Elution unter Niedrigsalzbedingungen. Aufgereinigte Plasmid DNA wird bei -20°C gelagert.

## **2.4. Arbeiten mit eukaryotischen Zellen**

### **2.4.1. Kultivierung von Zelllinien**

DMEM-Kulturmedium (Phoenix A, HEK293T): DMEM; 10% FCS

RPMI-Kulturmedium (alle NCI Zelllinien): RPMI 1640, 1 mM Natriumpyruvat-Lösung, 1500 mg/L Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 10 mM HEPES, 25 mM Glucose, 2% Penicillin/Streptomycin-Lösung, 10% FCS

Alle Zelllinien werden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% in einem Brutschrank kultiviert.

Die adhärente Zelllinien werden in Ihrem spezifischem Kulturmedium in liegenden Zellkulturflaschen kultiviert. Bei 90%-iger Konfluenz werden die Zellen mittels einer 1%-igen Trypsin/EDTA-Lösung (PhoenixA, HEK293T) bzw. 5%-igen Trypsin/EDTA-Lösung (Lungenkarzinomzelllinien) durch enzymatischen Abbau von Matrixproteinen vom Boden gelöst. Zunächst wäscht man die Zellen mit PBS und bedeckt sie anschließend mit dem Trypsin. Nach Inkubation bei 37°C lösen sich die Zellen ab. Die gelösten Zellen werden mit Medium abgespült und 3 min bei 1500 Upm zentrifugiert. Danach werden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und in eine neue Kulturflasche überführt. Die Lungenkarzinomzellen werden auf diese Weise alle 2-3 Tage in einem Verhältnis von 1:3 passagiert. Die Phoenix und HEK293T Zellen reagieren sehr empfindlich auf eine zu hohe Zelldichte und müssen daher jeden Tag um die Hälfte verdünnt werden.

### **2.4.2. Kryokonservierung von Zellen**

Einfriermedium (2-fach): 20% DMSO; 80% FCS

Zellen können zur dauerhaften Lagerung tiefgefroren werden. Bei Bedarf werden die Dauerkulturen wieder aufgetaut und weiterkultiviert. Dazu werden  $1-5 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Medium in einem Kryoröhrchen mit dem gleichen Volumen Einfriermedium vermischt und sofort bei – 80°C eingefroren. Für längere Lagerung können die Zellen nach 12 h in flüssigen Stickstoff überführt werden.

### **2.4.3. Auftauen von Zellen**

Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem flüssigen Stickstoff werden die Zellen sofort im Wasserbad (37°C) aufgetaut und vorsichtig in Kulturmedium aufgenommen. Zur Entfernung des toxischen DMSO werden die Zellen zentrifugiert. Für die Kultivierung werden

die Zellen anschließend in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

#### **2.4.4. Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl und zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen werden diese mit Trypanblau angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopiert. Viable Zellen sind in der Lage, den Farbstoff auszuschließen und erscheinen im mikroskopischen Bild hell, während tote Zellen blau gefärbt werden. Gleiche Volumina einer Zellsuspension und einer 0.5%-igen Trypanblaulösung werden dafür vermischt auf die Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop gezählt. Die Ermittlung der Zellkonzentration (Zellzahl pro ml Zellsuspension) wird unter Ausschluss der toten Zellen, durch Multiplikation der durchschnittlichen Zellzahl pro Großquadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor  $10^4$  ermittelt.

#### **2.4.5. Transfektionsmethoden**

Mit Transfektion bezeichnet man das Einbringen von genetischem Material in eukaryotische Zellen. Dafür stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung zu denen u.a. die liposomale Transfektion (Lipofektion) und die virale Transduktion gehört. Die Lipofektion eignet sich weitestgehend für adhärente Zellen und wird verwendet um genetisches Material in die Virus-Produktionszelllinien PhoenixA und HEK293T einzubringen. Für die Einschleusung von DNA in die Lungenkarzinomzellen wird die virale Transfektion über Lentiviren (shNotch1) und/oder Retroviren (shADAM17, Notch1<sup>IC</sup>) verwendet.

##### **2.4.5.1. Lipofektion**

Lipofectamin 2000

Opti-MEM, Serum reduziertes Medium

Bei der Lipofektion werden kationische Lipidvesikel verwendet. Diese binden die negativ geladene DNA. Die dadurch entstehenden Komplexe verschmelzen mit der lipophilen Zellmembran oder werden durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen. Lipofectamine 2000 wird für die Transfektion der Virus-Produktions-Zelllinien PhoenixA und HEK293T gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Um Virus zu produzieren, werden  $2 \times 10^6$  Zellen auf einer 6 cm Zellkulturschale ausplattiert. Nach 24 h werden 0,5 ml Opti-Mem mit 20  $\mu$ l Lipofectamin 2000 versetzt und für 5 min inkubiert. Parallel pipettiert man 0,5 ml Opti-Mem mit 10  $\mu$ g retroviraler Vektor DNA und

inkubiert 5 min. Für den lentiviralen Gentransfer pipettiert man zu 0,5 ml Opti-Mem, 4 µg lentiviraler Vektor DNA, 4 µg Verpackungsplasmid psPAX2 und 4 µg Hüllproteinplasmid pMD2.G und inkubiert ebenfalls für 5 min. Anschließend werden die Ansätze mit der DNA mit dem Lipofectamin 2000 Ansatz vermischt und für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wird der gesamte Transfektionsansatz auf die Zellkulturplatte mit den Zellen getropft.

### **2.4.5.2. Gewinnung von viralem Überstand und virale Transduktion**

Als virale Transduktion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in Zellen mit Hilfe von Viren. Häufig werden dafür Retroviren oder Lentiviren, welche eine Gattung der Retroviren sind, verwendet. Diese Viren sind in der Lage, ihr einzelsträngiges RNA-Genom nach Infektion einer Zielzelle in komplementäre doppelsträngige DNA umzuschreiben und diese in das Genom der Zielzelle zu integrieren. Im Gegensatz zu Retroviren, welche nur sich teilende Zellen infizieren können, infizieren Lentiviren auch ruhende Zellen und haben daher ein breiteres Spektrum an Zielzellen. Aus Sicherheitsgründen besteht das virale Gentransfersystem aus mindestens 2 Komponenten: dem viralen Vektor, in den die gewünschte DNA kloniert wurde und der Verpackungszelllinie.

Der virale Vektor selbst ist nicht replikationskompetent, so dass Zielzellen nur transduziert werden können, wenn die Verpackungszelllinie die fehlenden Proteine zur Verfügung stellt. Die PhoenixA Zellen stellen die retroviralen Proteine (pol, gag, env) für die Transfektion der retroviralen Konstrukte pSR-shADAM17 und pLXSN-Notch1<sup>IC</sup> selbst her. Für den *Knockdown* von Notch1 wird ein lentiviraler Vektor verwendet (pLKO.1-shN1). Hier verwendet man als Verpackungszelllinie die HEK293T Zellen. Die zur Transduktion benötigten Proteine stellen nicht die HEK293T Zellen her, sondern wurden auf 2 weitere Plasmide (psPAX2 und pMD2.G) verteilt und mit dem shNotch1 kodierenden Vektor in die HEK293T Zellen ko-transfiziert (Kapitel 2.4.5.1.)

Nach Transfektion der Verpackungszelllinie mit dem viralen Vektor werden diese in Virionen verpackt und anschließend in das Medium abgegeben. Viraler Überstand wird nach 24 h, 36 h und 48 h nach transienter Transfektion der Virus-Produktions-Zelllinien abgenommen, filtriert (0,45 µm) und in Anwesenheit von Polybren (4 µg/mL) auf die Zielzellen gegeben. Die transduzierten Zellen konnten durch Inkubation mit einem geeigneten Antibiotikum selektioniert werden.

## 2.5. Proteinbiochemische Methoden

### 2.5.1. Herstellung von Zelllysaten

Lysis-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 130 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,5; 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7; 1 mM Natriumortho-vanadat; 20 mM NaF; 1 mM Glycerol-2-Phosphat; 1 Complete Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d

SDS-Probenpuffer (2-fach): 1 M Tris/HCl (pH) 6,8; 200 mM DTT; 4 % SDS; 0,2 % Bromphenolblau; 20 % Glycin in A.d.

Nach Zentrifugation der zu lysierenden Zellen, nimmt man das Kulturmedium vollständig ab und resuspendiert das Zellsediment in frisch hergestelltem kaltem Lysispuffer. Es erfolgt eine Inkubation der Suspension für 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (14000 Upm, 20 min, 4°C) abgetrennt und der proteinhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die Proteine zu analysieren, wird der Überstand mit SDS-Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung der Proteine 10 min bei 95°C inkubiert. Die Proteine können nun durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (Kapitel 2.5.4.) und im Western Blot detektiert werden.

### 2.5.2. Herstellung von Lysaten aus murinem Gewebe

Um Lysate aus murinem Gewebe herzustellen, wird dieses gewogen und mit einem entsprechenden Volumen an Lysis Puffer (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.5.1.) versetzt (100 µl pro 10 mg Gewebe). Durch Verwendung des ULTRA TURRAX Diepergiergeräts wird aus der Probe eine homogene Lösung gebildet. Das weitere Verfahren ist identisch zu der Herstellung von Zelllysaten (Kapitel 2.5.1.). Es ist notwendig vor der Elektrophorese noch die Proteinkonzentration (Kapitel 2.5.3.) zu bestimmen um gleichmäßige Proteinlevel zu gewährleisten.

### 2.5.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford<sup>161</sup> bindet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 an basische und aromatische Aminosäuren in saurer Lösung. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist dabei das Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte mit dem „Bio-Rad Protein Assay“ nach Angaben des Herstellers.

#### **2.5.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Trenngel: 5-15% Polyacrylamid-Lösung; 375 mM Tris/HCl (pH 8,8); 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED

Sammelgel: 5% Polyacrylamid-Lösung; 12,5 mM Tris/HCl (pH 6,8); 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED

SDS-Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS in A.d.

Unter SDS-Page versteht man die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld. Durch den Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) zu den Proben werden denaturierende Bedingungen geschaffen und sowohl intra- als auch intermolekulare Wechselwirkungen der Proteine aufgebrochen. Dadurch erhalten Proteine eine einheitliche negative Ladung und die Auftrennung im elektrischen Feld erfolgt nur aufgrund ihrer molaren Masse. Als Trägermaterial werden Polyacrylamidgele verwendet. Sie entstehen durch chemische Ko-Polymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Vernetzter (meist N,N'-Methylenbisacrylamid). Die Reaktion wird durch die Zugabe eines Katalysators beschleunigt.

Zunächst durchlaufen die Proteine das weitporige Sammelgel. Es dient zur Fokussierung des Proteingemisches. Im Anschluss daran treffen die Proteine auf das Trenngel welches eine geringere Porengröße aufweist und die Proteine der Größe nach auftrennt. Der Auftrennungsbereich des Gels kann durch Veränderung der Polyacrylamid-Konzentration (5-15 %) variiert werden. Zur Herstellung des Polyacrylamidgels wird das Trenngel entsprechend der gewünschten Auftrennung mit 5-15% Polyacrylamid-Lösung angesetzt, luftblasenfrei in die Gelvorrichtung gegossen und mit Ethanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels, wird das Ethanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Der Kamm wird nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels entfernt und das Gel in eine SDS-Elektrophoresekammer eingesetzt. Nach der Befüllung der Elektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer werden die vorbereiteten hitze-denaturierten Proteine in die Probenaschen gefüllt und durch Anlegen einer Spannung (22-150 Volt) aufgetrennt.

Ein Molekulargewichtsmarker, der aus farbstoffmarkierten Proteinen definierten Molekulargewichts besteht, wird zum Molekulargewichtvergleich auf einer Spur des Gels aufgetragen. Nach dem Lauf werden die Protein auf eine PVDF-Membran transferiert (Kapitel 2.5.5.).

### 2.5.5. Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western Blot)

Transferpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol in A.d.

Als Western Blot bezeichnet man den Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Protein-bindende Membran<sup>162</sup>. Dabei wird beim *Wet-Blot* Verfahren eine mit Methanol benetzte PVDF-Membran luftblasenfrei auf das SDS-Gel gelegt und zwischen zwei Schichten aus Zellulosefilterkarton (*Whatmann-Paper*) in eine Gitterkassette eingespannt. Diese wird in eine mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer eingesetzt. Dabei wird die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode gerichtet. Der Transfer erfolgt bei konstanter Stromstärke von 1 A unter ständiger Kühlung. Die Dauer des Transfers richtet sich nach der molaren Masse der zu transferierenden Proteine (etwa 1 min pro kDa).

### 2.5.6. Immunchemischer Nachweis von transferierten Proteinen

PBST: 0,1% Tween20 in PBS

Die Immundetektion der Proteine erfolgt entsprechend dem jeweiligen Antikörper-Datenblatt. Im Allgemeinen wird die PVDF Membran für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler in einer 5% Milchpulver enthaltenden PBST-Lösung inkubiert. Dies dient zum Absättigen unspezifischer Bindungskapazitäten der Membran. Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgt in einer geeigneten Verdünnung des Antikörpers für mindestens 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wird die Membran dreimal für je 10 min in PBST-Lösung gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Der Sekundärantikörper ist gegen den F<sub>c</sub>-Teil des Primärantikörpers gerichtet und ist gekoppelt mit einer Meerrettich-Peroxidase. Die Inkubation mit der Membran erfolgt für 30 min bei RT. Nach erneutem Waschen wird die Membran mit einer Chemolumineszenz-Substrat-Lösung inkubiert. Das Substrat wird durch die Peroxidase zu einer lumineszierenden Substanz umgesetzt. Das so erzeugte Signal kann einen Hyperfilm belichten, der das Ergebnis dokumentiert.

### 2.5.7. Entfernen gebundener Antikörper von der Membran

Um die an eine Membran gebundenen Antikörper zu entfernen, wird die Membran 10 min mit 0,2%-igen Natriumhydroxidlösung unter Schütteln inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Eine auf diese Weise behandelte Membran kann erneut geblockt und mit Antikörper inkubiert werden.

## 2.6. Biologische Untersuchungen

### 2.6.1. Soft Agar Assay

Agar: 1,3 g Agar in 100 ml H<sub>2</sub>O, sterilisiert durch aufkochen

2x IMDM: 3,5 g IMDM Pulver, 8 ml Natriumhydrogencarbonat (7,5%) ad 100 ml H<sub>2</sub>O; steril filtrieren

Mix 1: 22 ml 2x IMDM, 2,5 ml FCS, 0,5 ml Penicillin/Streptomycin Lösung

Mix 2: 21 ml 2x IMDM, 8 ml FCS, 1 ml P/S

Der Softagar Assay wird verwendet um die Tumorgenität/Transformationspotential von Zellen zu untersuchen. Während adhärenente Zellen nicht in der Lage sind ohne Kontakt mit einem geeigneten Untergrund Kolonien zu bilden, können transformierte Zellen auch "Anker-Unabhängig" in einem Gel wachsen. Durch Veränderungen des Genotyps mittels si- und shRNA Technologien oder Inhibitoren können so die Auswirkung auf das Transformationspotential untersucht werden.

In einer 6-Well Platte wird zunächst 2 ml eines 0,75%-igen Boden-Agars gegeben (1:1 Gemisch aus Agar und Mix1). Auf dem ausgehärteten Boden-Agar wird anschließend 3 ml des zellhaltigen Top-Agar (50% 1x IMDM, 30% Mix2, 20% Agar) gegossen. Dabei wird jede Kondition als Doppelansatz angesetzt. Es ist zu beachten, dass der Agar nicht heißer als 37°C sein sollte, wenn er mit den Zellen vermischt wird. Zudem ist es notwendig für jede Zelllinie auszutesten, wie viel Zellen eingesetzt werden müssen. Dies sind für H292:  $1 \times 10^6$  Zellen, H358:  $2 \times 10^4$  Zellen, H2170:  $2 \times 10^4$  Zellen, H1650:  $1 \times 10^4$  Zellen, H1975:  $3 \times 10^4$  Zellen, und H520:  $1 \times 10^4$  Zellen.

Nach einem Tag gibt man 1 ml serum-haltiges Medium zu den Zellen, welches alle 2-3 Tage gewechselt wird. Nach einer Inkubationszeit von 3-4 Wochen bei 37°C kann der Softagar ausgezählt werden. Dazu werden die Kolonien mit 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) angefärbt und unter dem Lichtmikroskop gezählt und fotografiert.

### 2.6.2. Nachweis toter Zellen mittels Durchflusszytometrie

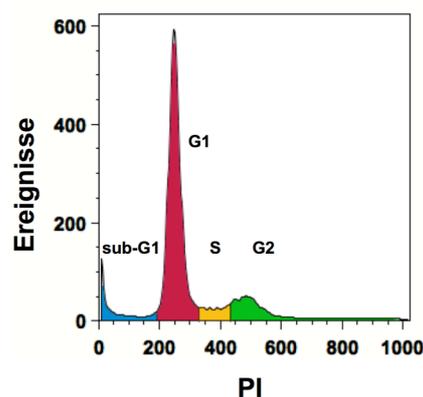
Die Durchflusszytometrie bzw. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) ermöglicht die Analyse von Partikeln in einer heterogenen Zellsuspension. Dabei werden spezielle physikalische und molekulare Eigenschaften zur Charakterisierung der Zellen verwendet. Die Zellen werden im Gerät vereinzelt und mit einem Laser bestrahlt. Die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung wird durch verschiedene Detektoren gemessen und liefert Aufschluss über Größe und Granularität der Zellen. Grundlage für durchflusszytometrische Analysen ist die Bindung eines Fluorochromgekoppelten Antikörpers, an ein Protein (Antigen) innerhalb oder außerhalb der Zelle. Ein

Laser sendet monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge aus. Diese Energie regt das Fluorochrom an und versetzt es auf ein höheres Energieniveau. Unter Abgabe von Energie fällt es auf sein Ursprungsniveau zurück. Das dabei emittierte Licht besitzt eine spezifische Wellenlänge und wird von einem Photodetektor registriert. Die Emission verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörper pro Zelle und erlaubt somit eine Aussage zur Expression des Antigens. Ein weiterer Einsatz der Durchflusszytometrie ist die Bestimmung der Zellzyklusverteilung von Zellen durch Messung des DNA-Gehalts mittels PI-Färbung. Für die Auswertung der Rohdaten wird die FLOWJO 6.3.1 Software (Tree Star Inc., Ashland, USA) verwendet.

### 2.6.2.1. PI-Färbung

Propidiumiodid-Lösung: 50 µg/ml PI in PBS + RNase A (200 µg/ml)

Um festzustellen, wie viele Zellen durch die Behandlung mit einem Inhibitor in Apoptose gehen, bedient man sich des Fluorochroms Propidiumiodid (PI). Dieser inkaliert mit den Nukleinsäuren und die Fluoreszenzintensität des PI ist ungefähr proportional zur Anzahl der Basenpaare. Somit lässt sich der DNA-Gehalt einer Zelle bestimmen. Da im Verlauf der Apoptose internukleosomale DNA-Fragmentierung stattfindet und die Zelle diese nach Permeabilisierung der Zellmembran durch Diffusion verliert, lagern apoptotische Zellen weniger Farbstoff ein als nicht-apoptotische Zellen in der G1-Phase. Man spricht deshalb von sub-G1-Zellen. Abb. 2.1. zeigt einen repräsentativen Kurvenverlauf und die verschiedenen Phasen des Zellzyklus.



**Abb. 2.1. Schematische Darstellung der Phasen des Zellzyklus durch PI Färbung**

PI interkaliert in die DNA wodurch sich der DNA-Gehalt einer Zelle bestimmen lässt. Dabei ist die Fluoreszenzintensität ungefähr proportional zur Anzahl der Basenpaare. Die sub-G1 Zellen (blau) haben durch DNA-Fragmentierung einen geringen DNA Gehalt, Zellen der G1 Phase (rot) haben einen einfachen Chromosomensatz ( $1n$ ), in der S-Phase (gelb) verdoppelt sich der Chromosomensatz und die Zellen befinden sich zwischen  $1n$  und  $2n$  und in der G2 Phase (grün) haben die Zellen einen doppelten Chromosomensatz ( $2n$ ).

Für die Experimente werden  $2 \times 10^6$  Zellen auf 10 cm Platten ausplattiert. Sobald die Zellen adhären sind, wird eine 0 h Kontrolle genommen. Die anderen Platten werden 2-mal mit PBS gewaschen und in 5 ml Medium mit 0,5% FCS, sowie der jeweilige untersuchte Inhibitor oder Stimulator, bei 37°C kultiviert. Nach 72 h werden die Zellen geerntet und 3 min bei 15000 Upm abzentrifugiert. Da PI nur durch permeabilisierte Zellmembranen dringen kann, werden die Zellen durch Resuspendierung mit eiskaltem 70%igen Ethanol fixiert und bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend werden die Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und 5 min bei 15000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 300 µL PI-Lösung resuspendiert und 30 min bei 37°C im dunkeln inkubiert. Da PI auch in doppelsträngige RNA interkaliert, muss bei der DNA Analyse von Zellen mit PI die RNA verdaut werden um ein optimales DNA-Profil zu erhalten. Dazu fügt man der PI-Lösung noch RNase A hinzu. Die so behandelten Proben werden dann im FACS analysiert.

### **2.6.3. Proliferationsassay**

Mit dem Proliferationsassay ist es möglich die Anzahl der Zellen zu ermitteln, die in der Anwesenheit bestimmter Reagenzien proliferieren. Diese Agenzien können dabei sowohl stimulierend als auch inhibierend auf die Proliferation wirken. Dafür werden  $1 \times 10^5$  Zellen in 6-well Platten ausplattiert und nach dem sie adhären waren mit Inhibitor oder Stimulator in Medium mit 0,5% FCS kultiviert. Für jeden Messzeitpunkt wird eine Platte angesetzt. Zum Analysezeitpunkt wird das Kulturmedium mit PBS abgewaschen und die Zellen mit Trypsin von der Kulturplatte abgelöst und anschließend mit Trypan Blau angefärbt. Lebende Zellen werden durch ein Lichtmikroskop gezählt (siehe Kapitel 2.4.4.). Alle Experimente werden als Duplikate angesetzt.

## **2.7. Tiermodell/ Grundlegende tierexperimentelle Techniken**

### **2.7.1. Haltung und Zucht der Mäuse**

Die Haltung der Tiere erfolgt in speziellen Käfigen in ausgewiesenen Tierhaltungsräumen mit personenlimitierter Zutrittskontrolle, Klimatisierung und Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h. Sie erhalten autoklaviertes Mäusefutter und autoklaviertes Trinkwasser *ad libitum* und werden von ausgebildeten Versuchstierpflegern gepflegt. Das Hygienemanagement erfolgt gemäß den Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA).

Zur Verpaarung werden Männchen und 1-2 Weibchen ab einem Alter von 6-8 Wochen zusammengesetzt. Bei dem Nachwuchs kann nach ca. 3 Wochen unter Narkose ein Stück

Schwanz abgeschnitten werden, aus dem man DNA für die Genotypisierung gewinnt (siehe Kapitel 2.2.3.). Gleichzeitig werden die Jungtiere durch Ohrlochung markiert. Nach 4 Wochen werden die Jungtiere von ihren Eltern und dem Geschlecht nach getrennt.

### 2.7.2. Genotypisierung

Genomische DNA aus der Schwanzspitze der Mäuse wird mit dem „Direct PCR-Tail Kit“ isoliert und der Genotyp der Mäuse mittels PCR kontrolliert. In der PCR Reaktion werden spezifische Primer für jedes untersuchte Allel eingesetzt (Kapitel 2.1.11.) und die geflochten und WT-Allele aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe voneinander unterschieden. Dafür werden die PCR Produkte mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.2.1.) aufgetrennt.

Für die Experimente werden nur Mäuse verwendet, die *Kras* heterozygot sind, mit einem WT Allel und einem geflochten *Kras*<sup>G12D</sup> Allel und *Notch1* und *Notch2* Mäuse, bei denen *Notch* homozygot geflocht ist.

Gen	WT Allel	Geflohtes Allel
<i>Kras</i>	keine Bande	550 bp
<i>Notch1</i>	250 bp	300 bp
<i>Notch2</i>	300 bp	350 bp
<i>LacZ</i>	Keine Bande	350 bp

### 2.7.3. Tumorinduktion

Narkosemittel: Medetomin [0,5 mg/kg] + Midazolam [5,0 mg/kg] + Fentanyl [0,05 mg/kg]

Antidot: Atipamezol [2,5 mg/kg] + Flumazenil [0,5 mg/kg] + Naloxon [1,2 mg/kg]

Für die Cre spezifische Deletion von Proteinen, wird ein Cre-Rekombinase exprimierender, adenoviraler Vektor verwendet (AdCre). Adenoviren, welche diesen Vektor tragen, werden den Mäusen mittels Pipette nasal appliziert. Dadurch ist eine Infektion des Bronchialepithels gewährleistet. Ausschließlich in diesen Zellen wird Cre exprimiert.

Durch Titration der Viren, wird die Anzahl der infektiösen Partikel (*plaque forming units* - PFU) ermittelt. Titration und Herstellung des AdCre wurden von der Kooperationspartnerin Dr. Martina Anton durchgeführt. Durch die manuelle Applikation des AdCre und durch die gewählte Konzentration, ist der Start der Tumorgenese und die Anzahl der tumorinitiierenden Zellen beeinflussbar. Für die Behandlung der Mäuse mit AdCre werden diese zunächst mit einem speziellen Narkosemittel (zusammengemischt in Klinikumsapotheke), welches in den Bauchraum (*intra peritoneal* - i.p.) gespritzt wird, narkotisiert. Anschließend erfolgt die nasale Applikation des AdCre in einem Volumen von 60 µl. Sobald sich die Atmung der Maus

normalisiert hat, erfolgt die Applikation einer 2. Dosis AdCre. Soweit nicht anders angegeben, werden insgesamt pro Maus  $1 \times 10^6$  PFU AdCre appliziert. Die Maus bekommt zum Abschluss das Antidot i.p. gespritzt und bis zum Erwachen aus der Narkose beobachtet. Für die Experimente werden 6-8 Wochen alte Tiere verwendet. Genauere Beschreibung der Methode siehe auch DuPage *et al.*<sup>163</sup>

### 2.7.4. Aufbereitung von Organen

Die Mäuse werden zu einem zuvor festgesetzten Zeitpunkt oder nach Einsetzen der Krankheitssymptome durch CO<sub>2</sub> getötet. Anschließend wird der Halsbereich chirurgisch freigelegt und mit einer Spritze eine gepufferte Formaldehyd-Lösung (PFA; 4% in PBS) in die Trachea eingespritzt. Dadurch wird die Lunge bereits vor dem Kollabieren der Lungenflügel fixiert. Nach Eröffnen von Abdomen und Thorax erfolgt die Entnahme von kleinen Stücken der Milz, Leber, Pankreas und Darm. Der Brustkorb wird entlang des Sternums und entlang der Rippenbögen geöffnet um die Lunge zu entnehmen. Je ein Teil der entnommenen Organe wird für Paraffinschnitte (Kapitel 2.8.1) über Nacht bei 4°C in Formaldehyd-Lösung fixiert oder für Gefrierschnitte (Kapitel 2.8.2) in Tissue-Tek eingebettet und bei -80°C gelagert. Von der Lunge werden zudem Teile für weitere Analysen in flüssigem Stickstoff Schockgefroren und bei -80°C gelagert oder zur späteren Isolation von RNA in 300 µl RNA*later* bei -20°C konserviert (Kapitel 2.2.2.).

### 2.7.5. Xenografts in Nacktmäusen

Nacktmäuse (Balb/c nu/nu) sind wichtige Modellorganismen denen durch spontane Deletion im *FOXP1*-Gen der Thymus fehlt. Dies bewirkt eine starke Verringerung der Anzahl der T-Zellen womit Nacktmäusen eine wichtige Komponente des Immunsystems fehlt. Spritzt man Nacktmäusen Tumorzellen gibt es keine vom Immunsystem induzierte Abstoßungsreaktion und man kann Wachstum und Inhibition von Tumorzellen *in vivo* untersuchen. Den 6-8 Wochen alten weiblichen Mäusen werden je  $2 \times 10^6$  Tumorzellen subkutan in die Flanke gespritzt. Sobald sich daraus Tumoren entwickelten, wird deren Größe alle 2 Tage gemessen und das Volumen des Tumors mit Hilfe der Formel  $V = a \times b \times c \times 0.5$  bestimmt. Für die Inhibitorexperimente mit Inhibitoren gegen EGFR und ADAM17 wird 1 mg Cetuximab alle 3 Tage i.p. verabreicht. BMS-561,392 wird 2-mal täglich oral, in einer Dosierung von 20 mg/kg mit Hilfe einer Verweilkanüle gegeben. Beim Erreichen einer Tumorgröße von ca.  $600 \text{ mm}^3$ , wird die Maus durch zervikale Dislokation getötet. Der Tumor wird chirurgisch entfernt und für spätere Analytik in flüssigem Stickstoff Schockgefroren und bei -80°C gelagert.

## **2.8. Histologische Untersuchungen**

### **2.8.1. Anfertigung von Paraffin-Gewebeschnitten**

Die über Nacht in Formaldehydlösung fixierten Gewebeproben (Kapitel 2.7.4.), werden in Einbettkassetten eingeschlossen und im Institut für Pathologie einem weiteren Einbettungsprozess unterzogen, der aus mehreren Entwässerungsschritten mit Alkohol besteht. Die Gewebeproben werden bei 60°C gelagert, bis sie in kleine wannenförmige Gießformen überführt werden. Diese Gießformen werden anschließend mit Paraffin ausgegossen und die Organe so in Paraffin eingebettet. Die Einbettkassette wird als Identifikation und als Träger auf die Gießform aufgesetzt. Nach Erkalten des Paraffins, wird der Block aus der Form genommen und das Gewebe wird mit einem Mikrotom in 4 µm breite Scheiben geschnitten. Nach dem Strecken der Schnitte im 47°C warmen Wasserbad, werden sie auf einen Superfrost Plus Objektträger gelegt und getrocknet. Die Paraffin-Gewebeschnitte werden für die Hämatoxilin-Eosin (HE) Färbung und immunhistochemische Färbungen verwendet.

### **2.8.2. Anfertigung von Gefrierschnitten**

Gefrierschnitte von Proben werden für die X-Gal Färbung angefertigt. Die in Tissue Tek eingebetteten Organe (Kapitel 2.7.4.) werden in die Haltevorrichtung des Kryotoms eingespannt und bei ca. -25°C (die Temperatur des Objektisches und der Box können je nach Konsistenz und Fettgehalt des zu schneidenden Organs leicht variieren) in 4 µm dicke Gewebescheiben geschnitten. Die Gewebescheiben werden anschließend auf einen unbeschichteten Objektträger überführt. Die Schnitte werden für 2 h an der Luft getrocknet und können bei -80°C für längere Zeit aufbewahrt werden.

### **2.8.3. Hämatoxilin-Eosin Färbung**

Die Hämatoxilin-Eosin Färbung (HE-Färbung) ist ein sehr weit verbreitetes Färbeverfahren in der Histologie. Die Färbung basiert auf den Eigenschaften der beiden Farbstoffe Hämatoxilin und Eosin. Während das Hämatoxilin alle sauren Zellbestandteile (Zellkern, Endplasmatischen Retikulum) blau färbt, färbt das Eosin die basischen Zellbestandteile (Zellplasmaproteine) rot. Dadurch ist es möglich Gewebestrukturen zu unterscheiden und einen morphologischen Überblick der Zellen zu erhalten.

Bevor die Gewebeschnitte gefärbt werden können, wird das umgebende Paraffin mittels Xylol und absteigender Alkoholreihe entfernt. Dafür werden die Objektträger nacheinander in

Bäder mit der entsprechenden Substanz eingetaucht. Begonnen wird mit 2-mal 5 min Xylol gefolgt von je 2-mal 3 min 100%-igem, 96%-igem und 70%-igem Ethanol. Die entparaffinisierten Schnitte werden zunächst 8 min in einer Hämalaun-Lösung (aufbereitetes Hämatoxilin) nach Mayer gefärbt, darauf 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und abschließend 5 min in 1,7%iger Eosinlösung (in Ethanol) gefärbt. Zum Abschluss der Färbung werden die Schnitte 25 sek in 96%-iges Ethanol getaucht, gefolgt von 25 sek Isopropanol und 1,5 min Xylol. Dann können die Schnitte mit Pertex luftdicht unter Deckgläschen eingedeckt werden.

### **2.8.4. Immunhistochemie**

Natriumzitratlösung: 10 mM Natriumzitat, 0,05% Tween 20 in A.d., pH 6,0

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Methode um die Anwesenheit und Verteilung von Proteinen in Gewebeschnitten zu untersuchen. Sie funktioniert auf dem Prinzip der Antigen-Antikörperbindung wobei der Antikörper an ein Detektionssystem gekoppelt ist und so das Vorhandensein seines spezifischen Antigens im Gewebe sichtbar machen kann. Zur Verwendung kam hierfür das Immunperoxidase System (Vectastain ABC System, Vector Laboratories), welches auf der hohen Affinität zwischen Avidin und Biotin basiert. Alle in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen werden auf Paraffin-Gewebeschnitten ausgeführt.

Zunächst werden die Gewebeschnitte zur Deparaffinierung für 2 mal 5 min in Xylol getaucht und anschließend in absteigender Alkoholreihe rehydriert. Danach werden die Schnitte in einer Natriumzitratlösung für 12 min in einer Mikrowelle gekocht. Nachdem die Schnitte 30 min im Natriumzitrattuffer abgekühlt sind, werden sie gewaschen. Es folgt ein Wasserstoffperoxidblock für 10 min in 3%  $H_2O_2$ , ein Avidinblock und ein Block mit Serum von dem Tier, in dem der Sekundärantikörper generiert wurde. Anschließend wird der Primärantikörper in einer zuvor ermittelten Konzentration über Nacht bei 4°C auf die Schnitte gegeben. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper der gegen IgGs der Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist. Parallel dazu wird ein Komplex aus Avidin und biotinylierter Peroxidase (aus Meerrettich) gebildet. Avidin besitzt 4 Bindungsstellen für Biotin, die aber aufgrund der molekularen Konfiguration nicht alle besetzt werden. Fügt man diesen Komplex zum Sekundärantikörper, so werden die freien Bindungsstellen am Avidin durch das Biotin des Sekundärantikörpers gebunden. Die Peroxidasaktivität des Komplexes wird schließlich durch das Substrat Diaminobenzidin (DAB) detektiert, das ein braunes Präzipitat auf den Schnitten bildet und so das Antigen spezifisch im Gewebe nachweist. Zum Schluss wird noch eine Gegenfärbung durchgeführt die allgemeine zelluläre Strukturen sichtbar macht. Dadurch erhält man einen Kontrast

gegenüber der primären Farbreaktion. Verwendet wird hierfür meist Hämatoxylin, welches die Zellkerne blau-lila anfärbt. Nach Dehydration der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe können sie mit Pertex unter Deckgläschen eingedeckt werden. Die genaue Durchführung ist stark vom verwendeten Antikörper abhängig und es werden daher die Vorgaben des jeweiligen Herstellers berücksichtigt.

Immunhistochemisch gefärbte Präparate werden anschließend mikroskopisch ausgewertet (Kapitel 2.8.6) und zur Dokumentation fotografiert oder eingescannt.

### 2.8.5. X-Gal Färbung

Fixierlösung: 1x PBS, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0,25% Glutaraldehyd

Färbelösung: 1x PBS, 5 mM K<sub>4</sub>(FeCN<sub>6</sub>), 5 mM K<sub>3</sub>(FeCN<sub>6</sub>), 20 mg/ml X-Gal, 0,04 mM MgCl<sub>2</sub>

Waschpuffer: 1x PBS, 0,2 mM MgCl<sub>2</sub>

Die X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) Färbung wird angewandt, um die Expression der β-Galaktosidase sichtbar zu machen. Dieses wird vom lacZ-Gen kodiert und in vielen Genexpressionstudien als Reportergen eingesetzt. Das farblose X-Gal wird durch die β-Galaktosidase hydrolysiert und in weiteren Reaktionen oxidiert und zu einem blauen unlöslichen Indigofarbstoff dimerisiert.

Für die X-Gal Färbung werden Gefrierschnitte verwendet (Kapitel 2.8.2.). Die Gefrierschnitte werden in Fixierlösung für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend 3 mal 5 min in Waschpuffer bei RT gewaschen. Die Inkubation mit der Färbelösung erfolgt über Nacht unter Lichtabschluss bei 37°C. Zum Eindecken wird eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt (je 20 Sek 70%, 96%, 100% Ethanol). Anschließend werden die Schnitte 2 mal für 5 min in Xylol getaucht und mit Pertex luftdicht unter Deckgläschen eingedeckt.

### 2.8.6. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

#### Auswertung der humanen Lungengewebebeurteilungen

Bei der lichtmikroskopischen Auswertung der immunhistochemisch behandelten Schnitte, werden diese nach der Farbintensität der spezifischen Immunreaktion nach folgendem Schema beurteilt:

0 = negativ; 1+ = schwach positiv; 2+ = mittelstark positiv; 3+ = stark positiv.

Die Färbungen wurden von den Kooperationspartnern S. Seidel und M.Kremer aus dem Pathologischen Institut (Klinikum r.d. Isar) analysiert.

### Auswertung der murinen Lungengewebebeobachtungen

Die mit Ki67 Antikörpern behandelten murinen Lungengewebebeobachtungen werden mit 20x objektiver Vergrößerung mit dem Mirax Desk Scanner eingescannt und digitalisiert. Die Tumorfläche pro Gewebeschnitt wird manuell extrahiert und mit der Definiens Architect XD Software (Definiens, München) analysiert. Mit der Definiens TissueMap Software werden anschließend Parameter definiert, mit welcher die Ki67 positiven und negativen Nuklei von der Software erkannt und quantifiziert werden können.

Kollaboration mit A. Walch, Institut für Pathologie, Helmholtzzentrum München (Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der benötigten Geräte/Software)

#### **2.8.7. Quantifizierung der Lungentumorfläche**

HE-Färbungen der murinen Lungen der einzelnen Genotypen werden mit 20x objektiver Vergrößerung mit dem Mirax Desk Scanner digitalisiert und anschließend mit der Definiens Architect XD Software (Definiens, München) bearbeitet. Die gewählten Parameter erlauben eine Unterscheidung des Lungengewebes in Tumorfläche und gesunde Lungenfläche (zusätzlich manueller Korrekturoption) und können so quantifiziert werden. Die Berechnung der Tumorfläche erfolgt in Prozent zur gesamten Lungenfläche pro Schnitt. Um eine objektive Beurteilung der Tumorfläche zu dem frühen gewählten Sektionszeitpunkt zu gewährleisten, werden mindestens 2 Schnittebenen pro Maus untersucht.

Kollaboration mit A. Walch, Institut für Pathologie, Helmholtzzentrum München (Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der benötigten Geräte/Software)

#### **2.8.8. Analyse der Tumordifferenzierung der Lungenkarzinome**

Das Bewertungsschema basiert auf den von Jackson *et al.* publizierten Kriterien<sup>164</sup>, welche das Tumorgewebe in der Lunge in 5 verschiedene Grade einteilt. Diese basieren auf morphologischen Unterschieden in der HE Färbung. Grad 1 (G1) Tumoren formen bereits solide Bereiche, die Zellkerne aber sind uniform ohne Atypien. In Grad 2 (G2) Tumoren sind die Zellkerne auch noch uniform aber können bereits leicht vergrößert mit sichtbaren Nukleoli. Grad 3 (G3) Tumoren haben pleiomorphe, vergrößerte Zellkerne mit sichtbaren Nukleoli und nukleären Verformungen. Grad 4 (G4) Tumoren haben pleiomorphe, vergrößerte Zellkerne, nukleäre Atypien, abnorme Mitosen und enthalten vielkernige

Riesenzellen. Grad 5 (G5) Tumoren zeigen alle Charakteristika wie G4 Tumoren haben aber zusätzlich noch stromale Desmoplasien.

## **2.9. Statistische Auswertung**

In den Diagrammen ist für die Ergebnisse entweder die Standardabweichung in Form von Fehlerbalken dargestellt oder die Daten wurden, wenn nicht anders angegeben, mit dem zweiseitigen Student'schen T-Test auf ihre Signifikanz überprüft. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikanter Unterschied akzeptiert.

### 3. Ergebnisse

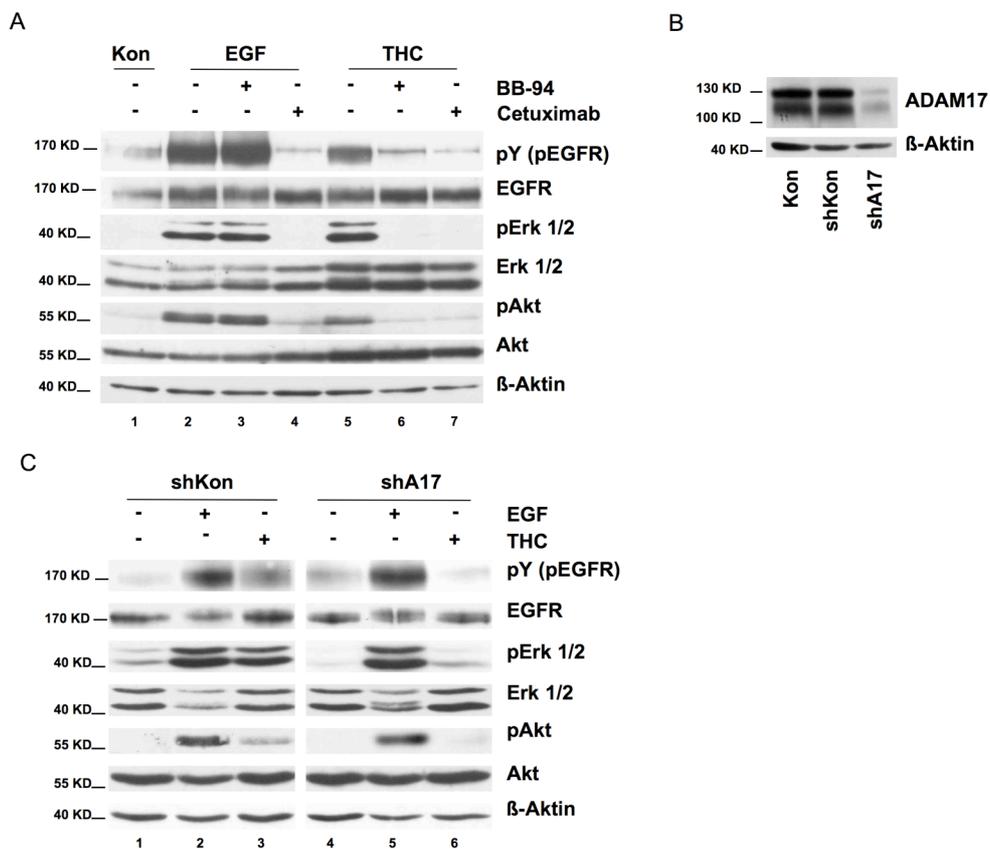
#### 3.1. Charakterisierung der ADAM17 abhängigen Signalkaskaden und Transformation im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC)

##### 3.1.1. ADAM 17 vermittelte EGFR abhängige Signaltransduktion

ADAM17 spielt eine wichtige Rolle bei vielen proteolytischen Prozessen, die mit der Krebsentstehung und Aufrechterhaltung in Verbindung gebracht werden<sup>81,111,116,117</sup>. In soliden Tumoren ist dabei besonders der EGFR Signalweg im Fokus. In diesem Zusammenhang ist ADAM17 für die Prozessierung von Liganden, welche an den EGFR binden, zuständig<sup>81,165</sup>. Um zu testen, in wie weit die ADAM17-abhängige Signaltransduktion auch in NSCLC Zellen eine Rolle spielt, wurden verschiedene Stimulationsexperimente mit H292 Zellen durchgeführt (Abb.3.1A). Dafür wurden H292 Zellen als Kontrolle mit EGF stimuliert (Spur 2). Daraufhin war eine starke Aktivierung der EGFR Signalkaskade zu beobachten. Dies zeigte sich an der Phosphorylierung des EGFR, sowie der Phosphorylierung von Erk - als Mitglied des MAPK Signalweg - und Akt - als Mitglied des PI-3K Signalweges. Eine weitere stimulatorische Substanz für die Zellen ist  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol (THC). Mit dieser wurde ebenfalls eine Aktivierung des EGFR Signalweges hervorgerufen (Spur 5). Allerdings stimuliert THC nicht wie EGF den EGFR direkt, sondern über die proteolytische Aktivität von ADAM17. Der Mechanismus ist dabei die THC-vermittelte Stimulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die wiederum ADAM17 aktivieren und somit zu einer verstärkten EGFR Ligandenprozessierung führen<sup>166</sup>. Damit kann eine Verbindung zwischen ADAM17 und dem EGFR in den NSCLC Zellen gezeigt werden.

Durch Zugabe von Inhibitoren zu den Zellen kann dagegen spezifisch die Signaltransduktion des EGFR Signalweges gehemmt werden. Blockiert man den EGFR mit Cetuximab, einem mAk, der gegen die ligandenbindende Domäne von EGFR gerichtet ist<sup>98</sup>, ist keine Aktivierung des EGFR Signalweges mehr zu sehen (Spur 4 und 7). Zusätzlich wurde ein weiterer Inhibitor, welcher gegen ADAM17 gerichtet ist. (Batimastat – BB-94; unspezifischer Breitband MMP Inhibitor<sup>167</sup>), verwendet. BB-94 inhibiert komplett THC-stimulierte Zellen, wie man anhand der fehlenden Phosphorylierung von EGFR, Erk und Akt sehen kann (Spur 6). Jedoch ist BB-94 nicht in der Lage, die direkte EGFR Stimulation durch EGF zu antagonisieren (Spur 3). Durch Inhibition von MMP's und damit verbundener Verhinderung der Ligandenprozessierung, ist BB-94 ein indirekter Inhibitor für die EGFR Signaltransduktion.

Um ADAM17 spezifischer zu inhibieren und den Einfluss auf die EGFR Signaltransduktion zu untersuchen, wurde die Proteinexpression von ADAM17 mittels shRNA (shA17) in H292 Zellen signifikant herunter reguliert (Abb. 3.1B). Durch Stimulation mit EGF ließen sich sowohl Kontrollzellen, als auch die shA17 Zellen stimulieren und der EGFR, Erk und Akt lagen phosphoryliert vor (Abb. 3.1C Spur 2 und 5). Dagegen hatte THC nur einen Effekt auf die Kontrollzellen (Spur 3). Ohne ADAM17 können keine Liganden für den EGFR bereitgestellt werden und die Stimulation mit THC ist wirkungslos (Spur 6). Durch Inhibition von ADAM17 lässt sich demnach in NSCLC Zellen auch der EGFR Signalweg inhibieren. Unklar ist jedoch bisher, welche Rolle ADAM17 auf die Biologie der Zellen in Bezug auf Transformation, Proliferation und Überleben hat.



### Abb. 3.1 ADAM17 vermittelte EGFR Signaltransduktion in H292 Zellen

A:  $2 \times 10^6$  H292 Zellen wurden über Nacht in 0,5% Serum kultiviert und vor der Lyse der Zellen zunächst für 1 h mit BB-94 (10  $\mu$ M) beziehungsweise Cetuximab (30  $\mu$ g/ml) und anschließend für 10 min mit EGF (5 ng/ml) oder THC (1  $\mu$ M) stimuliert. Die Abb. zeigt die Expression der Proteine im Western-Blot nach gelelektrophoretischer Separation. Mit phospho-Tyrosin (pY) wurde der phosphorylierte, aktivierte EGFR nachgewiesen und mit den phosphospezifischen Antikörpern gegen Erk1/2 und Akt (pErk1/2 und pAkt) wurden aktiviertes Erk1/2 und Akt nachgewiesen. Mit Antikörpern gegen Erk1/2 und Akt wurde die Gesamtmenge dieser Proteine nachgewiesen. Die Kontrolle der geladenen Gesamtproteinmenge erfolgte mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin.

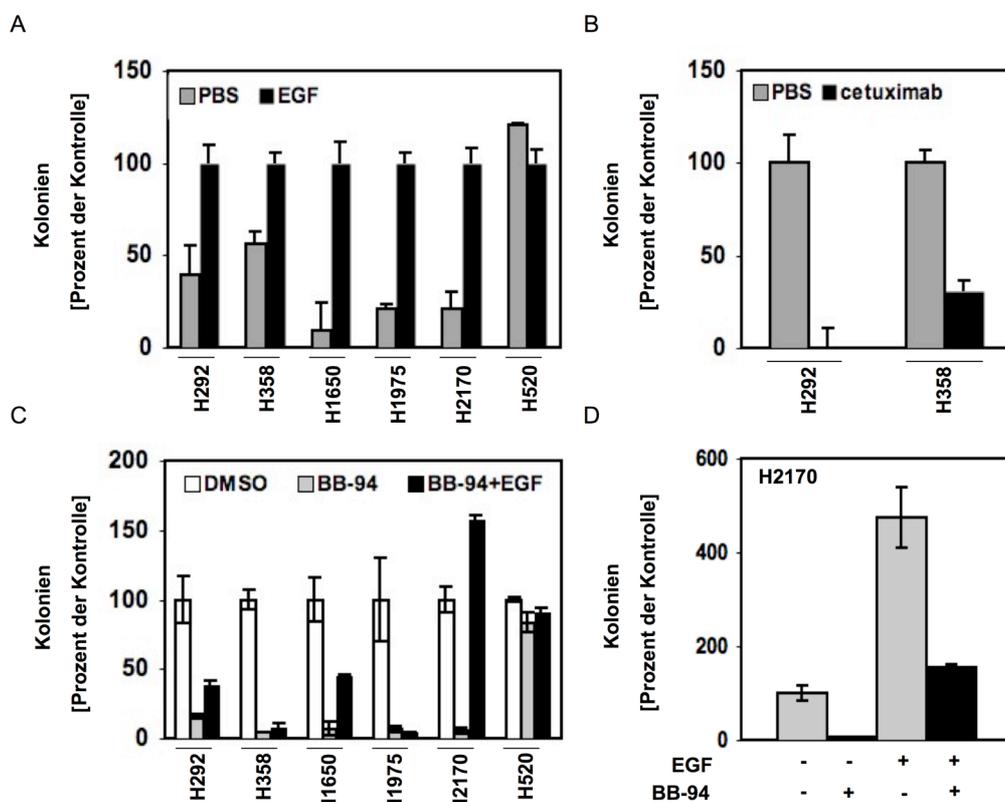
B: Darstellung des ADAM17 *Knockdowns* mittels shRNA (shA17) gegenüber Zellen mit Leervektor (Kon) beziehungsweise Kontrollvektor (shKon) in einem Western Blot.

C:  $2 \times 10^6$  H292 Zellen  $\pm$  ADAM17 *Knockdown* wurden wie unter A beschrieben behandelt und analysiert.

### 3.1.1.1. Einfluss von ADAM17 Expression auf die Transformation

Die Transformation von Zellen wurde in Softagar Assays getestet. Nur transformierte Zellen sind dabei in der Lage, im Softagar Kolonien zu bilden. Wie man in Abb. 3.2A erkennen kann, sind alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien in der Lage Kolonien zu bilden (grauer Balken). Stimuliert man den EGFR Signalweg direkt durch Zugabe von exogenem EGF, erhöht sich die Anzahl der Kolonien, mit Ausnahme der Zelllinie H520, stark (schwarzer Balken). Da die absolute Kolonienanzahl jeder Zelllinie stark variierte, wurden die mit EGF-Stimulation erstandenen Kolonien bei allen Zelllinien als 100% dargestellt.

Blockiert man den EGFR mit Cetuximab, verringert sich die Fähigkeit Kolonien zu bilden. Bei den H292 reduziert sich die Zahl der Kolonien auf fast 0% und bei den H358 auf 30% (Abb. 3.2B).



**Abb. 3.2 ADAM17 Inhibition blockiert die Transformation von NSCLC Zellen EGFR-abhängig und -unabhängig**

NSCLC Zelllinien wurden als Duplikate wie angegeben für bis zu 4 Wochen mit DMSO/PBS, Cetuximab (30 µg/ml), BB-94 (10 µM – gelöst in DMSO) und EGF (25 ng/ml) behandelt und in einem Softagar Assay kultiviert. Die Abb.en zeigen die Anzahl der Kolonien in Prozent zu der jeweils angegebenen Kontrolle. Die Daten repräsentieren den Mittelwert (± Standardabweichung) von 3 unabhängigen Experimenten.

A: Kolonienanzahl in allen untersuchten Zelllinien ± EGF (Kolonienanzahl mit EGF entspricht 100%)

B: Kolonienanzahl bei H292 und H358 ± Cetuximab (Kolonienanzahl mit PBS entspricht 100%)

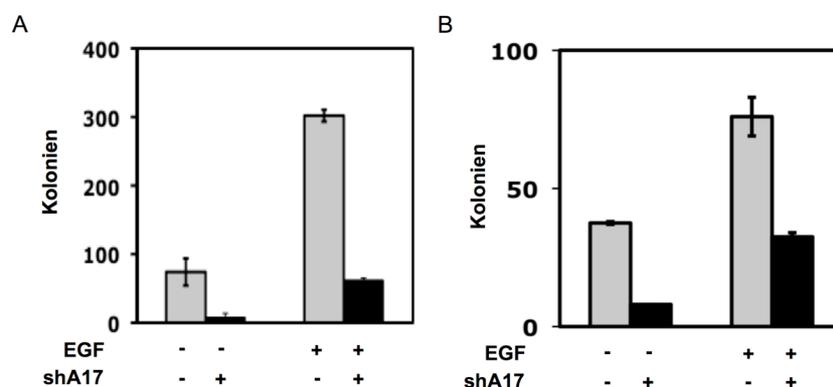
C: Kolonienanzahl in allen untersuchten Zelllinien mit BB-94 ± EGF (Kolonienanzahl mit DMSO entspricht 100%)

D: Kolonienanzahl bei H2170 (Kolonienanzahl mit PBS entspricht 100%)

Um zu testen, ob für die Transformation auch die proteolytische Aktivität von MMP's wichtig ist, wurde BB-94 (Abb. 3.2C) verwendet. Die Anzahl der Kolonien, welche ohne MMP-Inhibition entstanden (weißer Balken), wurde als 100% angesehen. Mit Ausnahme der H520, reduzierte BB-94 das Kolonienwachstum bei allen Zelllinien auf unter 10% (grauer Balken). Damit wirkt BB-94 vergleichbar stark auf das Transformationspotential der Zellen ein, wie der EGFR Inhibitor Cetuximab. Interessanterweise kann zusätzliche Stimulation des EGFR Signalweges durch EGF (schwarzer Balken), den inhibitorischen Effekt von BB-94 nicht vollständig antagonisieren. Die Fähigkeit, Kolonien zu bilden, bleibt stark eingeschränkt. Lediglich bei den H2170 konnte man, bei gleichzeitiger EGF Stimulation und Inhibition mit BB-94, mehr Kolonien im Softagar beobachten. Diese Zelllinie ist daher noch mal einzeln in Abb. 3.2D dargestellt. Auch hier erkennt man den starken Effekt, den BB-94 auf diese Zellen hat. Die Fähigkeit Kolonien zu bilden ist stark reduziert (2. Balken). Mit EGF erhöht sich dagegen das Transformationspotential und es entstehen mehr Kolonien (3. Balken). Bei der parallelen Anwendung von EGF und BB-94 wurde ebenfalls wieder eine Reduktion der Kolonienzahl beobachtet (4. Balken), obwohl der Effekt bei den H2170 nicht ganz so stark ausfiel wie bei den anderen Zelllinien.

Damit zeigt sich, dass bei allen Zelllinien, mit Ausnahme der H520, die ADAM17 vermittelte Transformation nur teilweise EGFR-abhängig ist.

Zusätzlich wurden auch ADAM17 *Knockdown* Zellen auf ihre Transformation im Softagar Assay untersucht (Abb. 3.3). Wie schon mit dem MMP Inhibitor (Abb. 3.2C), zeigte sich auch hier bei nahezu fehlender ADAM17 Proteinexpression, eine reduzierte Kolonienzahl (2. Balken). Die zusätzliche Stimulation mit EGF hatte nur einen limitierten Einfluss und konnte die ADAM17 Deletion bei den H292 Zellen nicht komplett kompensieren (4. Balken). Der gleiche Effekt konnte auch bei den H358 Zellen beobachtet werden (Abb. 3.3.B).



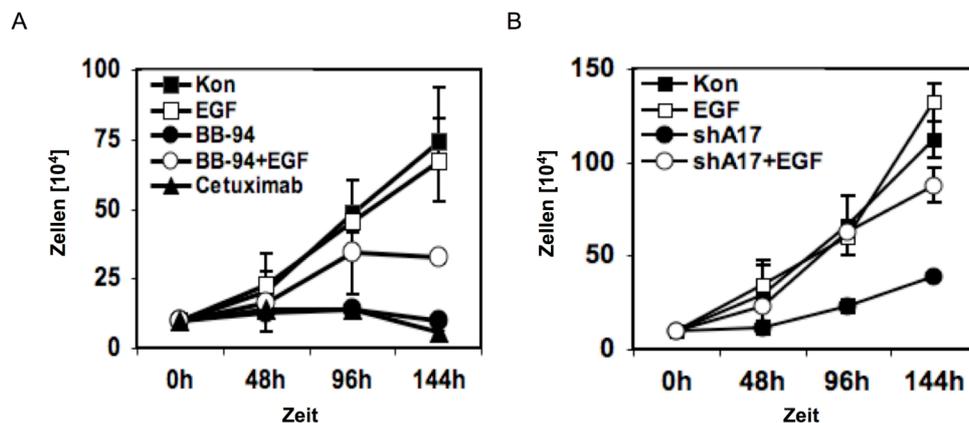
**Abb. 3.3 ADAM17 *Knockdown* blockiert die Transformation von NSCLC Zellen EGFR-abhängig und -unabhängig**

(A)  $1 \times 10^5$  H292 Zellen und (B)  $2 \times 10^4$  H358 Zellen mit und ohne ADAM17 *Knockdown*, sowie  $\pm$  EGF (25 ng/ml), wurden in Duplikaten in einem Softagar Assay kultiviert und nach 4 Wochen die absolute Kolonienzahl bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) von 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.1.1.2. Einfluss von ADAM17 auf die Proliferation

Neben der Transformation wird häufig auch die Proliferation von Tumorzellen untersucht. Diese kann teilweise ebenfalls ein vom EGFR Signalweg vermitteltes Ereignis sein<sup>8,168</sup>. Daher wurden H292 Zellen über einen Zeitraum von 144 h beobachtet und die Proliferation mit verschiedenen Stimulatoren und Inhibitoren untersucht. Zunächst wurden H292 Zellen pharmakologisch behandelt (Abb. 3.4A). Die mit EGF stimulierten Zellen proliferierten interessanterweise nicht stärker als unstimulierte Zellen (Kon), sondern nahmen vergleichbar stark zu. Inhibiert man dagegen H292 Zellen mit dem MMP Inhibitor BB-94 oder dem EGFR Inhibitor Cetuximab, so konnte dagegen nahezu keine Proliferation der Zellen mehr festgestellt werden. Bei paralleler Stimulation mit EGF, zeigten BB-94 (BB-94 + EGF) behandelte Zellen, zwar eine etwas stärkere Proliferation, jedoch erreichte der Wert nur ca. 50% des Wertes der Kontrollzellen. EGFR Stimulation mit EGF war nicht ausreichend um das Proliferationsdefizit durch BB-94 zu antagonisieren.

Vergleichbares wurde auch beim spezifischen *Knockdown* von ADAM17 in den H292 Zellen beobachtet (Abb. 3.4B). Gegenüber den Kontrollzellen (Kon) proliferierten die ADAM17 *Knockdown* Zellen (shA17) nur schwach. Stimulation mit EGF kann Proliferation in den Zellen induzieren, allerdings kann auch hier nicht die Proliferationsrate von Kontrollzellen erreicht werden. Die ADAM17 vermittelte Proliferation wird vermutlich nicht alleine über den EGFR Signalweg reguliert. Weitere ADAM17-abhängige Mechanismen sind daher nicht auszuschließen.



**Abb. 3.4 Einfluss von ADAM17 Expression auf die Proliferation von H292 Zellen**

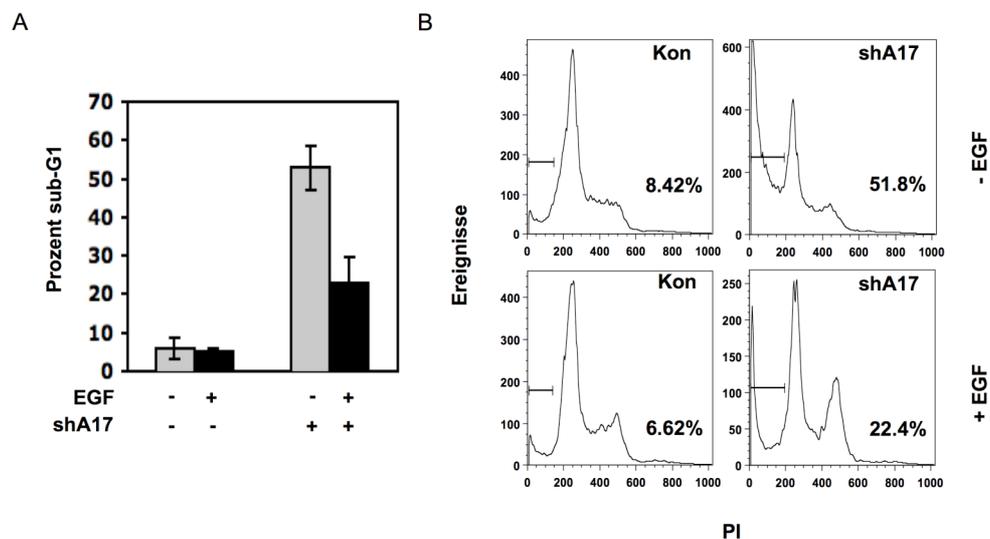
$1 \times 10^5$  H292 Zellen mit (A) pharmakologischer Inhibition und (B) *Knockdown* des ADAM17 Proteins  $\pm$  EGF (5 ng/ml) Stimulation wurden in Duplikaten in 6-well Platten kultiviert. Die Anzahl der Zellen wurde nach 48 h, 96 h und 144 h durch ein Lichtmikroskop gezählt. Die Graphen zeigen ein repräsentatives Ergebnis ( $\pm$  Standardabweichung) aus 3 Experimenten.

### 3.1.1.3. Einfluss von ADAM17 auf das Überleben von NSCLC Zellen

Krebszellen sind weiterhin durch Mechanismen gekennzeichnet, welche das Überleben dieser Zellen sichern sollen<sup>8</sup>. Darunter befinden sich auch Mediatoren des EGFR Signalwegs, die anti-apoptotisch wirken können<sup>168</sup>. Um in einer Zellpopulation die toten bzw. apoptotischen Zellen zu detektieren, wurden die Zellen ausplattiert und nach 72 h geerntet, fixiert und mit PI behandelt. Dadurch kann der Anteil der toten Zellen an der Gesamtzellpopulation durchflusszytometrisch analysiert und quantifiziert werden.

In einer Zellpopulation im Gleichgewichtszustand befinden sich nach 72 h rund 8% tote Zellen (Abb. 3.5A – 1. Balken). Stimulation mit EGF hat dagegen keinen großen Einfluss auf das Überleben. Nach 72 h findet man hier ~7% tote Zellen (2. Balken). Wird ADAM17 mit shRNA herunter reguliert, kann man dagegen nach 72 h über 50% tote Zellen messen (3. Balken). Dieser Anteil lässt sich mit EGF auf ~25% reduzieren (4. Balken). In Abb. 3.5B sind zusätzlich repräsentative Kurvenverläufe des Zellzyklus der H292 Zellen gezeigt.

Ohne ADAM17 ist demnach ein großer Teil der Zellen apoptotisch und das Überleben ist nicht alleine durch EGFR Stimulierung mit EGF antagonisierbar.



**Abb. 3.5 Einfluss von ADAM17 Expression auf das Überleben von H292 Zellen**

$2 \times 10^6$  H292 Zellen (Kon) und shA17 Zellen wurden für 72 h  $\pm$  EGF (5 ng/ml) inkubiert und fixiert. Nach Färbung mit einer PI-Lösung wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

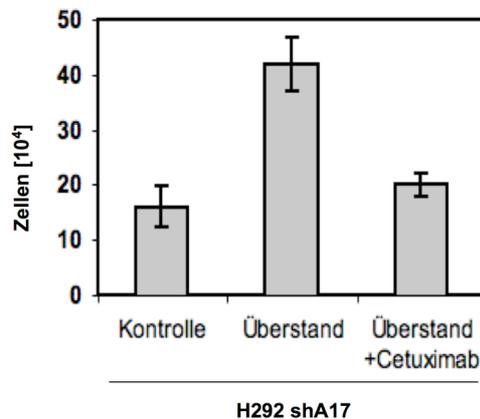
A: Die Darstellung zeigt den prozentualen Anteil der subG1 Fraktion an den Gesamtzellen und repräsentiert den Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) von 3 unabhängigen Experimenten.

B: Repräsentativer Kurvenverlauf von einem Experiment dargestellt mit der Flow Jo Software. Die Prozentangabe bezieht sich auf den Anteil der Zellen, die sich im sub-G1 Bereich befinden.

### 3.1.2. ADAM 17 vermittelte EGFR-unabhängige Signaltransduktion

Anhand der vorangegangenen Ergebnisse wurde gezeigt, dass der EGFR Signalweg eine wichtige Rolle für die Transformation, die Proliferation und das Überleben von NSCLC Zellen spielt. Allerdings zeigen die Ergebnisse auch, dass es noch weitere Proteine oder Signalwege geben muss, die von ADAM17 beeinflusst werden und wichtig für diese Prozesse in NSCLC Zellen sind. Das Substratspektrum von ADAM17 ist sehr breit und neben Liganden für den EGFR zählen weitere Wachstumsfaktoren, Zytokine, Adhäsionsproteine und auch Rezeptoren zu den Substraten<sup>105</sup>.

Um Hinweise auf einen weiteren alternativen Signalweg zu finden, der parallel zum EGFR Signalweg den Pathomechanismus von NSCLC Zellen vermittelt, wurden H292 Zellen mit ADAM17 *Knockdown* unter verschiedenen Bedingungen kultiviert (Abb. 3.6). Gegenüber der Kontrolle (1. Balken), welche mit normalem Medium kultiviert wurde, erhielt ein weiterer Ansatz den konditionierten Überstand von WT H292 Zellen (2. Balken). Nach 72 h wurden die Zellen ausgezählt. Man konnte beobachten, dass konditionierter Überstand in der Lage war, das Wachstum der shA17 Zellen zu steigern.



**Abb. 3.6 Konditionierter Überstand von WT-H292 Zellen enthält keine löslichen Faktoren die proliferationsfördernd sind**

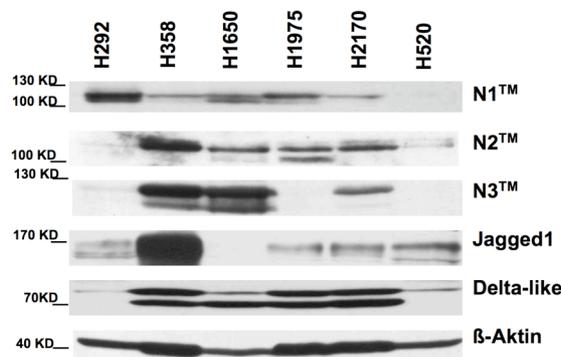
$1 \times 10^5$  H292 shA17 Zellen wurden ohne (Kontrolle) oder mit konditioniertem Überstand von  $2 \times 10^6$  H292 WT-Zellen  $\pm$  Cetuximab für 72 h in Duplikaten in 6-well Platten kultiviert und die Anzahl der Zellen nach 72 h durch ein Lichtmikroskop gezählt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) von 3 unabhängigen Experimenten.

Um auszuschließen, dass nicht nur die sich im konditionierten Überstand befindlichen EGFR Liganden das Wachstum verursacht haben, wurde in einem weiteren Ansatz zusätzlich Cetuximab hinzugefügt (3. Balken). Befinden sich weitere lösliche Faktoren für einen alternativen Signalweg im konditionierten Überstand, sollten die shA17 Zellen stärker wachsen als die Kontrolle. Hier war jedoch kein proliferationsfördernder Effekt mehr zu

sehen. Die EGFR Inhibition war ausreichend um die Proliferation der Zellen zu inhibieren. Das deutet darauf hin, dass hier kein weiterer Signalweg durch lösliche Liganden aktiviert wurde. Somit ist es möglicherweise ein zellständiges Substrat (z.B. ein Rezeptor) von ADAM17 welches, zusätzlich zu EGFR Liganden, in den H292 Zellen eine Rolle spielt.

Zu den zellständigen Rezeptoren, welche ADAM17 Aktivität benötigen, um selbst aktiviert zu werden, gehört die Familie der Notch Rezeptoren<sup>29</sup>. Ein erster Hinweis auf eine mögliche Funktion von Notch in den NSCLC Zellen ist die Expression der Rezeptoren und Liganden der Notch Familie in den verwendeten Zelllinien. Die Expressionsanalyse mittels Western Blot ist in Abb. 3.7 dargestellt. In 5 der 6 untersuchten Zelllinien konnte Notch1 (N1<sup>TM</sup>) Expression detektiert werden (Zeile 1). Interessanterweise sind die H520 Zellen, welche sich in den voran gegangenen Experimenten resistent gegenüber der ADAM17 Inhibition zeigten, Notch1 negativ. Auch Notch2 (N2<sup>TM</sup>) und Notch3 (N3<sup>TM</sup>) werden teilweise von den Zelllinien exprimiert. Die Liganden von Notch, Jagged1 und Delta-like wurden in 5 (Jagged1) beziehungsweise 4 (Delta-like) der Zelllinien detektiert.

ADAM17 schneidet Notch an der S2 Schnittstelle und ist damit essentiell für die Aktivierung dieser Rezeptoren. Explizit gezeigt wurde dies jedoch bisher nur für Notch1<sup>29</sup>. Da Notch1 auch von den meisten hier untersuchten Zelllinien exprimiert wird, sollte die Rolle von Notch1 in NSCLC Zellen genauer untersucht werden.



**Abb. 3.7 Expressionsanalyse von Notch Rezeptoren und seiner Liganden auf NSCLC Zellen**

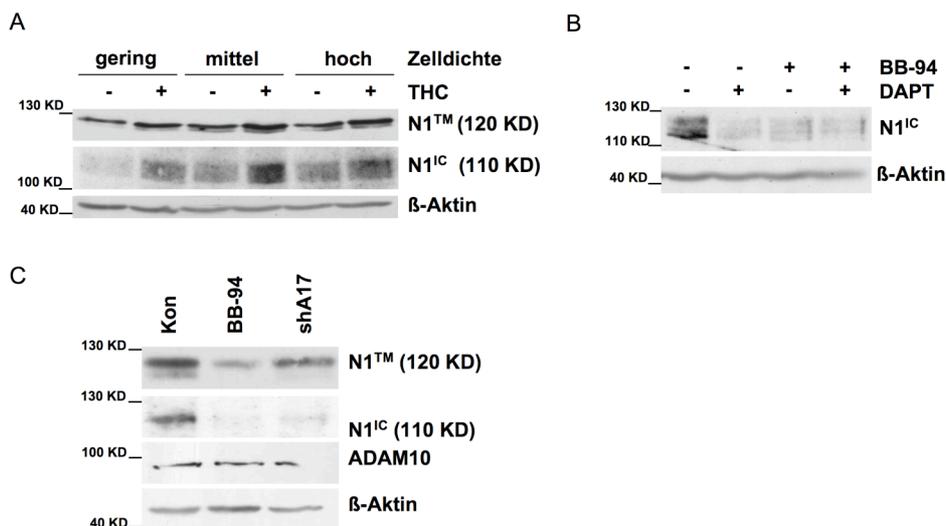
Lysate von  $2 \times 10^6$  Zellen jeder Zelllinie wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abb. zeigt die Expression der Proteine im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen Notch1 (N1<sup>TM</sup>), Notch2 (N2<sup>TM</sup>), Notch 3 (N3<sup>TM</sup>) und der Liganden Jagged1 und Delta-like. Die Kontrolle der geladenen Gesamtproteinmenge erfolgte mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin.

### 3.1.2.1. ADAM17 aktiviert Notch1 in NSCLC Zellen *in vitro*

Die Aktivierung der Notch Signaltransduktion erfolgt durch direkten Zell-Zell Kontakt und führt zur Freisetzung eines intrazellulären Notch-Fragments (N1<sup>IC</sup>). Dieses kann mit einem spezifischen Antikörper im Western Blot detektiert werden. Wie man anhand der Zunahme

der N1<sup>IC</sup> Expression sehen kann, wird Notch1 mit steigender Zelldichte aktiviert (Abb. 3.8A). Zusätzlich erreicht man eine Aktivierung von Notch1 durch Stimulation mit THC. Dies ist weitgehend unabhängig von der Zelldichte. THC stimuliert jedoch Notch1 nicht direkt sondern aktiviert, wie schon unter 3.1.1 genannt, die proteolytische Aktivität von ADAM17<sup>166</sup>. Dadurch wirkt sich die durch THC gesteigerte ADAM17 Aktivität auch auf die Aktivierung der Notch1 Signalkaskade aus. Dagegen führt sowohl die Gabe des Notch Inhibitors DAPT ( $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor), als auch von BB-94, zu einem Abbruch der Notch Aktivierung (fehlende Expression von N1<sup>IC</sup>, Abb. 3.8B).

Für einige Zellen wurde publiziert, dass nicht ADAM17, sondern ADAM10 für die Proteolyse von Notch1 verantwortlich ist<sup>169</sup>. ADAM10 wird ebenfalls durch BB-94 inhibiert und könnte so die Notch1 Prozessierung verhindern. Gegen eine Beteiligung von ADAM10 spricht jedoch der selektive *Knockdown* von ADAM17 (Abb. 3.8C). Dieser ist vollkommen ausreichend, um die Notch1 Rezeptorproteolyse in NSCLC Zellen *in vitro* zu inhibieren. ADAM10 wird in den shA17 Zellen exprimiert, hat aber keinen Einfluss auf die Notch1 Aktivierung.



**Abb. 3.8 ADAM17 vermittelt Notch1 Aktivierung in H292 Zellen**

A: Einfluss von Zelldichte und ADAM17 Stimulation auf Notch1 Aktivierung. H292 Zellen wurden auf 10 cm Platten in geringer ( $4 \times 10^6$  Zellen), mittlerer ( $5 \times 10^6$  Zellen) oder hoher ( $6 \times 10^6$  Zellen) Zelldichte ausplattiert und mit THC ( $1 \mu\text{M}$ ) oder PBS über Nacht stimuliert. Lysate wurden auf Proteinexpression von Notch1 (N1<sup>TM</sup>) und aktivem intrazellulären Notch1 Fragment (N1<sup>IC</sup>) getestet.

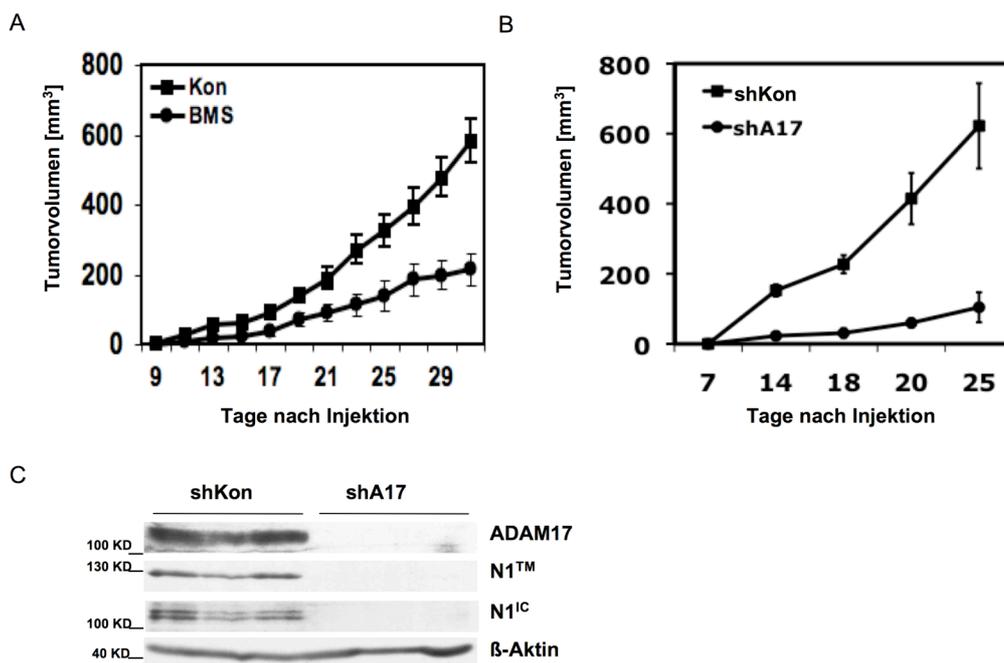
B: Expression von aktivem intrazellulären Notch1 Fragment (N1<sup>IC</sup>) in THC-stimulierten H292 Zellen mit  $10 \mu\text{mol/L}$  BB-94 und/oder  $1 \mu\text{mol/L}$  DAPT.

C: H292 Kontrollzellen, welche über Nacht mit BB-94 behandelt wurden oder H292 Zellen mit stabilen ADAM17 *Knockdown* (shA17) wurden auf Proteinexpression von Notch1 (N1<sup>TM</sup>), aktivem intrazellulären Notch1 Fragment (N1<sup>IC</sup>) und ADAM10 getestet.

Zellpellets aller angegebenen Zellen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Membranen auf Proteinexpression mit spezifischen Antikörpern getestet. Die Kontrolle der geladenen Gesamtproteinmenge erfolgte mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin.

### 3.1.3. Einfluss von ADAM17 auf das Wachstum von Tumoren in Nacktmäusen

Um die onkogene Transformation von NSCLC Zellen *in vivo* zu testen, wurden H292 Zellen beidseitig subkutan in die Flanken von Nacktmäusen injiziert. Die Mäuse blieben entweder unbehandelt oder bekamen zweimal täglich einen ADAM17 Inhibitor. In diesen Experimenten wurde dafür der Inhibitor BMS-561,392 (BMS), welcher von Bristol-Myers-Squibb zur Verfügung gestellt wurde, verwendet. Dieser Inhibitor wurde bereits in klinischen Studien getestet und ist ein selektiver ADAM17 Inhibitor<sup>170</sup>. Die Verabreichung von BMS erfolgte oral mit Hilfe einer Verweilkanüle, in einer Dosierung von (20 mg/kg).



**Abb. 3.9 ADAM17 vermitteltes Wachstum und Analyse von Tumoren in Nacktmäusen**

A:  $2 \times 10^6$  H292 Zellen wurden beidseitig in die Flanken von Nacktmäusen subkutan injiziert und anschließend zweimal täglich mit BMS (20 mg/kg - gelöst in Zitratpuffer) oder nur Zitratpuffer (Kon) durch orale Verabreichung behandelt. Die Tumorgöße wurde jeden 2. Tag gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) von 5 Tieren pro Gruppe.

B:  $2 \times 10^6$  H292 Zellen (shKon) und  $2 \times 10^6$  H292 shA17 Zellen (shA17) wurden in die Flanken von Nacktmäusen gespritzt und das Tumorwachstum wie unter (A) beschrieben untersucht.

C: 3 Tumoren von Mäusen jeder Gruppe (beschrieben unter B) wurden entnommen, die Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Expression von ADAM17, Notch1 (N1<sup>TM</sup>) und N1<sup>IC</sup> untersucht. Die Kontrolle der geladenen Gesamtproteinmenge erfolgte mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin.

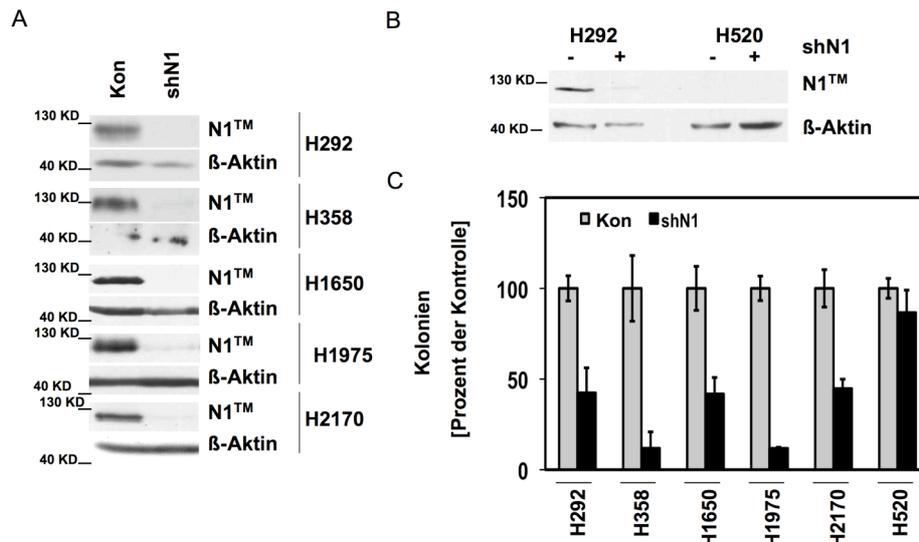
In einem Zeitraum von 4 Wochen entstanden bei den unbehandelten Mäusen (Kon) große Tumoren mit einem Volumen von  $600 \text{ mm}^3$  (Abb. 3.9A). Das Tumolvolumen von mit BMS behandelten Mäusen, betrug dagegen nach 4 Wochen nur  $\sim 200 \text{ mm}^3$  und damit weniger als 40% gegenüber der Kontrolle. Auch Zellen mit ADAM17 *Knockdown* zeigten stark reduziertes Wachstum (shA17) gegenüber Kontrolltumoren (shKon) in Nacktmäusen (Abb.

3.9B). Tumoren dieser Mäuse wurden entnommen und im Western Blot auf Notch Aktivität untersucht (Abb. 3.9C). Dabei zeigte sich, dass in den shA17 Tumoren gegenüber den Kontrolltumoren keine detektierbare N1<sup>IC</sup> Expression gefunden werden konnte. Auch N1<sup>TM</sup> war hier erheblich reduziert. Daraus lässt sich ableiten, dass ADAM17 auch *in vivo* das Tumorzellwachstum und die Aktivierung von Notch1 reguliert.

### **3.1.4. Notch1 Signaltransduktion als kritischer Faktor für den transformierten Phänotyp von NSCLC Zellen**

#### **3.1.4.1. *Knockdown* von Notch1**

Die bisherigen Ergebnisse implizieren, dass ADAM17 Inhibition und Deletion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einem Abbruch der Notch1 Signaltransduktion führt. Um zu untersuchen, ob dieser Signalweg neben dem EGFR Signalweg eine Rolle für NSCLC Zellen bezüglich Transformation, Proliferation und Apoptose spielt, wurde Notch1 in allen verwendeten Zelllinien mittels shRNA herunter reguliert (Abb. 3.10A). Um mögliche unspezifische Effekte des shRNA-Konstrukts zu berücksichtigen, wurden auch die Notch1 negativen H520 Zellen mit der shRNA infiziert (Abb. 3.10B). Das Transformationspotential der Notch1 *Knockdown* Zellen (shN1) wurde in einem Softagar Assay untersucht (Abb. 3.10C). In allen verwendeten Zelllinien, mit Ausnahme der Notch1 negativen H520, reduzierte der Notch1 *Knockdown* die Fähigkeit Kolonien zu bilden. Die Anzahl der Kolonien verringerte sich um mindestens 50%.



**Abb. 3.10 Der Notch1 *Knockdown* reduziert die Transformation von NSCLC Zellen**

A: Nachweis des Notch1 *Knockdowns* (shN1) mittels Western Blot in NSCLC Zelllinien gegenüber den kontrollinfizierten Zellen (Kon). Die Kontrolle der geladenen Gesamtproteinmenge erfolgte mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin.

B: Notch1 Western Blot von H520 Zellen, die mit Kontrollvektor oder Notch1 shRNA infiziert wurden. Die H292 Zellen wurden als Vergleich in dieser Abb. mit dargestellt.

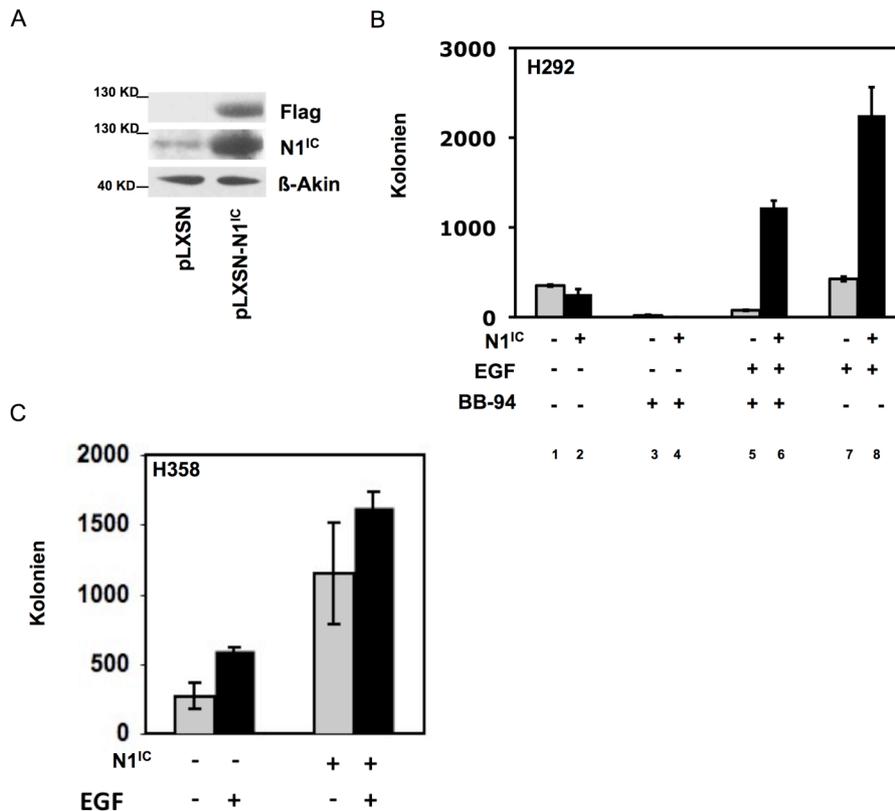
C: Kontrollzellen (Kon) und Notch1 *Knockdown* Zellen (shN1) aller NSCLC Zelllinien wurden als Duplikate für 3-4 Wochen in einem Softagar Assay kultiviert. Die Abb. zeigt die Anzahl der Kolonien in Prozent mit der Kolonienanzahl der WT-Zellen als 100%. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) von 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.1.4.2. Ektopische Überexpression von Notch1

Als entgegengesetzten Ansatz zum *Knockdown* von Notch1 wurde das aktive Notch1 Fragment N1<sup>IC</sup> ektopisch in H292 Zellen exprimiert (Abb. 3.11A). Diese Zellen wurden zunächst in einem Softagar Assay auf ihre Transformationseffizienz untersucht (Abb. 3.11B - 2. Balken). Gegenüber den Kontrollzellen (1. Balken) zeigten die H292 N1<sup>IC</sup> Zellen ein vergleichbares Kolonienwachstum. N1<sup>IC</sup> Überexpression alleine steigert demnach die Transformationseffizienz der Zellen nicht. Durch Zugabe von BB-94 wurde das Koloniewachstum nahezu komplett verhindert (4. Balken). Überraschenderweise hob die Kombination von N1<sup>IC</sup> Überexpression, mit gleichzeitiger EGFR Stimulation durch exogenes EGF, die Transformationseffizienz sehr stark an (8. Balken). Der Effekt war viel stärker als EGFR Stimulation alleine (7. Balken). Zusätzlich wurden die Zellen dadurch deutlich unempfindlicher gegenüber BB-94 Behandlung (6. Balken). Vergleichbare Resultate erhielt man auch mit den H358 Zellen (Abb. 3.11C).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass N1<sup>IC</sup> Überexpression, in Kombination mit EGFR Aktivierung die Transformationseffizienz erheblich steigert und den negativen

regulatorischen Effekt einer MMP Inhibition deutlich abschwächt. N1<sup>IC</sup> alleine scheint – vor allem in Anwesenheit von BB-94- die Kolonienzahl zu reduzieren.



**Abb. 3.11 Der transformierte Phänotyp von NSCLC Zellen wird von der Notch1<sup>IC</sup> Expression moduliert**

A: Nachweis der ektopischen N1<sup>IC</sup> Expression (pLXSN-N1<sup>IC</sup>) in H292 Zellen mittels Western Blot mit Antikörpern gegen das Flag-Tag des Vektors und gegen N1<sup>IC</sup>. Die Kontrolle der geladenen Gesamtproteinmenge erfolgte mit einem Antikörper gegen β-Aktin.

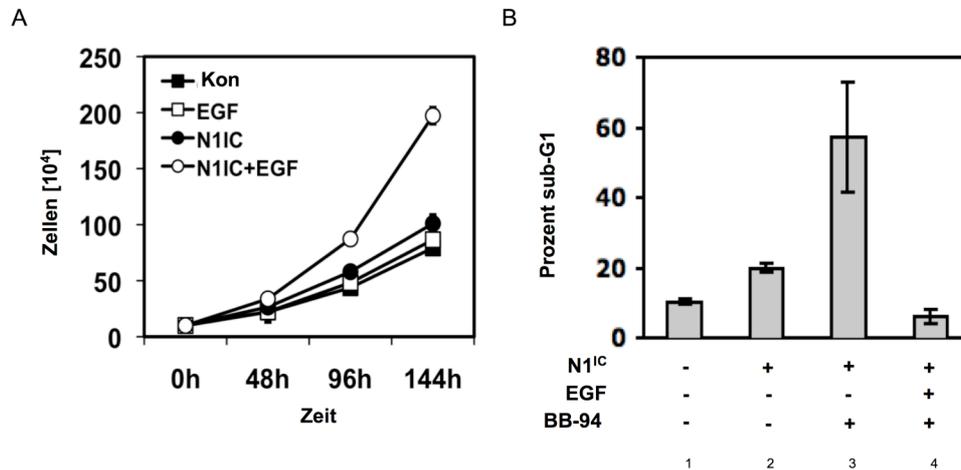
B: Kolonien in einem Softagar Assay von Kontroll- und N1<sup>IC</sup>-infizierten H292 Zellen. Je 1x10<sup>5</sup> Zellen wurden als Duplikate für 4 Wochen ± BB-94 (10 μM) ± EGF (25 ng/ml) behandelt und anschließend ausgezählt. Die Abb. zeigt die Anzahl der Kolonien und repräsentieren den Mittelwert (± Standardabweichung) von 3 unabhängigen Experimenten.

C: Kolonien in einem Softagar Assay von Kontroll- und N1<sup>IC</sup>-infizierten H358 Zellen. Je 1x10<sup>5</sup> Zellen wurden als Duplikate für 4 Wochen ±EGF (5 ng/ml) behandelt und anschließend ausgezählt. Die Abb. zeigt die Anzahl der Kolonien und repräsentieren den Mittelwert (± Standardabweichung) von 3 unabhängigen Experimenten.

Eine ähnliche Interaktion zwischen der EGFR Aktivierung und der Notch1 Aktivierung zeigte sich auch in der Proliferation der Zellen. In einem Proliferationsassay (Abb. 3.12A) über 144 h, zeigten H292 Zellen mit N1<sup>IC</sup> Überexpression ein vergleichbares Wachstum wie Kontrollzellen (Kon) oder mit EGF stimulierte Zellen (EGF). Dagegen erhöhte sich das Zellwachstum, bei gleichzeitiger Stimulation beider Signalwege (N1<sup>IC</sup>+EGF), sehr stark.

Auch bei einer Analyse der Rolle von Notch1 beim Überleben der Zellen zeigte sich, dass ektopische N1<sup>IC</sup> Überexpression nur in Kombination mit EGFR Aktivierung die Zellen vor BB-94 induzierter Apoptose schützt (Abb. 3.12B). So erhöht N1<sup>IC</sup> Expression den Anteil toter

Zellen (2. Balken) gegenüber der Kontrolle (1. Balken) leicht, während zusätzliche Inhibition mit BB-94 (3. Balken) den Anteil toter Zellen sehr stark steigert. Dagegen ist der Anteil der toten Zellen bei den N1<sup>IC</sup>-exprimierenden Zellen, bei Kombination von BB-94 und EGF (4. Balken), vergleichbar mit der Kontrolle (1. Balken). Die Kombination beider Signalwege scheint den BB-94-induzierten Zelltod zu verhindern.



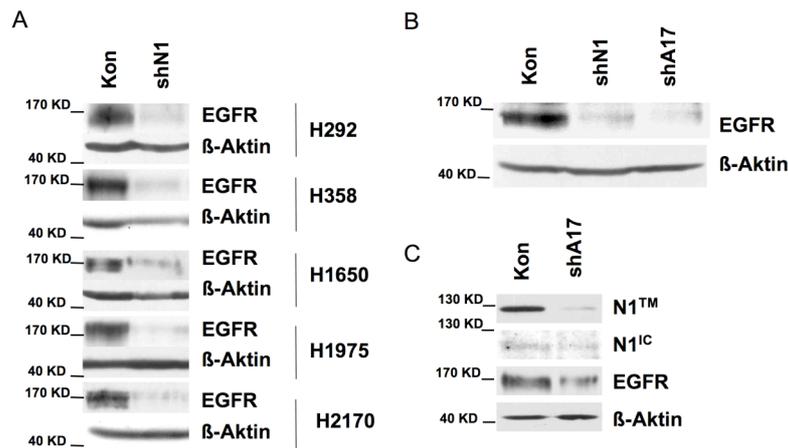
**Abb. 3.12 Modulation von Proliferation und Überleben durch Notch1<sup>IC</sup> Expression**

A:  $1 \times 10^5$  Kontroll- H292-Zellen (Kon) und N1<sup>IC</sup> überexprimierenden Zellen (N1<sup>IC</sup>)  $\pm$  EGF Stimulation (5 ng/ml) wurden in Duplikaten in 6-well Platten kultiviert und die Anzahl der Zellen nach 48 h, 96 h und 144 h durch ein Lichtmikroskop gezählt. Der Graph zeigt ein repräsentatives Ergebnis ( $\pm$  Standardabweichung) aus 3 Experimenten.

B: Die Kontroll und N1<sup>IC</sup> exprimierenden Zellen wurden für 72 h  $\pm$  EGF (5 ng/ml) und  $\pm$  BB-94 (10  $\mu$ M) inkubiert und anschließend fixiert. Nach Färbung mit einer PI-Lösung wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Darstellung zeigt den prozentualen Anteils der sub-G1 Fraktion an den Gesamtzellen.

### 3.1.4.3. Notch1 reguliert die EGFR Proteinexpression

Die bisherigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass nur die gleichzeitige Aktivierung der Notch1 und EGFR Signaltransduktion sich als überlegen in Bezug auf Transformation, Überleben und Proliferation erweisen. Um einen Zusammenhang zwischen beiden Signalwegen zu finden, wurde zunächst die EGFR Proteinexpression in den Notch1 *Knockdown* Zellen im Western Blot untersucht. Dabei fiel auf, dass in allen Zelllinien die EGFR Proteinexpression stark reduziert war (Abb. 3.13A). Daraufhin wurde in einem weiteren Ansatz untersucht, ob auch die Zellen mit ADAM17 *Knockdown*, eine Veränderung der EGFR Expression zeigten (Abb. 3.13B shA17). Tatsächlich konnte auch in diesen Zellen eine stark verringerte EGFR Proteinexpression beobachtet werden. Diese Daten wurden durch die Analyse der Tumoren aus den in Kapitel 3.1.3. beschriebenen Xenograft Experimenten bestätigt. Auch *in vivo* zeigen ADAM17 *Knockdown* Zellen eine verringerte Expression von EGFR (Abb. 3.13C).



**Abb. 3.13 Notch1 und ADAM17 Knockdown reduzieren die EGFR Proteinexpression**

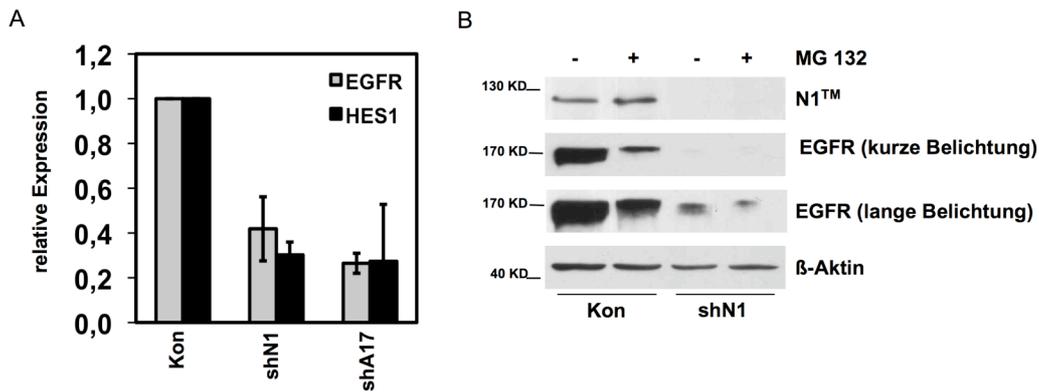
Nachweis der EGFR Proteinexpression mittels Western Blot. Die Kontrolle der geladenen Gesamtproteinmenge erfolgte mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin.

A: NSCLC Zelllinien mit (shN1) und ohne (Kon) Notch1 *Knockdown*

B: H292 Zellen mit Notch1 (shN1) oder ADAM17 (shA17) *Knockdown*

C: Je ein Tumor von Mäusen, denen shA17 Zellen oder Kontrollzellen (Kon) injiziert wurden (aus den Xenograft Experimenten aus Kapitel 3.1.3.), wurde auf Expression von Notch1 ( $N1^{TM}$ ),  $N1^{IC}$  und EGFR getestet. Die Kontrolle der geladenen Gesamtproteinmenge erfolgte mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin.

Anschließend wurde untersucht, ob die beobachtete reduzierte Proteinexpression von EGFR transkriptionell reguliert ist oder durch einen verstärkten proteosomalen Abbau des EGFR Rezeptors bedingt ist. Dafür wurde zunächst die EGFR mRNA Expression in H292 Zellen durch quantitative RT-PCR untersucht (Abb. 3.14A). Hier zeigte sich, dass auf transkriptioneller Ebene eine reduzierte mRNA Expression von EGFR in shN1 und shA17 Zellen zu finden ist (grauer Balken). Als Positivkontrolle für ein von Notch transkriptionell reguliertes Protein, wurde die mRNA Expression von HES1 untersucht. Auch für dieses konnte eine Reduktion der mRNA in den *Knockdown* Zellen beobachtet werden (schwarzer Balken). Als Vergleich wurde auch der proteosomale Abbau von EGFR untersucht. Dafür wurden H292 Zellen mit und ohne Notch1 *Knockdown* mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt (Abb. 3.14B). Durch MG132 wird proteosomaler Abbau verhindert, was zu einer Anhäufung von Proteinen führt, die über diesen Weg abgebaut werden. In den H292 Zellen konnte mit MG132 Behandlung jedoch weder in den Kontrollzellen (Kon), noch in den shN1 Zellen ein stärkeres EGFR Proteinsignal detektiert werden, als in den vergleichbaren Kontrollen ohne MG132 Behandlung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass EGFR transkriptionell und nicht durch verstärkte Degradation reguliert wird.



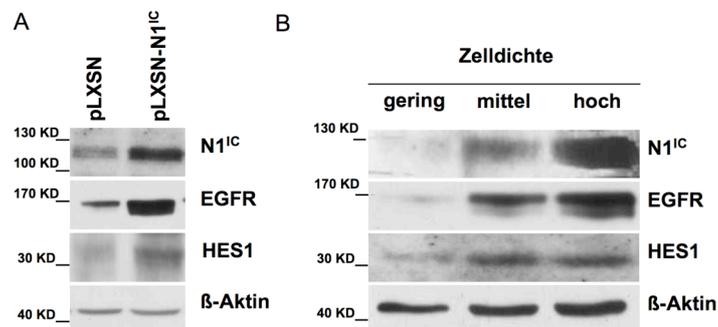
**Abb. 3.14 Notch1 Knockdown reguliert EGFR auf transkriptioneller Ebene**

A: Kontroll- H292 Zellen (Kon) und H292 Zellen mit Notch1 (shN1) und ADAM17 (shA17) *Knockdown* wurden mit RT-PCR auf Expression von EGFR und HES1 mRNA untersucht. Das Diagramm zeigt die relative Expression der mRNA in den *Knockdown* Zellen gegenüber der Kontrolle und repräsentiert den Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) von 3 unabhängigen Experimenten.

B: H292 und H292 shN1 Zellen wurden für 4 h mit dem Proteasominhibitor MG132 (10  $\mu$ M) oder DMSO behandelt und die daraus gewonnenen Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abb. zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western-Blot mit einem EGFR Antikörper und einem Notch1 (N1<sup>TM</sup>) Antikörper. Die Kontrolle der geladenen Gesamtproteinmenge erfolgte mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin.

Um die Notch1 abhängige Regulation von EGFR zu bestätigen, wurden auch H292 Zellen mit ektoptischer Expression von N1<sup>IC</sup> untersucht (Abb. 3.15A). Interessanterweise führte hier die Überexpression von N1<sup>IC</sup> zu einer wesentlichen Erhöhung der EGFR Proteinexpression. Als Positivkontrolle wurde auch die Proteinexpression von HES1 untersucht. Dessen Expression war ebenfalls in N1<sup>IC</sup> überexprimierenden Zellen erhöht.

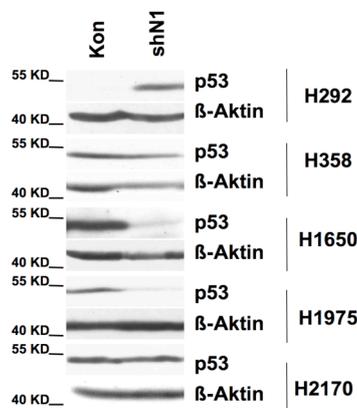
Da Notch durch Zell-Zell Kontakt aktiviert wird, sollte die Proteinexpression von EGFR bei verschiedenen Zelldichten analysiert werden (Abb. 3.15B). Man konnte beobachten, dass nicht nur die N1<sup>IC</sup> Expression sich bei steigender Zelldichte erhöht, sondern auch die Proteinexpression von EGFR und HES1 ansteigt.



**Abb. 3.15 Notch1 Aktivierung steigert die EGFR Expression**

Notch1 Aktivierung in H292 Zellen durch (A) Überexpression von N1<sup>IC</sup> (pLXSN-N1<sup>IC</sup>) und (B) durch steigende Zelldichte. Die aus den Zellpellets gewonnenen Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abb. zeigt die Expression der Proteine im Western-Blot mit Antikörpern gegen N1<sup>IC</sup>, EGFR und HES1. Die Kontrolle der geladenen Gesamtproteinmenge erfolgte mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin.

Purow *et al.* beobachteten 2008, dass Notch auch in Glioma Zellen die Transkription von EGFR reguliert<sup>171</sup>. Sie zeigten, dass der Effekt möglicherweise p53 vermittelt ist. In Glioma Zellen reguliert Notch1 Inhibition die p53 Proteinexpression, wodurch anschließend die EGFR Proteinexpression reduziert wird. Daher sollte der Effekt des Notch1 *Knockdowns* auf die p53 Proteinexpression, in allen verwendeten NSCLC Zelllinien untersucht werden (Abb. 3.16). Jedoch ergab sich kein homogenes Muster, das mit der EGFR Expression korrelierte. Während p53 in H292 shN1 stärker exprimiert wird als in der Kontrolle, ist in den H358 und H2170 kein Unterschied zur Kontrolle zu sehen. In den H1650 und H1975 ist die p53 Expression dagegen gegenüber der Kontrolle reduziert. Dem gegenüber steht eine einheitliche Reduktion der EGFR Proteinexpression in den shN1 Zellen. Eine Beteiligung von p53 wie es in Glioma Zellen beobachtet wurde, ist in den NSCLC Zelllinien daher unwahrscheinlich.

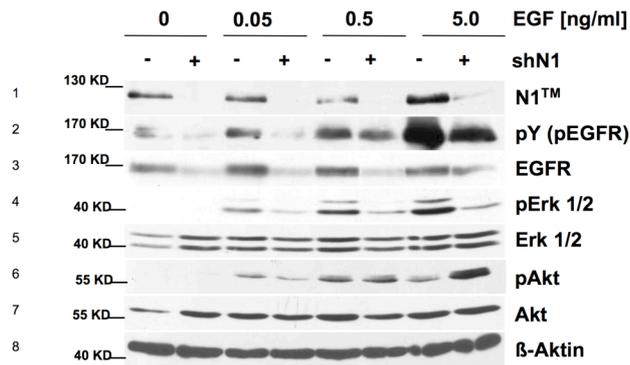


**Abb. 3.16 Einfluss von shN1 auf die p53 Proteinexpression**

Expression von p53 in NSCLC Zellen  $\pm$  shN1 im Western Blot. Die Kontrolle der geladenen Gesamtproteinmenge erfolgte mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin.

#### 3.1.4.4. EGFR-abhängige Signaltransduktion in Notch1 *Knockdown* Zellen

Da die EGFR Expression stark durch den Notch1 *Knockdown* reduziert wird, ist es unerlässlich, den Effekt auf die EGFR Signaltransduktion und auf die Zellen zu untersuchen. Notch1 defiziente H292 Zellen wurden daher mit steigenden Konzentrationen EGF (0,05-5 ng/ml) stimuliert und der Phosphorylierungsstatus von Proteinen des EGFR Signalweges (Erk 1/2, Akt) untersucht (Abb. 3.17). Dabei fiel auf, dass die Phosphorylierung von EGFR (Zeile 2) und Erk 1/2 (MAPK Signalweg - Zeile 4) in den shN1 Zellen wesentlich niedriger war als bei Kontrollzellen ohne Notch1 *Knockdown*. Akt Aktivierung (PI-3K Signalweg - Zeile 6) hingegen war nahezu unverändert. Das zeigt, dass Notch1 nicht nur die EGFR Expression reguliert sondern auch die EGFR-abhängige Erk Aktivierung beeinflusst.



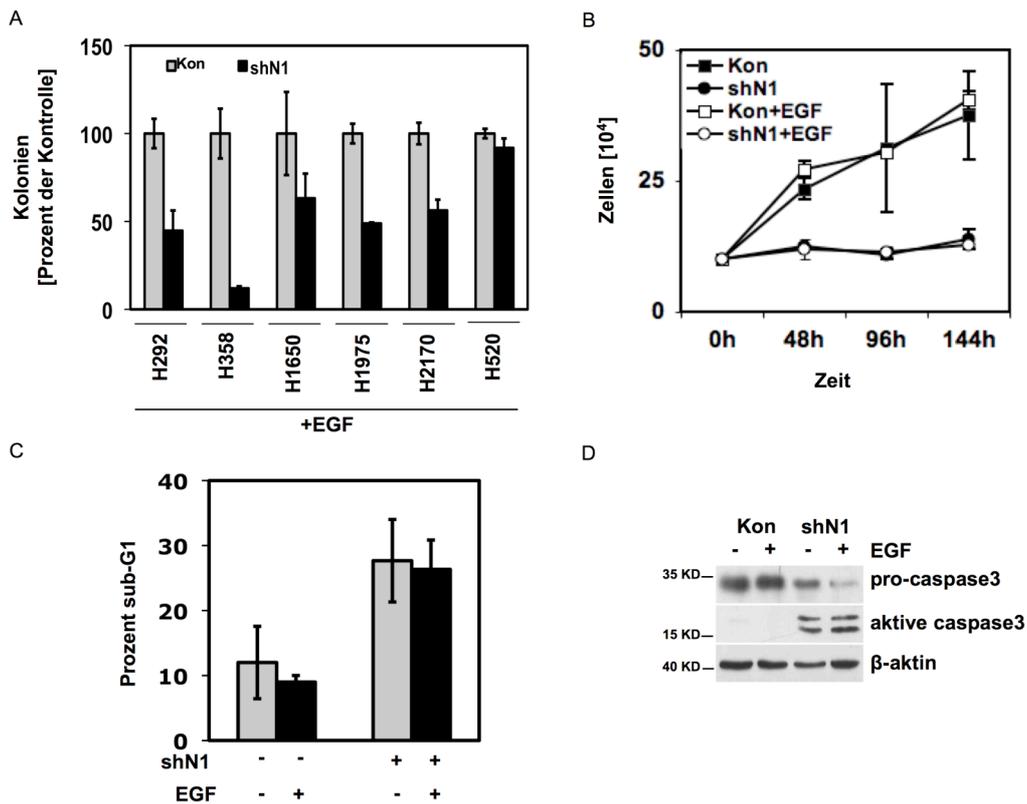
**Abb. 3.17 EGFR-abhängige Signaltransduktion in H292 Zellen mit Notch1 *Knockdown***

$2 \times 10^6$  H292 Zellen  $\pm$  Notch1 *Knockdown* wurden über Nacht in 0,5% Serum kultiviert und vor der Lyse der Zellen für 10 min mit den angegebenen EGF Konzentrationen behandelt. Der abgebildete Western Blot zeigt die Lysate nach gelelektrophoretischer Separation. Mit phospho-Tyrosin wurde aktivierter EGFR nachgewiesen und mit den phosphospezifischen Antikörpern pErk1/2 und pAkt wurden aktiviertes Erk1/2 und Akt nachgewiesen. Mit Antikörpern gegen Erk1/2 und Akt wurde nach Entfernen des Erstantikörpers die Gesamtproteinexpression von Erk und Akt untersucht. Die Kontrolle der geladenen Gesamtproteinmenge erfolgte mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin.

Die Modulation des EGFR Signalweges in Notch1 defizienten Zellen, bedingt auch eine Auswirkung auf die Biologie dieser Zellen. So hat Stimulation mit EGF auf diese Zellen nur eine geringe Wirkung. Wie in Abb. 3.10C gezeigt, wuchsen in einem Softagar Assay mit Notch1 *Knockdown* Zellen nur sehr wenige Kolonien gegenüber den Kontrollzellen. In Abb. 3.18A wurde das Experiment wiederholt, zu den Zellen aber zusätzlich EGF hinzugefügt. Das Koloniewachstum bleibt jedoch auch hier (schwarzer Balken) gegenüber den Kontrollzellen (grauer Balken) um ca. 50% reduziert.

Exogenes EGF war ebenfalls nicht in der Lage die Proliferation von Notch1 *Knockdown* Zellen (Abb. 3.18B) zu steigern. Weder Notch1 *Knockdown* Zellen ohne EGF (shN1) noch mit EGF (shN1+EGF) zeigten hier eine nennenswerte Proliferation wie Zellen mit WT Notch1 (Kon).

Auch beim Überleben der Zellen zeigte sich mit jeweils ca. 25% toten Zellen nach 72 h kein positiver Effekt durch die EGFR Stimulation (Abb. 3.18C). Die Spontanapoptose der Zellen wurde zusätzlich auf Proteinebene analysiert. Dafür wurde in Lysaten von shN1 Zellen die Expression aktiver Caspase3 untersucht<sup>172</sup>. Im Gegensatz zu Kontrollzellen (Kon), war aktive Caspase3 nur in den shN1 Zellen nachzuweisen. Zugabe von EGF verringerte die Caspase3 Prozessierung nicht (Abb. 3.18D). Obwohl in EGF supplementierten Zellen teilweise noch Aktivierung (Phosphorylierung) des EGFR stattfindet und auch der PI-3K Signalweg aktiviert wird (Abb. 3.17), bleiben die Notch1-abhängigen Defizite auf die Transformation, die Proliferation und das Überleben der Tumorzelle gleichermaßen bestehen.



**Abb. 3.18 EGF Supplementation antagonisiert nicht die durch Notch1 *Knockdown* entstandenen Defizite hinsichtlich Transformation, Proliferation und Apoptose**

A: WT-Zellen (Kon) und Notch1 *Knockdown* Zellen (shN1) wurden als Duplikate für bis zu 4 Wochen in einem Softagar Assay mit EGF (25 ng/ml) kultiviert. Die Darstellung zeigt die Anzahl der Kolonien in Prozent, gemessen an der Kolonienanzahl der WT-Zellen als 100%. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) von 3 unabhängigen Experimenten.

B:  $1 \times 10^5$  WT H292-Zellen (Kon) und Notch1 *Knockdown* Zellen (shN1)  $\pm$  EGF Stimulation (5 ng/ml) wurden in Duplikaten in 6-well Platten kultiviert und die Anzahl der Zellen nach 48 h, 96 h und 144 h durch ein Lichtmikroskop gezählt. Der Graph zeigt ein repräsentatives Ergebnis ( $\pm$  Standardabweichung).

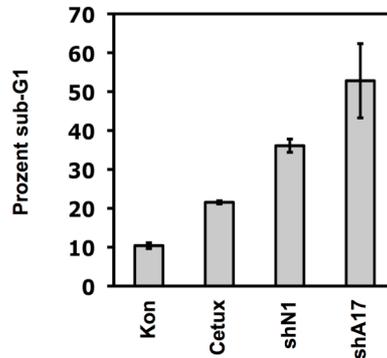
C: H292-Zellen und shN1 Zellen wurden für 72 h  $\pm$  EGF (5 ng/ml) kultiviert und anschließend fixiert. Nach Färbung mit einer PI-Lösung wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Darstellung zeigt den prozentualen Anteil der sub-G1 Fraktion an den Gesamtzellen und repräsentiert den Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) von 3 unabhängigen Experimenten.

D;  $2 \times 10^6$  H292 Zellen  $\pm$  Notch1 *Knockdown* wurden über Nacht in 0,5% Serum  $\pm$  EGF (5 ng/ml) kultiviert. Aktive Caspase3 wurde mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen und die Gesamtproteinexpression von Caspase3 mit einem Antikörper der gegen pro-Caspase3 gerichtet war. Die Kontrolle der geladenen Gesamtproteinmenge erfolgte mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin.

### 3.1.5. ADAM17 und Notch als potentielle molekulare Ziele therapeutischer Intervention

Für die Therapie von Lungenkrebs ist es besonders relevant, molekulare Mechanismen zu finden, die bei Tumorzellen Apoptose auslösen können. In Abb. 3.19 sind die Auswirkungen der einzelnen Behandlungsverfahren aus dieser Arbeit, auf das Überleben von H292 Zellen

dargestellt. Inhibition des EGFR Signalweges durch Cetuximab führte zu einer sub-G1 Fraktion von ca. 20%. Im Gegensatz dazu induzierte der *Knockdown* von Notch1 (shN1) Apoptose in 35% der Zellen. Der *Knockdown* von ADAM17 (shA17) löste sogar in 50% der H292 Zellen Apoptose aus.



**Abb. 3.19 Auswirkung einzelner Behandlungsstrategien auf das Überleben von H292 Zellen**

H292-Zellen wurden für 72 h mit 30 µg/ml Cetuximab (Cetux) behandelt oder es wurden Zellen mit Notch1 (shN1) bzw. ADAM17 (shA17) *Knockdown* für 72 h in inkubiert. Nach Fixierung und Färbung mit einer PI-Lösung wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Darstellung zeigt den prozentualen Anteil der sub-G1 Fraktion an den Gesamtzellen und repräsentiert den Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) von 3 unabhängigen Experimenten.

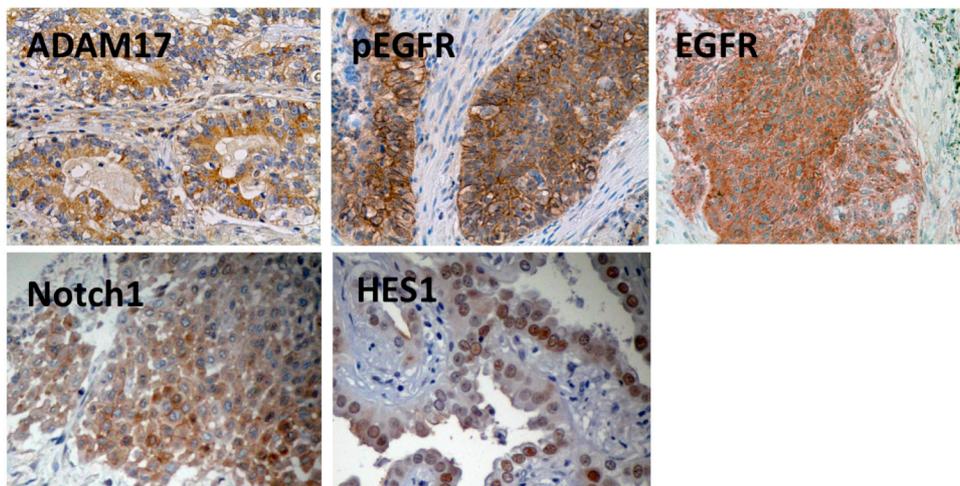
### 3.1.6. ADAM17 und Notch1 Expression in humanem Gewebe

Neben den *in vitro* Experimenten sollten auch humane Proben *in vivo* auf Hinweise einer möglichen Korrelation zwischen ADAM17, Notch1 und EGFR untersucht werden. Dafür wurden 38 NSCLC Gewebeproben (22 Adenokarzinome, 14 Plattenepithelkarzinome, 2 großzellige Bronchialkarzinom) und 8 gesunde Lungengewebeproben von Patienten untersucht. Die Biopsien, immunhistochemischen Färbungen und statistischen Auswertungen der Gewebeproben sind in Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern aus der Pathologie und Medizinischen Statistik entstanden. Insgesamt wurden alle Proben auf Expression von ADAM17, pEGFR, EGFR, Notch1 und HES1 untersucht. Während Abb. 3.20 positive Färbungen für alle Proteine zeigt, sind in Tab. 3.1 die Ergebnisse der Färbungen quantitativ zusammengefasst.

**Tab. 3.1 Expression von ADAM17, Notch1, EGFR und HES1 in humanen Lungengewebeproben**

Biopsate aus humanem gesundem Lungengewebe (Normal) und von NSCLC Proben (NSCLC) wurden fixiert, geschnitten und immunhistochemisch auf Proteinexpression von ADAM17, pEGFR, EGFR, Notch1 und HES1 untersucht. Positive Färbungen wurden anhand ihrer Intensität in 1+ bis 3+ unterschieden. Fehlende Proteinexpression wurde mit 0 bewertet. Die Tabelle zeigt die quantifizierten Resultate aus den Färbungen. p Werte wurden berechnet nach dem exakten Test nach Fisher.

IHC		0	1+	2+	3+	p
ADAM17	NSCLC % (n = 38)	0	30.6	41.7	27.8	0.012
	Normal % (n = 8)	100	0	0	0	
pEGFR	NSCLC % (n = 38)	61.1	16.7	8.3	13.9	0.259
	Normal % (n = 8)	100	0	0	0	
EGFR	NSCLC % (n = 38)	16.7	36.1	30.6	16.7	0.035
	Normal % (n = 8)	12.5	87.5	0	0	
Notch1	NSCLC % (n = 38)	47.4	44.7	7.9	0	0.710
	Normal % (n = 8)	37.5	37.5	25.0	0	
HES1	NSCLC % (n = 38)	44.7	55.3	0	0	0.015
	Normal % (n = 8)	100	0	0	0	



**Abb. 3.20 Immunhistochemie humaner Lungengewebeproben**

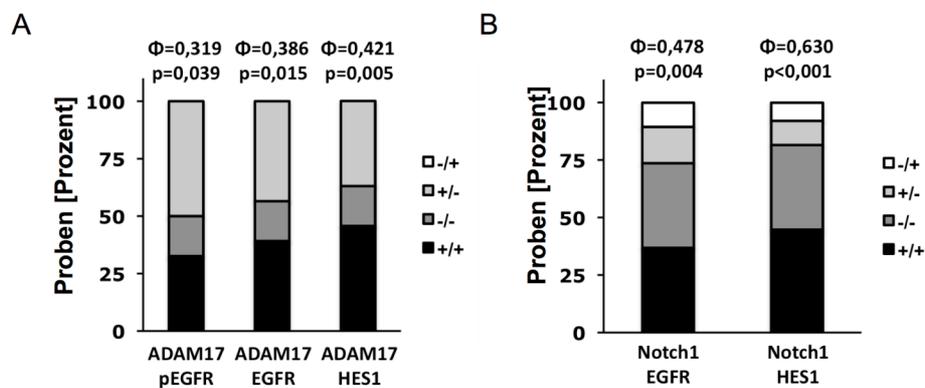
Beispiele von NSCLC Gewebeschnitte mit positiver immunhistochemischer Färbung von ADAM17, pEGFR, EGFR, Notch1 und HES1.

Besonders auffällig war, dass ADAM17 Expression nur in den NSCLC Biopsaten gefunden werden konnte, während alle gesunden Lungengewebe negativ für ADAM17 waren. Ebenfalls fand man nur in den NSCLC Proben in 38.9% (entspricht Färbeintensitäten 1+ bis 3+) der Fälle einen aktivierten EGFR (pEGFR). Normale Gewebeproben waren dagegen negativ für pEGFR. Generelle EGFR Expression konnte man Biopsaten aus beiden Gruppen beobachten. Dabei zeigten jedoch die Proben vom gesunden Lungengewebe nur eine sehr schwache EGFR Färbung (1+), während in mehr als 45% der Proben aus der NSCLC

Gruppe eine höhere Färbungsintensität (2+ bis 3+) beobachtet werden konnte. Dies entspricht einer erhöhten EGFR Expression in diesen Proben. Interessanterweise konnte bei der Expression von Notch1 kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden. Dagegen wurde aber ein Unterschied im Aktivierungsstatus des Notch Signalweges beobachtet. So konnte das Notch1 Zielgen HES1 nur in den NSCLC Proben, nicht aber in gesunden Lungenproben, detektiert werden (55.3% der Fälle).

Unabhängig von den einzelnen Gruppen, wurden alle Ergebnisse der 46 untersuchten Proben gegeneinander korreliert (Abb. 3.21A). So ergeben die Daten eine Korrelation zwischen ADAM17 und pEGFR ( $\Phi = 0.319$ ,  $p = 0.039$ ). Des Weiteren korreliert ADAM17 auch mit hoher EGFR Expression (Färbeintensität 2+ und 3+;  $\Phi = 0.386$ ,  $p = 0.015$ ) und HES1 Expression ( $\Phi = 0.421$ ,  $P = 0.005$ ). So wurde in den ADAM17 positiven Proben, in ca. 35% der Proben auch hohe EGFR Expression gefunden und in über 40% der Proben Expression von HES1.

Innerhalb der NSCLC Gruppe (Abb. 3.21B) konnten auch positive Korrelationen zwischen Notch1 und HES1 Expression gefunden werden. Über 40% der Proben sind positiv für die Expression beider Proteine ( $\Phi = 0.630$ ,  $P < 0.001$ ). In Übereinstimmung zu den in dieser Arbeit gefundenen *in vitro* Ergebnisse, korrelierten auch die Notch1 und EGFR Daten. So hat ein Drittel der NSCLC Patienten mit positiver Notch1 Proteinexpression auch sehr hohe EGFR Proteinexpression ( $\Phi = 0.478$ ,  $P = 0.004$ ).



**Abb. 3.21 Korrelation der Proteinexpression in humanen Gewebeproben**

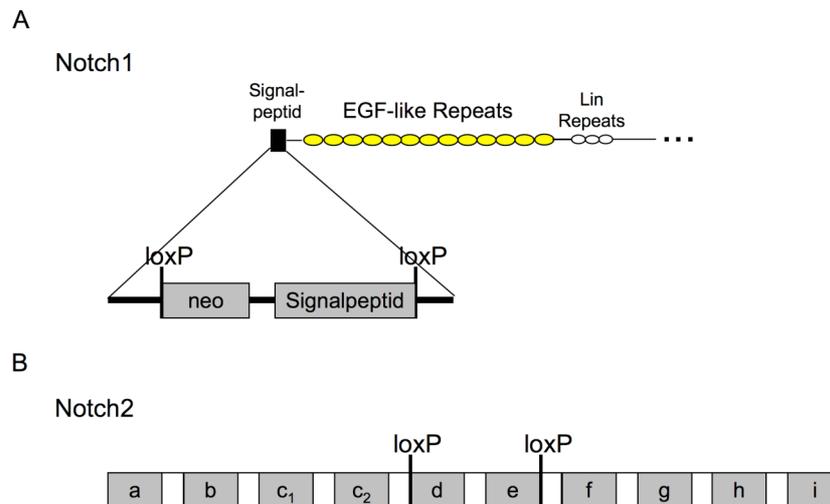
A: ADAM17 Expression wurde als positiv (+ entspricht Färbeintensität 1+ bis 3+) oder negativ (-) bewertet und in allen 46 Lungenproben korreliert mit der Expression von pEGFR (+ entspricht Färbeintensität 1+ bis 3+; - ist negative Färbung), hohen EGFR Proteinmengen (+ entspricht Färbeintensität 2+ und 3+; - entspricht Färbeintensität 0 und 1+) und HES1 (+ entspricht Färbeintensität 1+; - entspricht negativer Färbung).

B: In den 38 NSCLC Gewebeproben wurde Notch1 (+ entspricht Färbeintensität 1+ bis 3+; - ist negative Färbung) korreliert mit hohen EGFR Proteinmengen und HES1 Proteinexpression (definiert wie unter A).

Korrelationen wurden mit dem  $\Phi$ -Koeffizient quantifiziert.

### 3.2. Charakterisierung der Rolle von Notch im $Kras^{G12D}$ -induzierten Mausmodell

Die *in vitro* Daten geben Anhaltspunkte, die darauf schließen lassen, dass Notch1 in der Tumorgenese des NSCLC eine Rolle spielt. In der Tumorforschung sind jedoch Versuche in Tiermodellen unerlässlich, da diese in der Komplexität ihrer Zellverbände und Kommunikation verschiedener Zelltypen näher an der Erkrankung des Menschen sind als die zelluläre Homogenität *in vitro*. Durch die Deletion eines Proteins im lebenden Organismus erhält man wichtige Informationen über dessen Aufgabe unter physiologischen Bedingungen. Daher wurde die Funktion von Notch mit einem geeigneten Mausmodell untersucht. Ein Schwerpunkt sollte dabei sein, dass die Mikroumgebung der Tumorzellen aus normalen Zellen besteht. Diesen Kriterien entsprechen am besten konditionelle Mausmodelle, welche die *Cre/loxP* Technologie<sup>157</sup> verwenden. Dieses System gestattet eine gewebsspezifische Gen-Manipulation und macht es möglich, die Funktion von Notch *in vivo* in der Maus zu untersuchen. Neben der Rolle von Notch1, sollte in den *in vivo* Experimenten auch die Rolle von Notch2 untersucht werden, da dieser Rezeptor in einem Großteil von Lungenkarzinomzellen exprimiert wird<sup>68</sup>. Darüber hinaus wurden unterschiedliche Funktionen der einzelnen Notch Rezeptoren in verschiedenen Organen beobachtet<sup>49</sup>.



**Abb. 3.22 Schematische Darstellung der Lokalisation der *loxP* Sequenzen bei konditionellen Notch1 und Notch2 Mäusen**

A: Dargestellt ist der extrazelluläre Anteil des Notch1 Proteins mit schematischer Lokalisation der *loxP* Sequenzen. Diese flankieren das Exon für das Signalpeptid in *Notch1*. Durch Cre-vermittelte Exzision entsteht ein funktioneller *Knockout*. Neo: Neomycin-Kassette

B: Dargestellt sind die Exons des *Notch2* Gens mit den *loxP* Sequenzen, welche die Exons d und e flankieren. Durch Cre-vermittelte Exzision entsteht ein funktioneller *Knockout*.

Um den Prozess der Tumorgenese in den Mäusen zu induzieren, wurde das unter 1.6. beschriebene  $Kras^{G12D}$ -induzierte Mausmodell verwendet. Das Onkogen  $Kras^{G12D}$  als Induktor der Tumorgenese wurde mit der gleichzeitigen Deletion von Notch1

beziehungsweise Notch2 gekoppelt. Um die Notch Proteine zu deletieren, wurden bei den jeweiligen *Knockout* Mäusen unterschiedliche Strategien verfolgt. Bei der konditionellen Notch1 *Knockout* Maus flankieren *loxP* Sequenzen das Exon, welches für das Signalpeptid kodiert. Dieses ist nach der Deletion nicht mehr funktionell<sup>173</sup> (Abb. 3.22A). Durch das fehlende Signalpeptid kann keine Expression von Notch1 an der Zelloberfläche stattfinden. Bei der konditionellen Notch2 *Knockout* Maus, flankieren die *loxP* Sequenzen dagegen die Exons d bis e. Diese kodieren die RAM Domäne und die Kernlokalisationsignale. Nach der Deletion des flankierten DNA Bereichs, entsteht so ein verkürzter, nicht funktioneller Notch2 Rezeptor<sup>174</sup> (Abb. 3.22B).

In beiden Fällen wird nach Cre-vermittelter Exzision die jeweilige gefloخته Sequenz entfernt, wodurch ein funktioneller Notch1 oder Notch2 "*Knockout*" erzeugt wird. In den genetisch so veränderten Zellen entwickeln sich Kras<sup>G12D</sup>-induzierte Tumoren, die kein funktionelles Notch exprimieren. Dadurch kann die Auswirkungen der Deletion dieser Proteine auf den Phänotyp gezielt untersucht. In Tab. 3.2 ist eine Übersicht über die verwendeten Maus-Genotypen gegeben.

**Tab. 3.2 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Maus Genotypen**

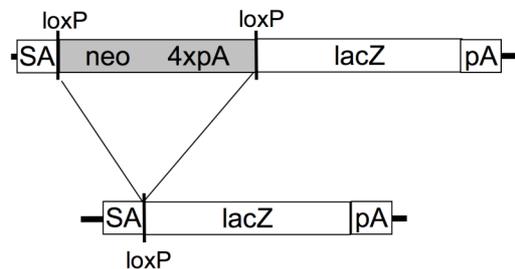
Genotyp	Kurzbezeichnung in dieser Arbeit	Beschreibung
Wildtyp	WT	Mäuse sind Kras, Notch1 und Notch2 Wildtyp
Kras <sup>G12D +/f</sup>	Kras	Mäuse tragen gefloخته Kras <sup>G12D</sup> auf einem Allel
Kras <sup>G12D +/f</sup> Notch1 <sup>ff</sup>	Kras N1 <sup>-/-</sup>	Mäuse tragen gefloخته Kras <sup>G12D</sup> auf einem Allel und gefloخته Notch1 auf beiden Allelen
Kras <sup>G12D +/f</sup> Notch2 <sup>ff</sup>	Kras N2 <sup>-/-</sup>	Mäuse tragen gefloخته Kras <sup>G12D</sup> auf einem Allel und gefloخته Notch2 auf beiden Allelen
Kras <sup>G12D +/f</sup> Notch1 <sup>ff</sup> Notch2 <sup>ff</sup>	Kras N1 <sup>-/-</sup> N2 <sup>-/-</sup>	Mäuse tragen gefloخته Kras <sup>G12D</sup> auf einem Allel und gefloخته Notch 1 und Notch2 auf beiden Allelen
Notch1 <sup>ff</sup>	N1 <sup>-/-</sup>	Mäuse haben gefloخته Notch1 auf beiden Allelen und sind Kras Wildtyp
Notch2 <sup>ff</sup>	N2 <sup>-/-</sup>	Mäuse haben gefloخته Notch2 auf beiden Allelen und sind Kras Wildtyp

Um Cre-vermittelte Deletion der *loxP* flankierten Sequenzen nur im Bronchialepithel durchzuführen, wurde ein adenoviraler Vektor verwendet, welcher Cre exprimiert<sup>175</sup>. Über nasale Applikation der Adenoviren, gelangt Cre in die Bronchialepithelzellen. Onkogenes Kras<sup>G12D</sup> wird aktiviert und gleichzeitig *Notch1* und/oder *Notch2* deletiert. Andere Organe sind

nicht von der Infektion mit Adenoviren und damit einhergehenden Rekombinationsereignissen, betroffen. Zusätzlich werden durch das Virus nicht alle Zellen des Bronchialepithels infiziert. So sind Zellen mit erfolgter Deletion der *loxP* flankierten Sequenzen von Zellen umgeben, in denen die Deletion nicht stattfinden konnte. Dadurch ist eine gesunde, normale Mikroumgebung der Tumorzellen gewährleistet.

### 3.2.1. Molekularbiologische Überprüfung der Cre-vermittelten Exzision

Für alle Experimente war es von entscheidender Bedeutung, dass die Cre-Rekombinase tatsächlich in den Epithelzellen des Lungengewebes exprimiert wird, um dort die *loxP* flankierten DNA-Sequenzen zu deletieren. Um das zu testen, wurden Rosa26 *LacZ* Reporter Mäuse verwendet. Bei diesen Mäusen steht das *lacZ* Gen unter der Kontrolle des endogenen Rosa26 Promotors<sup>176</sup> (Abb. 3.23). Vor dem offenen Leserahmen des *lacZ* Gens befindet sich eine Neomycin Expressionskassette, welche von *loxP* Sequenzen flankiert ist und somit gleichzeitig als transkriptionelle Stop-Sequenz fungiert. Erst durch Cre-vermittelte Exzision wird die Stopp-Sequenz entfernt und die  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert. Eine erfolgreiche Rekombination kann anschließend mittels chromogener Substanzen, wie X-Gal, im Gewebe nachgewiesen werden.

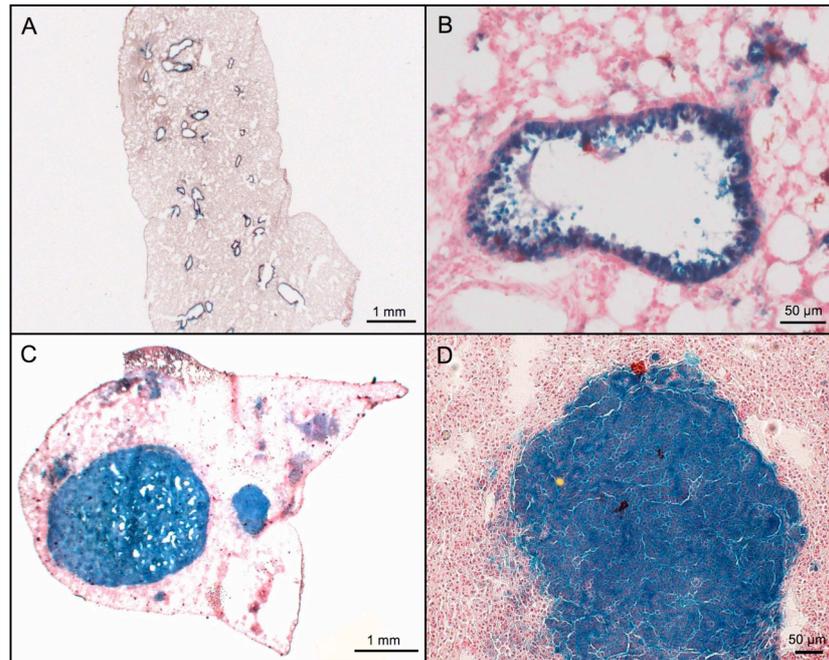


**Abb. 3.23 Schematische Darstellung der Lokalisation der *loxP* Sequenzen im *lacZ* Gen**

Cre vermittelte Exzision der geflochtenen Neomycin (neo) – Stoppkassette führt zur Expression der  $\beta$ -Galaktosidase unter dem Rosa26 Promotor. pA: poly-Adenylierungssignal, SA: Splice Akzeptanz Sequenz

Zur experimentellen Überprüfung Cre-vermittelter Exzision wurden die Rosa26 *LacZ* Mäuse mit einer hohen Dosis AdCre ( $2 \times 10^8$  PFU) behandelt und nach 72h sezirt. In Abb. 3.24 ist die X-Gal Färbung von Lungengewebe dargestellt. Gut zu erkennen ist die Blaufärbung (positive X-Gal Färbung) im Bronchialepithel (Abb. 3.24A). In diesen Zellen fand eine Cre-vermittelte Exzision der Stopp-Sequenz (s.o.) statt und  $\beta$ -Galaktosidase konnte exprimiert werden. In der Vergrößerung (Abb. 3.24B) ist gut zu erkennen, dass das Adenovirus jede Epithelzelle der Bronchien infiziert hat und die Cre tatsächlich in diesen Zellen exprimiert wurde. Das umliegende Gewebe (Alveolen) wurde dagegen nicht infiziert und es fand hier keine Rekombination der geflochtenen Allele statt.

Auch bei den Lungentumoren, welche in den Mäusen gewachsen sind, lässt sich mittels X-Gal Färbung untersuchen, ob in den Tumoren Rekombinationsprozesse stattgefunden haben. Dafür wurden *Kras N1<sup>-/-</sup>* und *Kras N2<sup>-/-</sup>* Mäuse mit den *Rosa26 LacZ* Mäusen gekreuzt und nach Sektion Gefrierschnitte mit X-Gal angefärbt (Abb. 3.24C+D). Die gut abgegrenzte Blaufärbung der Tumoren, gegenüber dem nicht gefärbten Normalgewebe zeigt, dass das Tumorstadium tatsächlich durch die Rekombination der konditionellen Allele hervorgerufen wurde.



**Abb. 3.24 Nachweis der Cre-Aktivität durch X-Gal Färbung**

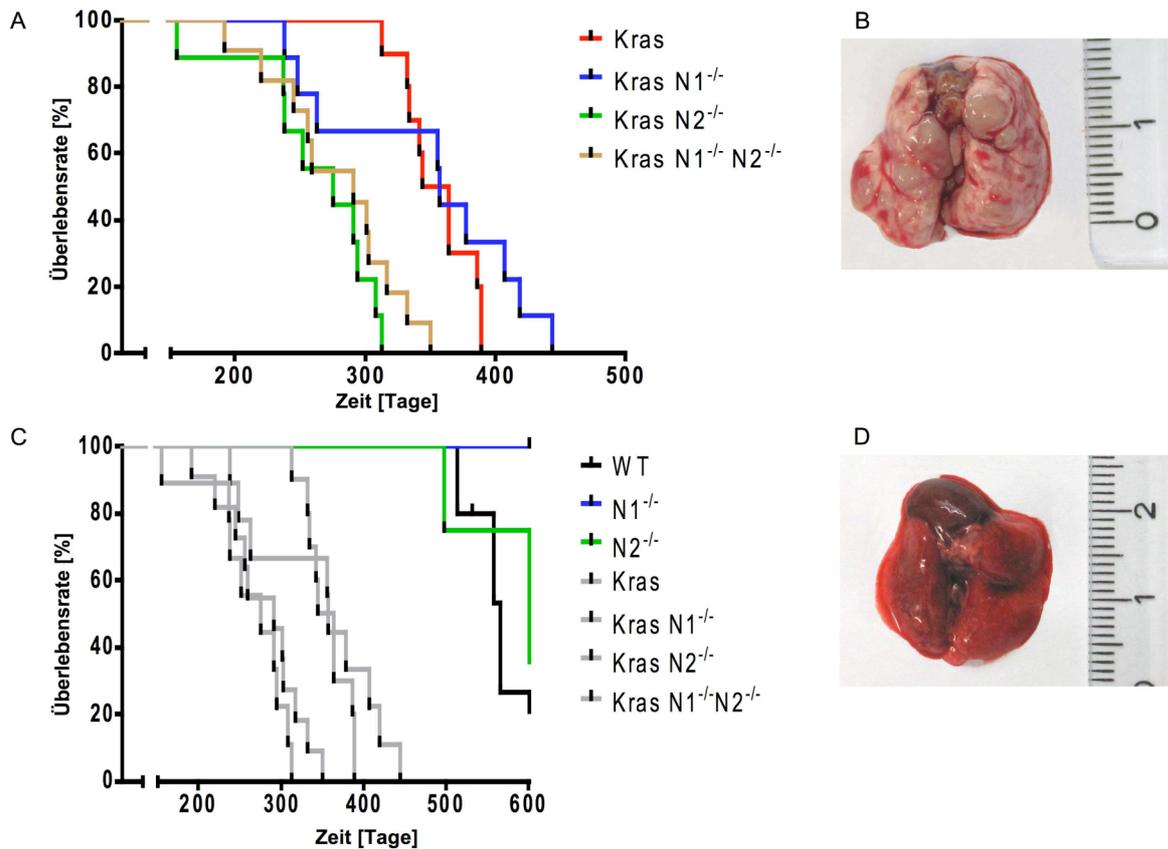
Von *Rosa26 LacZ<sup>flf</sup>* Mäusen wurde nach Sektion Gefrierschnitte angefertigt und mit X-Gal gefärbt. Blaue Bereiche kennzeichnen  $\beta$ -Galaktosidase positive, durch Rekombination von *lacZ*, entstandene Bereiche.

A+B: *Rosa26 LacZ<sup>flf</sup>* Mäuse 72h nach AdCre Administration mit  $2 \times 10^8$  PFU AdCre.

C+D: *Kras N1<sup>-/-</sup>N2<sup>-/-</sup>* *Rosa26 LacZ<sup>flf</sup>* Maus, Sektion wegen starker Krankheitssymptome,  $1 \times 10^6$  PFU AdCre.

### 3.2.2. Notch2 Expression beeinflusst das Überleben

Um den Einfluss von Notch auf das Überleben der Mäuse zu testen, wurde in 4-8 Wochen alten Tieren aller Genotypen, die Tumorgenese durch AdCre Gabe induziert. Die Mäuse wurden zu dem Zeitpunkt getötet, als sie schwere Krankheitssymptome aufwiesen. Zu diesen zählten Verhaltensauffälligkeiten wie gekrümmte Haltung, Gewichtsreduktion und respiratorischer Stress als Folge verminderten Gasaustauschs in der Lunge. In den Lungen konnten makroskopisch bereits viele Tumoren beobachtet werden (Abb. 3.25B).



**Abb. 3.25 Die verschiedenen Genotypen zeigen Unterschiede beim Überleben**

Die Tumorgenese wurde durch Applikation von  $1 \times 10^6$  PFU AdCre induziert und gewartet bis die Mäuse krankheits- oder altersbedingt verstarben.

A: Kaplan-Meier Kurve der Kras, Kras N1<sup>-/-</sup>, Kras N2<sup>-/-</sup> und Kras N1<sup>-/-</sup>N2<sup>-/-</sup> Mäuse

B: Repräsentative Lunge einer Kras N2<sup>-/-</sup> Maus

C: Kaplan-Meier Kurve der WT, N1<sup>-/-</sup> und N2<sup>-/-</sup> Mäuse. Die anderen Genotypen (s. Abb. 3.25A) wurden als Vergleich in grau dargestellt.

D: Repräsentative Lunge einer Kras N2<sup>-/-</sup> Maus

In Abb. 3.25 sind die Überlebenskurven der Mäuse dargestellt. Das mediane Überleben der Kras<sup>G12D</sup> (Kras) Mäuse lag bei 354 Tagen (rote Kurve). Die Kras<sup>G12D</sup> Mäuse mit Notch1 Deletion (Kras N1<sup>-/-</sup>) (blaue Kurve) zeigten keinen signifikanten Unterschied, ihr medianes Überleben lag bei 357 Tagen. Im Gegensatz dazu hatte die Notch2 Deletion (Kras N2<sup>-/-</sup>) eine signifikante Auswirkung. Diese Tiere starben im Schnitt bereits nach 272 Tagen (grüne Kurve). Mäuse mit Deletion von Notch1 und Notch2 (Kras N1<sup>-/-</sup>N2<sup>-/-</sup>), starben wie die Kras N2<sup>-/-</sup> Mäuse sehr früh, das mediane Überleben lag bei nur 291 Tagen. Dagegen hatten Mäuse mit Notch1 (N1<sup>-/-</sup>) und Notch2 (N2<sup>-/-</sup>) Deletion, die kein mutiertes Kras tragen, eine weitgehend normale Lebenserwartung im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (WT). Sie starben signifikant später (Abb. 3.25C) und meist aus altersbedingten Gründen. Bei keiner dieser

Mäuse konnten Krankheitssymptome beobachtet werden, die auf ein Lungenkarzinom schließen lassen. Auch waren die Lungen frei von Tumoren (Abb. 3.25D).

Deletion von Notch1 und Notch2 scheinen demnach in diesem Mausmodell, nur in Kombination mit mutiertem Kras, einen Einfluss auf die Tumorgenese des Lungenkarzinoms zu haben. Alleine haben sie möglicherweise keine tumorbegünstigende oder tumorsuppressive Funktion. In Tab. 3.3 sind alle Überlebensdaten zusammengefasst.

**Tab. 3.3 Zusammenfassung der Daten aus den Überlebensexperimenten**

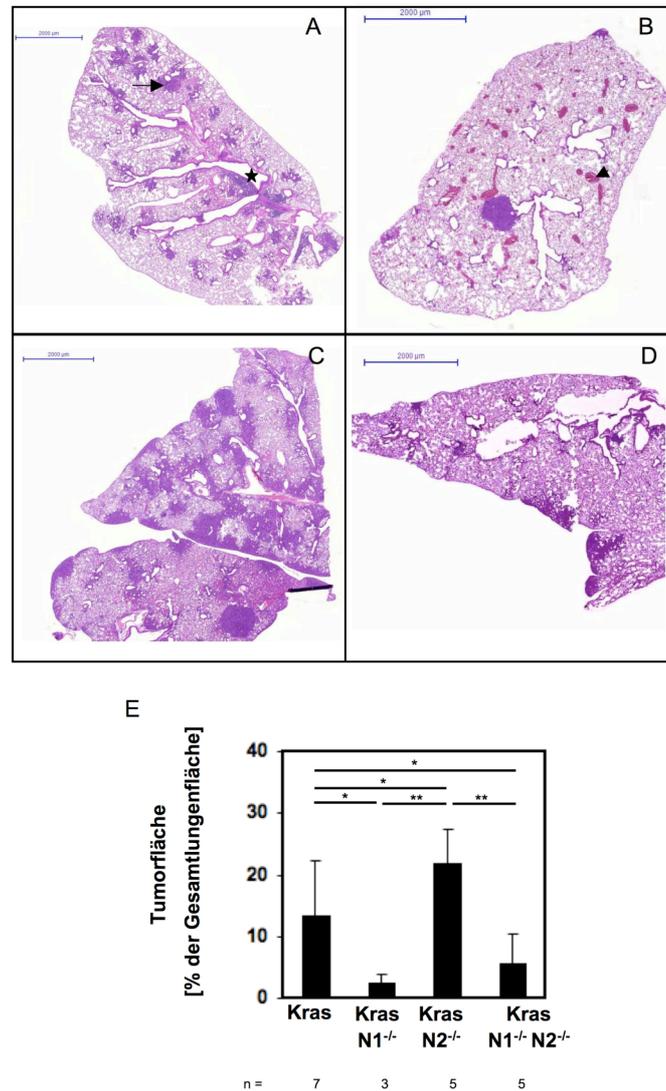
Genotyp	Anzahl der Mäuse	medianes Überleben [Tage]	p (gegenüber Kras)
Kras	10	354	
Kras N1 <sup>-/-</sup>	9	357	= 0,3792
Kras N2 <sup>-/-</sup>	8	271.5	< 0,0001
Kras N1 N2 <sup>-/-</sup>	11	291	= 0,004
WT	5	524	0,0007
N1 <sup>-/-</sup>	4	603	0,0022
N2 <sup>-/-</sup>	5	694	0,0022

### 3.2.3. Analyse der Größe der Tumorareale

Um weitere phänotypische Unterschiede zwischen den Genotypen zu finden, wurden Mäuse 6 Monaten nach Tumorinduktion (AdCre Applikation) analysiert. Dafür wurden die Mäuse sezert, die Lungen in Paraffin eingebettet und anschließend mit einem Mikrotom in 4µm dicke Scheiben geschnitten. Auf einem Objektträger fixiert, konnten diese Schnitte nun immunhistochemisch und mittels HE-Färbung analysiert werden. Die HE-Färbung dient dabei als Übersichtsfärbung, um morphologische Unterschiede in der Lunge sichtbar zu machen.

In Abb. 3.26 sind HE-Färbungen der Lunge der verschiedenen Genotypen 6 Monate nach Tumorinduktion dargestellt. Der größte Teil jedes Lungenschnitts besteht hier aus gesundem Lungengewebe. Dieses erscheint wie ein feinmaschiges Netz und besteht aus dünnwandigen Alveolen. Unterbrochen wird das Netz durch Kapillare, Bronchien und Bronchiolen. Abnorme Gewebmassen (Tumoren) sind ebenfalls im Lungengewebe zu sehen. Hierbei handelt es sich um dunkel gefärbte, solide Zellverbände. Diese veränderten Bereiche (hier allgemein bezeichnet als Tumorfläche) wurden computergestützt quantifiziert und in Prozent auf die Gesamtlungenfläche berechnet (Abb. 3.26E). Gegenüber Kras Mäusen, welche ~14% Tumorfläche nach 6 Monaten aufweisen, führt die Notch1 Deletion (Kras N1<sup>-/-</sup>) zu einer signifikanten Verringerung der Tumorfläche auf ca. 3% (p = 0,01). Kras N2<sup>-/-</sup> Mäuse hingegen, haben mit ~22% Tumorfläche nach 6 Monaten signifikant mehr

Tumorgewebe in den Lungen ( $p = 0,02$ ). Die  $Kras N1^{-/-}N2^{-/-}$  Tiere liegen bei 6% Tumorfläche und befinden sich damit zwischen den  $Kras$  und  $Kras N1^{-/-}$  Mäusen.



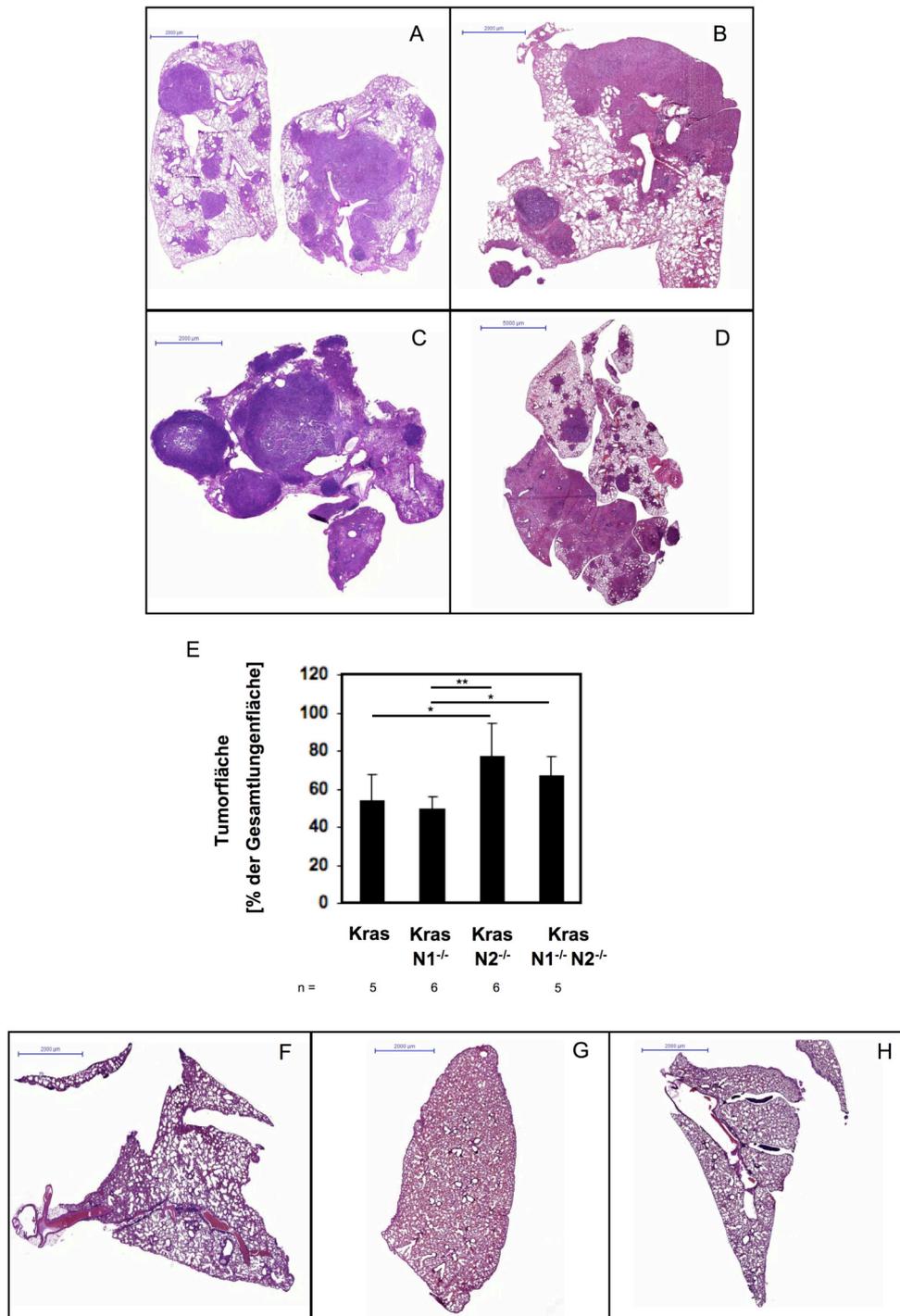
**Abb. 3.26 Analyse der Tumorflächen in der Lunge 6 Monate nach Induktion**

A-D: Repräsentative Übersicht von Lungenschnitten von (A)  $Kras$ , (B)  $Kras N1^{-/-}$ , (C)  $Kras N2^{-/-}$  und (D)  $Kras N1^{-/-}N2^{-/-}$  Mäusen 6 Monate nach Tumorinduktion. Die Lungen wurden fixiert und in Paraffin eingebettet. 4  $\mu m$  dicke Schnitte wurden anschließend mittels HE-Färbung gefärbt um morphologische Unterschiede sichtbar zu machen. Pfeil: Tumor, Pfeilspitze: Kapillare, Stern: Bronchie

E. Computergestützte Quantifizierung der Tumorfläche in % zur Gesamtlungenfläche der oben genannten Genotypen. Pro Maus wurde 2 Schnittebenen der Lunge analysiert und die Werte zusammengefasst.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$

Bei Mäusen, die aufgrund von Krankheitssymptomen seziiert und analysiert wurden, zeigte sich eine erhebliche Zunahme der relativen Tumorflächen (Abb. 3.27). Die  $Kras N1^{-/-}$  Mäuse wiesen keinen Unterschied zu den  $Kras$  Mäusen auf. Die Tumorfläche bei beiden Genotypen liegt bei jeweils ~50% (Abb. 3.27E).



**Abb. 3.27 Analyse der Tumorflächen in der Lunge zum terminalen Zeitpunkt**

A-D: Repräsentative Übersicht der Lungenschnitte von (A) Kras, (B) Kras N1<sup>-/-</sup>, (C) Kras N2<sup>-/-</sup> und (D) Kras N1<sup>-/-</sup>N2<sup>-/-</sup> Mäusen, die krankheitsbedingt getötet werden mussten. Die Lunge wurde fixiert und in Paraffin eingebettet. 4 µm dicke Schnitte wurden mittels HE-Färbung gefärbt um morphologische Unterschiede sichtbar zu machen.

E: Computergestützte Quantifizierung der Tumorfläche in % zur Gesamtlungenfläche der oben genannten Genotypen.

F-H: Repräsentative Übersicht der HE-Färbung der Lunge von (F) WT, (G) N1<sup>-/-</sup> und (H) N2<sup>-/-</sup> Mäusen

\*p < 0.05, \*\*p < 0.005

Die Kras N2<sup>-/-</sup> Mäuse haben mit 75% einen signifikant höheren Anteil der Tumorphäche an der Lunge und auch in den Kras N1<sup>-/-</sup>N2<sup>-/-</sup> Mäusen, ist die Fläche mit 65% größer als bei Kras und Kras N1<sup>-/-</sup> Tieren. Dabei ist es wichtig zu beachten, dass die Kras N2<sup>-/-</sup> und Kras N1<sup>-/-</sup>N2<sup>-/-</sup> Mäuse im Schnitt 3 Monate kürzer lebten, also die größere Tumorphäche sich auch in kürzerer Zeit bildete, als bei den beiden anderen Genotypen.

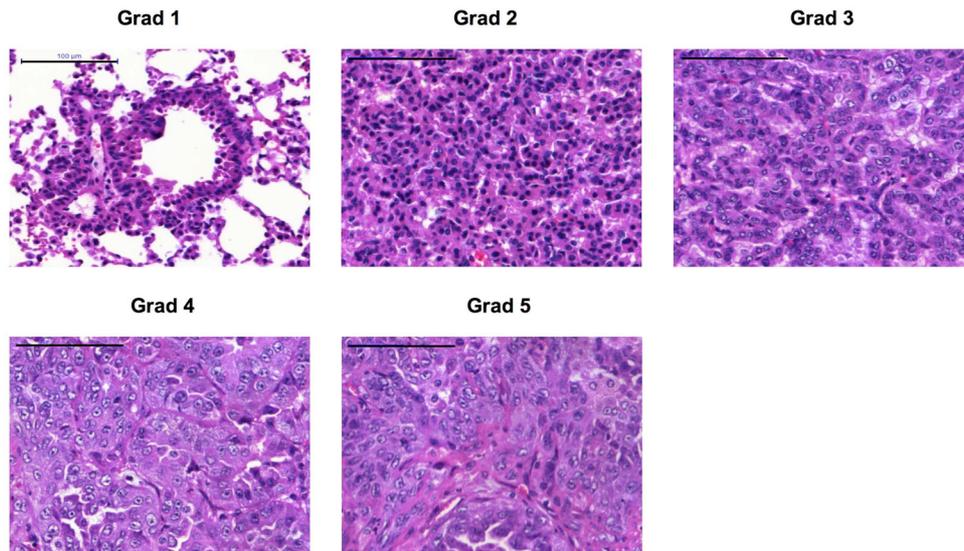
WT, N1<sup>-/-</sup> und N2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten dagegen mikroskopisch kein verändertes Lungengewebe (Abb. 3.27F-H).

### 3.2.4. Analyse der Tumordifferenzierung

Es konnte gezeigt werden, dass die Notch Signaltransduktion in vielen Organen eine Funktion in der Differenzierung von Zellen hat<sup>13</sup>. So induziert Notch1 die Differenzierung der Zellen in primären Keratinozyten<sup>48</sup>, während Notch2 die Differenzierung von Myofibroblasten zu Myoblasten reguliert<sup>177</sup>. Auch für die Diagnose eines Lungenkarzinoms beim Menschen ist die Tumordifferenzierung beziehungsweise das Differenzierungsstadium von hoher prognostischer Bedeutung<sup>178</sup>. Damit beschreibt man die morphologische Ähnlichkeit eines Tumors, zu dem Gewebe, aus dem er stammt. Dabei haben Patienten mit Tumoren in einem guten histologischen Differenzierungsgrad eine bessere Prognose als solche mit schlechter differenzierten Tumoren.

Aufgrund der Verbindung zwischen Notch und der Differenzierung von Zellen, wurden die einzelnen Tumoren der verschiedenen Genotypen hinsichtlich ihrer Differenzierung untersucht. Dabei wurde ein Bewertungsschema verwendet, welches für diesen Zweck aus der Gruppe von Tyler Jacks entwickelt wurde<sup>156</sup>. Dieses Bewertungsschema teilt die Tumoren auf einer Skala von Grad 1 bis Grad 5 ein (G1-G5). G5 Tumoren sind dabei die am meisten fortgeschrittenen und stärksten entdifferenzierten Tumoren. Die genauen Kriterien der einzelnen Grade sind in Kapitel 2.8.8. beschrieben. Abb. 3.28 zeigt Beispiele der einzelnen Stadien in der Lunge von Kras Mäusen.

Bei vielen Mäusen konnten multiple Tumoren, die von gut differenziert bis entdifferenziert reichten, in der Lunge entdeckt werden. Zudem wurden manchmal sogar innerhalb eines einzelnen Tumors unterschiedliche Differenzierungsgrade beobachtet, wobei man sich bei der Beurteilung dieser Tumoren an dem Befund mit der am stärksten abweichenden Zellmorphologie orientierte. Beim Menschen dagegen sind keine verschiedenen Tumorstadien zu sehen. Man hat hier zumeist nur das normale Lungengewebe bzw. das Karzinom.



**Abb. 3.28 Darstellung der Tumordifferenzierungsgrade in einer konditionellen  $Kras^{G12D}$  Maus**

Mittels HE-Färbung gefärbte Lungenschnitte wurden auf das Vorhandensein von Tumoren untersucht, und diese anschließend aufgrund ihrer Morphologie in ein definiertes Bewertungsschema einem Tumordgrad zugeordnet. Auf einer Skala von 1 bis 5, mit Grad 5 Tumoren als die am weitesten fortgeschritten und am schlechtesten differenzierten Tumoren<sup>156</sup>.

A: G1 Tumor mit Anfängen eines soliden Bereichs (Hyperplasie), Zellkerne sind uniform ohne Atypien.

B: G2 Tumor mit uniformen, teilweise leicht vergrößerten Zellkernen mit sichtbaren Nukleoli.

C: G3 Tumor mit pleiomorphen, vergrößerten Zellkernen mit sichtbaren Nukleoli und nukleären Verformungen.

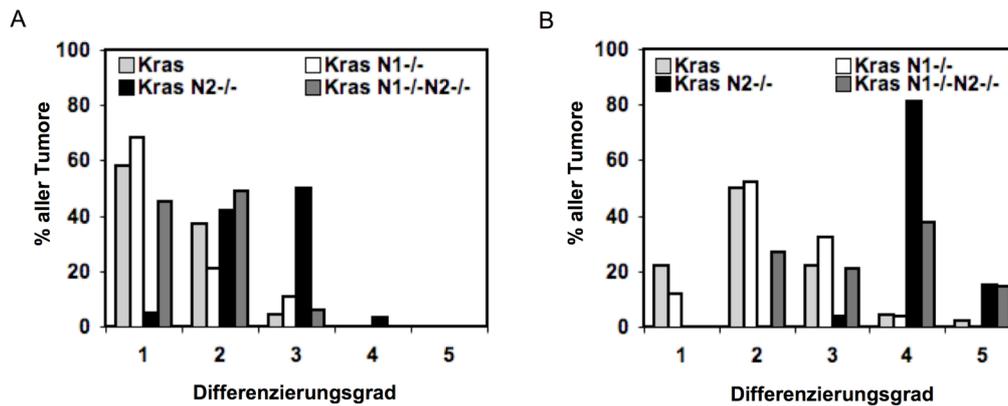
D: G4 Tumor mit pleiomorphen, vergrößerten Zellkernen, nukleäre Atypien, abnorme Mitosen und vielkernigen Riesenzellen.

E: G5 Tumor mit Kriterien wie G4 Tumoren und zusätzlich stromalen Desmoplasien.

Balkenlänge entspricht 100 µm

In Abb. 3.29 ist die Quantifizierung der Tumoren in Abhängigkeit zu ihrem Differenzierungsgrad dargestellt. Nach 6 Monaten (Abb. 3.29A) waren bei den  $Kras$ ,  $Kras N1^{-/-}$  und  $Kras N1^{-/-}N2^{-/-}$  Mäusen hauptsächlich G1 und G2 Tumoren, also gut differenzierte Tumoren, zu sehen. Weniger als 10% der Tumoren dieser Genotypen konnten dem G3 Stadium zugeordnet werden. Bei den  $Kras N2^{-/-}$  Mäusen waren die Tumoren dagegen bereits zu diesem Zeitpunkt insgesamt schlechter differenziert. Über 90% der Tumoren waren als G2 oder G3 und 3% sogar als G4 einzustufen.

Bei den Mäusen aus den Überlebensexperimenten waren die Tumoren insgesamt schlechter differenziert (Abb. 3.29B). So war der Großteil der Tumoren der  $Kras$  und  $Kras N1^{-/-}$  Mäuse als G2 und G3 einzustufen. Bei  $Kras N1^{-/-}N2^{-/-}$  Mäusen waren gleichmäßig sowohl besser differenzierte, als auch schlechter differenzierte Tumoren zu beobachten. Die  $Kras N2^{-/-}$  Mäuse hingegen hatten zu 81% G4 Tumoren und zu einem kleinen Teil auch G5 Tumoren. Die Notch2 Deletion scheint daher, im Gegensatz zu Notch1, die Differenzierung dieser Tumoren stark zu beeinflussen.



**Abb. 3.29 Quantifizierung des Tumordifferenzierungsgrad**

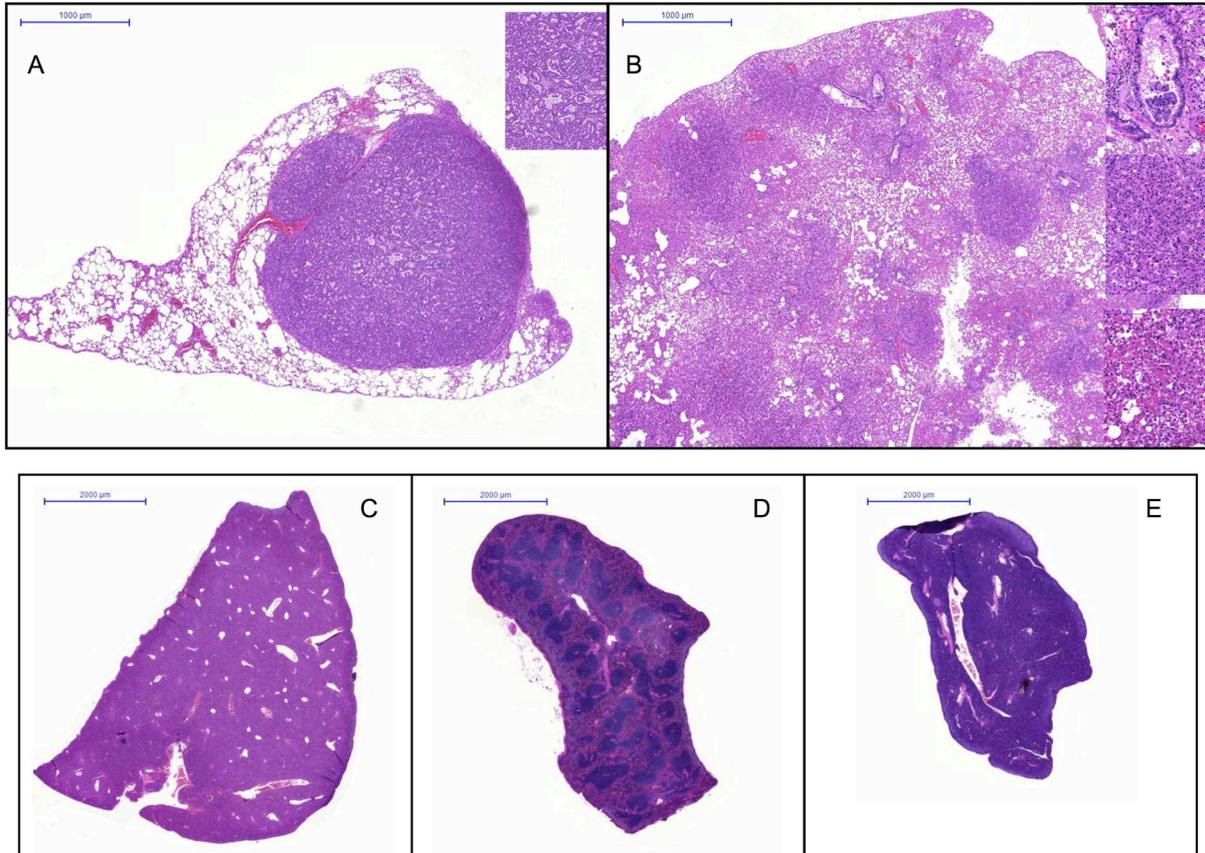
Die Tumoren von Mäusen aller Genotypen wurden nach Sektion auf HE-gefärbten Schnitten auf ihren morphologischen Phänotyp untersucht und in das Bewertungsschema ihrem Differenzierungsgrad entsprechend eingeordnet. Die Abb. zeigt die Quantifizierung der Tumoren jeden Grades in Prozent auf die Gesamtanzahl der untersuchten Tumoren.

A: Tumorgewebe von Mäusen die 6 Monate nach Tumorinduktion seziiert wurden.

B: Tumorgewebe von Mäusen aus den Überlebensexperimenten, d.h. Sektion zum terminalen Überlebenszeitpunkt.

### 3.2.5. Notch2 Deletion führt zu Unterschieden in der Tumormorphologie

Neben den schlechter differenzierten Tumoren, die in den *Kras N2<sup>-/-</sup>* Mäusen zu finden sind, gibt es weitere morphologische Unterschiede, welche diesen Genotyp von den anderen Genotypen abgrenzt. Sowohl die *Kras* Tumoren, als auch *Kras N1<sup>-/-</sup>* Tumoren zeigten größtenteils tubuläre Strukturen (Abb. 3.30A; siehe auch Vergrößerung). Bei den *Kras N2<sup>-/-</sup>* Mäusen (Abb. 3.30B) waren tubuläre Strukturen dagegen nicht zu beobachten (mittlere Vergrößerung). Ein weiterer Unterschied war, dass in der Lunge von *Kras N2<sup>-/-</sup>* Mäusen, im Gegensatz zu den anderen Genotypen, großflächige entzündete Bereiche mit Lymphozyten und Makrophageninfiltraten zu sehen waren (Abb. 3.30B – untere Vergrößerung). Die Entzündungen sind möglicherweise durch Sekretretention und konsekutiver Retentionspneumonien bedingt. Mögliche Ursachen dafür sind die beobachtete Invasion der Tumorzellen in die Bronchien (Abb. 3.30B – obere Vergrößerung), sowie eine mögliche Kompression von Bronchien durch große Tumoren. Weiterhin wurden Leber, Milz und Pankreas auf Metastasen untersucht. Diese sind jedoch ohne Befund (Abb. 3.30 C-E).



**Abb. 3.30 Morphologie der Tumoren**

HE-gefärbte Schnitte der Lunge wurden auf morphologische Unterschiede untersucht.

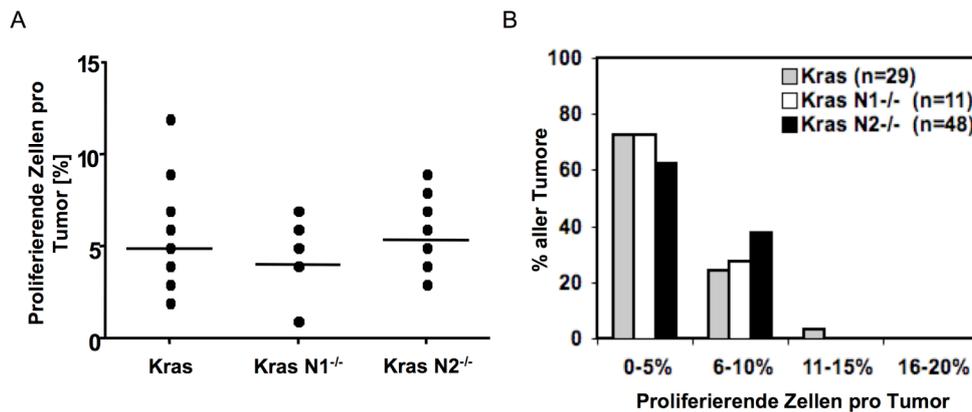
A: Kras Mäuse aus den Überlebensexperimenten, Einsatz: Vergrößerung des Tumors

B: Kras  $N2^{-/-}$  Maus aus der Überlebenskurve. Obere Vergrößerung: infiltrierter Bronchus, mittlere Vergrößerung: Vergrößerung eines Tumors, untere Vergrößerung: entzündetes Lungengewebe.

Untersuchung von (C) Leber, (D) Milz und (E) Pankreas in Kras  $N2^{-/-}$  Mäusen auf Metastasen.

### 3.2.6. Analyse der Proliferation

Proliferation von Tumorzellen ist ein weiteres Kriterium um Tumoren zu beschreiben, wobei stärker proliferierende Tumoren als aggressiver gelten. Um die Proliferationsrate zu bestimmen, wurde immunhistochemisch die Expression von Ki67 untersucht. Dies ist ein nukleäres Antigen, welches im ersten Teil der Interphase bis zur Mitosephase des Zellzyklus exprimiert wird<sup>179</sup>. Unter dem Postulat einer konstanten Teilungsrate kann man damit den dynamischen Prozess der Zellteilung sichtbar machen. Die Ki67-positiven Zellen wurden computergestützt detektiert und in Prozent auf alle Zellen eines Tumors berechnet. Bei der Quantifizierung dieser Ki67-positiven Zellen zeigte sich, dass es 6 Monate nach Tumorinduktion (Abb. 3.31) keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tumoren der einzelnen Genotypen gab. Die meisten Tumoren hatten einen medianen Wert von ca. 5% proliferierender Zellen (Abb. 3.31A). Bei einer Einteilung der Tumoren in Gruppen sieht man jedoch, dass die Kras  $N2^{-/-}$  Tumoren geringfügig stärker proliferierten (Abb. 3.31B).



**Abb. 3.31 Analyse der Proliferationsrate der Tumoren 6 Monate nach Induktion**

Die Lungen von Mäusen aller Genotypen wurden nach der Sektion fixiert und in Paraffin eingebettet. 4 µm dicke Schnitte wurden mit einem spezifischen Antikörper auf die Expression von Ki67 untersucht.

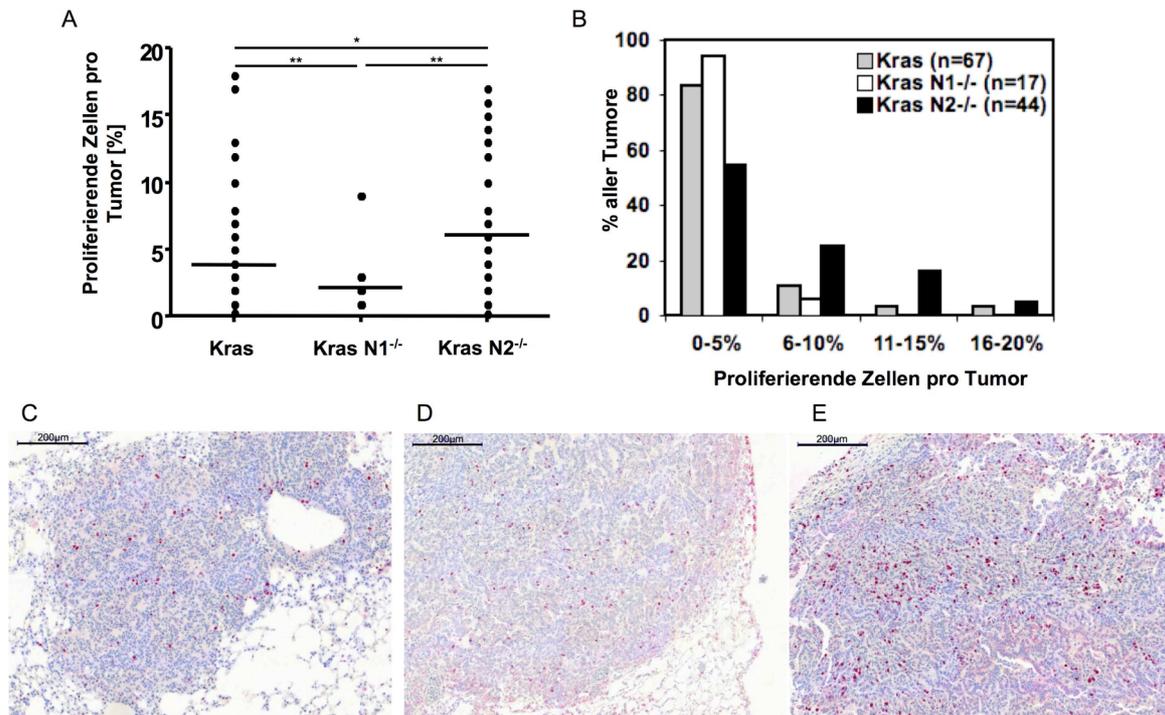
A: Der Anteil der Ki67 – positiven Zellen an der Gesamtzellzahl eines Tumors wurde computergestützt quantifiziert. Die Darstellung zeigt den Box Plot der Ergebnisse und den medianen Wert jeden Genotyps.

B: Zuordnung aller Tumoren eines Genotyps zu verschiedenen Gruppen ihrer Proliferationsrate entsprechend. Die Abb. zeigt die Quantifizierung der Tumoren einer Proliferationsrate in Prozent an der Gesamtanzahl der untersuchten Tumoren eines Genotyps.

Allerdings gab es bei den Mäusen aus den Überlebensexperimenten signifikante Unterschiede in der Ki67 Expression (Abb. 3.32).

Der mediane Wert der Ki67-positiven Zellen in den Kras N2<sup>-/-</sup> Mäusen lag bei 6,0% und war damit signifikant höher als bei den Kras Mäusen. Diese hatten nur ca. 3,8% Ki67-positive Zellen pro Tumor. Bei den Kras N1<sup>-/-</sup> Mäusen war der mediane Wert dagegen mit 2,1% signifikant niedriger.

Bei einer genaueren Aufschlüsselung der Tumoren und Zuordnung in Gruppen (Abb. 3.32B) fällt auf, dass über 80% der Tumoren bei den Kras und Kras N1<sup>-/-</sup> Mäusen maximal 5% proliferierende Zellen hatten. Dagegen waren in dieser Gruppe nur die Hälfte der Tumoren aus Kras N2<sup>-/-</sup> Mäusen. Die andere Hälfte der Tumoren dieses Genotyps hatte teilweise sogar bis zu 20% Ki67–positive Zellen. Die Notch2 Deletion, führt demnach in einigen Tumoren zu verstärkter Proliferation, während Notch1 defiziente Tumoren eine eher geringere Proliferation zeigten.



### Abb. 3.32 Analyse der Proliferationsrate der Tumoren zum terminalen Zeitpunkt

Die Lungen von Mäusen aller Genotypen wurden nach Sektion fixiert und in Paraffin eingebettet. 4 µm dicke Schnitte wurden mit einem spezifischen Antikörper auf die Expression von Ki67 untersucht.

A: Der Anteil der Ki67-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl eines Tumors wurde computergestützt quantifiziert. Die Darstellung zeigt den Box Plot der Ergebnisse und den medianen Wert von jedem Genotyp. \*p<0,05  
\*\*p<0,005

B: Zuordnung aller Tumoren eines Genotyps zu verschiedenen Gruppen ihrer Proliferationsrate entsprechend. Die Abb. zeigt die Quantifizierung der Tumoren einer Proliferationsrate in Prozent an der Gesamtanzahl der untersuchten Tumoren eines Genotyps.

C-E: Darstellung eines repräsentativen Tumors einer (C) Kras, (D) Kras N1<sup>-/-</sup> und (E) Kras N2<sup>-/-</sup> Maus. Zellen mit positiver Ki67 Expression werden durch die IHC rot gefärbt.

## 4. Diskussion

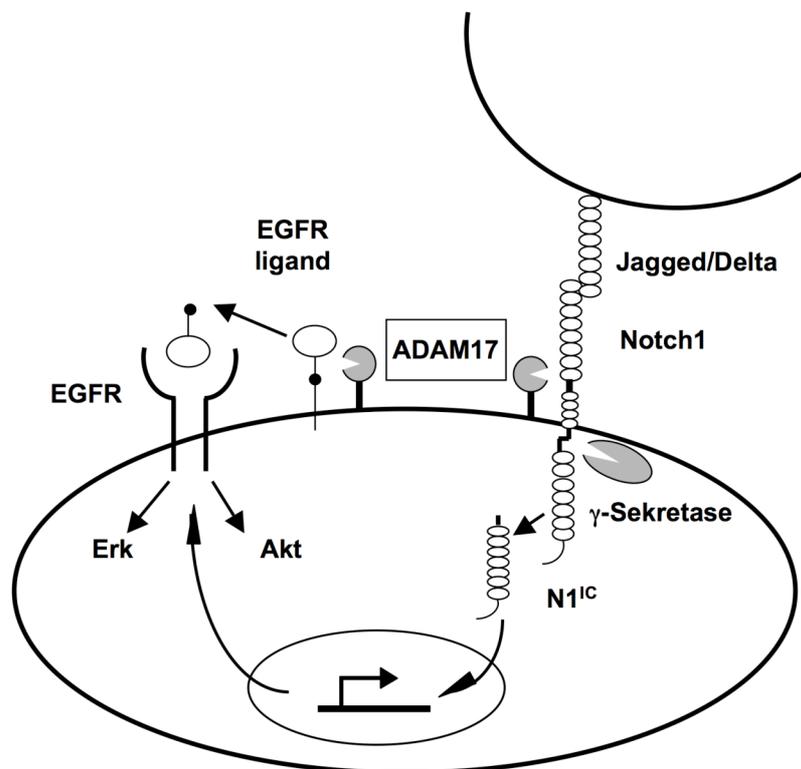
Jede vierte Person in Deutschland stirbt an Krebs (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2009), wobei das Lungenkarzinom die häufigste Krebstodesursache bei Männern und Frauen in Deutschland und auch weltweit ist. Ein Lungenkarzinom entsteht durch maligne Entartung und autonome Proliferation des Bronchialepithels. Betroffen sind dabei vor allem Raucher (85%), da die im Tabakrauch enthaltenen Karzinogene als Hauptauslöser des Lungenkarzinoms gelten<sup>4</sup>. Trotz der Erforschung therapeutischer und diagnostischer Ansätze ist die Prognose und 5-Jahr Überlebenswahrscheinlichkeit weiterhin sehr schlecht. Von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapiestrategien ist dabei das Verständnis der molekularbiologischen Pathomechanismen die zur Entstehung der Lungenkarzinome führen.

Neben anderen Signalwegen wird vor allem die EGFR-abhängige Signaltransduktion mit der Transformation und Tumorgenese des NSCLC in Zusammenhang gebracht. Dabei wird besonders die ADAM17 vermittelte Prozessierung der EGFR Liganden im NSCLC und auch in anderen Tumoren epithelialer Herkunft benötigt<sup>81,111,116,117</sup>. Durch die Aktivierung von Notch1 und der daraus resultierenden Regulation des EGFR wird ADAM17 zudem zu einem kritischen Regulator für die Tumorgenese, Proliferation und das Überleben der Zellen. Die vorliegende Arbeit beschreibt daher eine relevante Rolle von ADAM17 im NSCLC. In Abb. 4.1 sind die in dieser Arbeit untersuchten ADAM17 vermittelten Prozesse in NSCLC Zellen zusammengefasst und graphisch dargestellt. Aufgrund dieser Daten rückte die Rolle der Notch Signaltransduktion mehr in den Fokus der Arbeit.

Der Notch Signalweg ist ein evolutionär sehr konservierter Signalweg, der aufgrund seiner breitgefächerten Funktion in der Kontrolle fundamentaler Aspekte der Zellentwicklung, ein klassisches Beispiel für Zellschicksalsentscheidungen ist. Seit langem ist bekannt, dass Mutationen in Molekülen die über das Zellschicksal entscheiden, onkogenes Potential besitzen. Dies konnte z.B. für die Fibroblasten Wachstumsfaktor Signaltransduktion (*fibroblast growth factor*, FGF) und Wnt Signaltransduktion gezeigt werden. Beide tragen entscheidend zu Zellschicksalsentscheidungen bei<sup>180,181</sup> und sind in der Tumorgenese diverser Tumoren involviert<sup>182,183</sup>. Auch für Notch1 konnte bereits ein Zusammenhang zwischen Mutation und Tumorgenese gefunden werden<sup>52</sup>. So verursacht eine chromosomale Translokation und Fusion des 3' Endes von Notch1 an den T-Zell Rezeptor die T-ALL.

Doch auch Mechanismen der normalen Notch-Signaltransduktion können Einfluss auf die Pathogenese von Tumoren haben. Durch Modulation von Mechanismen wie Proliferation, Anti-Apoptose und Angiogenese trägt die Notch Signaltransduktion entscheidend zur Tumorgenese bei<sup>184</sup>. Die Bedeutung einzelner Notch Mitglieder in der Tumorgenese solider

und hämatopoetischer Erkrankungen ist allerdings noch nicht ausreichend verstanden. Um Erkenntnisse über die biologische Funktion der Notch Rezeptoren in der Tumorgenese des NSCLC *in vivo* zu gewinnen, wurde Notch1 aber auch Notch2 in einem konditionellen Kras<sup>G12D</sup>-induzierten Mausmodell ausgeschaltet. Es ist bereits aus anderen Geweben bekannt, dass verschiedene Mitglieder der Notch Familie durchaus eine differenzierte, gegensätzliche Rolle in einem Gewebe haben können<sup>49</sup>. In dieser Arbeit wurde dies zum ersten Mal auch in der Lunge bestätigt. So konnte gezeigt werden, dass Notch1 im NSCLC eine Rolle als Tumorpromotor hat (wobei der onkogene Effekt *in vitro* stärker ausfällt als *in vivo*), während Notch2 ein Tumorsuppressor ist.



**Abb. 4.1 Schematische Darstellung der ADAM17 vermittelten Prozesse in NSCLC Zellen**

ADAM17 vermittelt die Prozessierung der membrangebundenen Vorstufen der EGFR Liganden. Diese binden anschließend an den EGFR und führen zur Phosphorylierung des EGFR und seiner nachgeschalteten Signalmoleküle MAPK/Erk1/2 und PI-3K/Akt. Zusätzlich reguliert ADAM17 die Aktivierung der Notch1 Signaltransduktion. Die membrangebundenen Notch Liganden (Jagged, Delta-like) binden an Notch1, worauf es durch 2 proteolytische Schnitte zur Aktivierung des Notch1 Signalweges kommt. ADAM17 schneidet Notch extrazellulär an der S2-Schnittstelle und der  $\gamma$ -Sekretase Komplex intrazellulär an der S3-Schnittstelle. Daraufhin wird das aktive, intrazelluläre N1<sup>IC</sup> Fragment frei und transloziert in den Nukleus. Eines der durch Notch regulierten Gene ist der EGFR.

#### 4.1. Die Bedeutung von ADAM17 für die Tumorgenese des NSCLC

In verschiedenen Publikationen wurde gezeigt, dass ADAM17 an vielen biologischen Prozessen beteiligt ist und seine Funktion in der Prozessierung der Ektodomänen von Proteinen liegt. Dazu gehören Adhäsionsproteine, Rezeptoren oder die membranständigen Vorstufen von Liganden für den EGF Signalweg<sup>104,105</sup>. Die erhöhte oder konstitutive Aktivität von ADAM17 kann dagegen auch zur Pathogenese von Tumorerkrankungen beitragen. Dies konnte bisher u.a. in Arbeiten zum Mammakarzinom<sup>117</sup>, Pankreaskarzinom<sup>185</sup>, Prostatakarzinom<sup>186</sup> und Kolonkarzinom<sup>118</sup> gezeigt werden.

Auch in der Pathogenese des NSCLC spielt ADAM17 eine Rolle. Dabei zeigten Zhou *et al.*, in Experimenten mit Zelllinien, dass ein möglicher Mechanismus die Aktivierung der EGF Signaltransduktion ist<sup>89</sup>. Des Weiteren zeigten sie eine gesteigerte ADAM17 Expression in Tumorproben von NSCLC Patienten. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden humane Lungengewebeproben immunhistochemisch untersucht. Im Gegensatz zu gesunden Kontrollproben, welche in allen Fällen negativ für ADAM17 waren, zeigten 100% der NSCLC Biopsate ADAM17 Proteinexpression. Auch phosphoryliertes EGFR wurde nur in den NSCLC Biopsaten beobachtet.

Um die ADAM17-vermittelte Aktivierung der EGFR Signaltransduktion als möglichen Pathomechanismus im NSCLC weiter zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit verschiedene NSCLC Zelllinien analysiert. Für diese konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von ADAM17 mit THC<sup>166</sup> zu einer Prozessierung von EGFR Liganden mit daraus resultierender Aktivierung des EGFR Signalweges führt (Abb. 3.1). Die Blockade der ADAM17-abhängigen Proteolyse mittels Inhibitor und spezifischen *Knockdown* reduzierte dagegen die Proliferation der Zellen, inhibierte die Bildung von Kolonien im Softagar Assay und induzierte Apoptose. Anhand dieser Ergebnisse steht es außer Frage, dass ADAM17 durch Prozessierung der EGFR Liganden und daraus resultierender Stimulation des EGFR, ein wichtiger Bestandteil in der Tumorgenese des NSCLC ist.

Interessanterweise ist die Bildung von Kolonien im Softagar Assay bei 5 der verwendeten Zelllinien unabhängig von ihrem EGFR und Kras Mutationsstatus (Abb.3.2). Obwohl eine Mutation in Kras bzw. in der Tyrosin-Kinase Domäne des EGFR weitestgehend EGFR-unabhängiges Wachstum suggerieren würde, zeigen diese Zelllinien (H358, H1975, H1650) eine deutliche Abhängigkeit von stimulierenden Liganden. Dies kann mehrere Gründe haben: Zum einen konnte bereits in der Fibroblastenzelllinie Cos-7 gezeigt werden, dass auch ein mutiertes EGFR Protein immer noch Stimulation mit Liganden zur Aktivierung benötigt<sup>101</sup>. Zum anderen ist BB-94 ein unspezifischer MMP-Inhibitor der die Bildung von Kolonien durch Inhibition anderer Metalloproteinasen, außer ADAM17, inhibieren könnte.

Allerdings reduzieren auch der spezifischere ADAM17 Inhibitor BMS und der selektive *Knockdown* von ADAM17 sehr potent das Tumorstadium.

Weiterhin zeigen Stimulationsexperimente mit EGF, dass die EGFR Signaltransduktion als alleiniger Mechanismus im NSCLC unwahrscheinlich ist und es einen weiteren ADAM17-vermittelten Pathomechanismus im NSCLC geben muss.

Zum Substratspektrum von ADAM17 gehören weitere Wachstumsfaktoren, wie Heregulin, die neben dem EGFR auch an andere RTK's binden können. In der Tat konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass die Blockade eines Rezeptors des EGF Signalweges durch die Aktivierung alternativer ErbB Rezeptoren<sup>187</sup> umgangen werden kann. Zhou *et al.* zeigten, dass in der NSCLC Zelllinie A549 neben dem EGFR, vor allem eine autokrine Schleife zwischen der ADAM17-vermittelten Prozessierung von Heregulin und der Aktivierung des HER3 zur Tumorgenese dieser Zelllinie beiträgt und zur Resistenz gegenüber Gefitinib führt<sup>89</sup>. Diese Beobachtung kann in der hier vorliegenden Arbeit mit einer anderen Zelllinie nicht bestätigt werden. In Experimenten mit dem Überstand von H292 Zellen, inhibierte der spezifische EGFR Inhibitor Cetuximab jegliche Proliferation der Zellen (Abb. 3.6). Demnach scheint sich im Überstand dieser Zellen kein löslicher Ligand, der einen weiteren Signalweg aktiviert oder an einen alternativen ErbB Rezeptor wie HER3 bindet, zu befinden. Vielmehr deuteten die Ergebnisse auf einen membranständigen Rezeptor als ADAM17 Substrat hin. Unter den zahlreichen ADAM17 Substraten befinden sich auch die Rezeptoren der Notch Familie und Expressionsanalysen (Abb. 3.7) sowie die *in vitro* und *in vivo* gewonnenen Daten zeigen eine enge Regulation der Notch Aktivität durch ADAM17.

#### 4.2. Die Bedeutung von Notch1 für die Tumorgenese des Lungenkarzinoms

Notch ist ein hoch konservierter Signalweg, der in vielen Organen vorkommt und an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt ist. Die Signaltransduktion wird fein reguliert und ist stark Zelltyp- und Kontextabhängig. In der gesunden fötalen Mäuselunge konnte die Expression der Rezeptoren Notch1 – Notch4 und der Liganden Delta-like1 sowie Jagged1 und -2 detektiert werden, wodurch ein erster Hinweis auf eine wichtige Funktion von Notch in der Organentwicklung und damit möglicherweise auch in der Lunge gegeben ist<sup>188</sup>. Jedoch verhindert die frühe embryonale Lethalität homozygoter Deletionen von Notch1, Notch2, Delta-like1 und Jagged1 in Studien mit *Knockout* Mäusen, eine genauere Analyse dieses Signalweges in der Lungenentwicklung<sup>15</sup>. Lediglich Notch3 und Notch4 *Knockout* Mäuse sind überlebensfähig, zeigen aber keine abnorme Entwicklung der Lunge<sup>15</sup>.

In der Pathogenese des NSCLC fokussierten sich die Untersuchungen bisher verstärkt auf das transformierende Potential von Notch3. So zeigten Haruki *et al.* Notch3 Expression in 40% der von ihnen untersuchten humanen NSCLC Biopsate<sup>60</sup>. Sie konstruierten zudem

einen Notch3 Rezeptor ohne intrazelluläre Domäne und beobachteten reduziertes Kolonienwachstum von Zelllinien im Softagar. In der Arbeit von Konishi *et al.* wurde Notch3 in NSCLC Zelllinien mittels  $\gamma$ -Sekretase und spezifischer siRNA inhibiert. Dies führte bei den Zellen zu reduzierter Proliferation und erhöhter Apoptose<sup>68</sup>.

In anderen Tumoren steht dagegen vor allem Notch1 im Fokus vieler Studien. Eine Schwierigkeit bei der Analyse der Notch-vermittelten Signaltransduktion in der Tumorgenese ist die Tatsache, dass die Aktivitäten stark Zelltyp- und Kontextabhängig sind. So konnte gezeigt werden, dass Notch1 im Pankreaskarzinom und Prostatakarzinom eine tumorsuppressive Funktion hat<sup>62,64</sup>. Im Gegensatz dazu scheint Notch1 ein Tumorpromotor im Melanom<sup>50</sup>, Mammakarzinom<sup>189</sup> und Nierenzellkarzinom<sup>65</sup> zu sein.

Für NSCLC deuten die Daten ebenfalls auf eine Funktion von Notch1 als Tumorpromotor hin. So entdeckten Westhoff *et al.* in 40% der von ihnen untersuchten humanen NSCLC Biopsate verstärkte Notch1 Aktivierung. Diese wurden zum einen durch eine Aktivierungsmutation in Notch1 und zum anderen durch den Verlust von NUMB, einem negativen Regulator von Notch, hervorgerufen<sup>75</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde die Oberflächenexpression von Notch1 in Patientenproben untersucht. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen Normalgewebe und pathogen verändertem Gewebe beobachtet werden (Tab. 3.1). Lee *et al.* untersuchten in ihrem Panel von NSCLC Biopsaten ebenfalls die Expression von Notch1 und stellten fest, dass Notch1 in 129 von 158 Proben verstärkt exprimiert wurde. Kontrollproben von gesundem Bronchialepithel waren dagegen negativ<sup>72</sup>. Gründe für Unterschiede liegen möglicherweise in der unterschiedlichen Sensitivität der verwendeten Antikörper.

Bei einer Analyse der NSCLC Zelllinien wurde dagegen mehrheitlich Expression aller Notch Rezeptoren und auch der Liganden Jagged1 und Delta-like beobachtet (Abb. 3.7). Dies wird durch weitere Publikationen über NSCLC Zelllinien aber auch humanen NSCLC Biopsaten bestätigt<sup>72,68,190,191</sup>.

Auch die *in vitro* durchgeführten Experimente dieser Arbeit suggerieren eine Funktion von Notch1 als Tumorpromotor. Wurde Notch1 Expression mittels shRNA spezifisch inhibiert, so reduzierte sich das Kolonienwachstum der Notch1-exprimierenden Zellen im Softagar (Abb. 3.10) dramatisch. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die Transformation der Zellen Notch1 notwendig ist. Das Gegenteil wird durch ektopische Expression des konstitutiv aktiven N1<sup>IC</sup> Fragmentes erreicht. Bei gleichzeitiger Stimulation des EGFR Signalweges wurde hier, im Gegensatz zur Kontrolle, eine stark erhöhte Kolonienformation im Softagar (Abb. 3.11B) und stärkere Proliferation (Abb.3.12A) der Zellen beobachtet.

Erstaunlicherweise führte die ektopische Expression von N1<sup>IC</sup> ohne gleichzeitiger EGF Stimulation nicht zu einer verstärkten Kolonienformation und Proliferation und erhöhte im Gegenteil sogar die Apoptose der Zellen (Abb. 3.12B). Dieser anscheinend widersprüchliche

Effekt wurde bereits von anderen Wissenschaftlern beobachtet. So zeigten Mazzone *et al.* in Brustepithelzellen, dass hohe Notch Aktivität mit Inhibition der Proliferation einhergeht, während niedrige Notch1 Aktivität hyperproliferativ wirkt<sup>192</sup>. Chen *et al.* erhielten dagegen unterschiedliche Ergebnisse bei verschiedenen Kulturbedingungen. Unter normoxischen Bedingungen beobachteten sie, dass ektopische Expression von N1<sup>IC</sup> Apoptose in NSCLC Zellen induziert. Unter hypoxischen Kulturbedingungen dagegen konnte ektopische Expression von N1<sup>IC</sup> die Apoptoserate von Zellen, ausgelöst durch  $\gamma$ -Sekretase, reduzieren<sup>73</sup>. In Bezug auf die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse ist es daher denkbar, dass es einen „dosislimitierenden“ Effekt der N1<sup>IC</sup> Expression auf die Zellen gibt. Des Weiteren scheint die parallele Stimulation des EGFR Signalweges eine stark tumorbegünstigende Wirkung zu haben.

Im Gegensatz zu der Funktion als Tumorpromotor bei NSCLC Zelllinien, zeigte Notch1 im Kras<sup>G12D</sup>-induzierten NSCLC Mausmodell eine weniger ausgeprägte Funktion als Tumorpromotor. So hatten Mäuse mit Notch1 Deletion keinen Überlebensvorteil gegenüber Kontrollmäusen (Tab. 3.3). Allerdings konnte ein Unterschied in der Tumorfläche nach 6 Monaten (Abb. 3.26) und in der Proliferationsrate der Tumorzellen (Abb. 3.32) beobachtet werden. Beide Parameter waren bei Kras N1<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant reduziert gegenüber Kras-Kontrollmäusen. Möglicherweise reduziert die Notch1 Deletion das Transformationspotential der Zellen. Dadurch ist die Tumorfläche in Kras N1<sup>-/-</sup> Mäusen nach 6 Monaten kleiner als bei den Kontrollen. Hat sich ein Tumor erst etabliert, hat Notch1 möglicherweise keinen Effekt mehr und die Mäuse zeigen keine Verlängerung beim Überleben. Auch die reduzierte Proliferationsrate der Tumorzellen begünstigte das Überleben nicht.

Im Gegensatz zu den *in vitro* Experimenten bestehen solide Tumoren *in vivo* nicht nur aus Tumorzellen, sondern es liegt eine große zelluläre Heterogenität in den Organen vor. Daraus entsteht eine einzigartige Tumorumgebung, welche die Eigenschaften der Tumorzellen noch weiter modifizieren kann. Die Mikroumgebung eines Tumors besteht u. a. aus Stromazellen, extrazellulärer Matrix und löslichen Faktoren wie Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Durch Interaktion mit der Mikroumgebung schaffen sich die Tumorzellen individuelle und bestmögliche Wachstumsverhältnisse<sup>193</sup>. Im Gegensatz dazu wird in den *in vitro* Experimenten nur mit Zellen eines Zelltyps gearbeitet. Dadurch ist es möglich, dass Unterschiede zwischen den *in vitro* und *in vivo* Daten von Notch1 zustande kommen.

Allerdings sind auch transgene Mausmodelle nur eine vereinfachte Annäherung an die humane Pathogenese von Tumoren. In diesen Modellen entwickelt sich Tumorgewebe durch starke Aktivierung von nur einem Signalweg, von dem sie während des weiteren Verlaufes meist abhängig bleiben (*oncogene addiction*)<sup>194</sup>. So zeigten Mäuse mit Notch1 bzw. Notch2 Deletion ohne Kras Mutation keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zum WT in

der Lunge. Möglicherweise liegt es aber auch an der Wahl des transgenen Mausmodells und Notch1 ist auf dem genetischen Hintergrund der Kras<sup>G12D</sup>-vermittelten Tumorgenese weniger entscheidend.

Weiterführende Untersuchungen zum onkogenen Potential von Notch1 im Menschen und in Modellen mit anderem genetischen Hintergrund sind daher notwendig. Generell ist das hier verwendete Mausmodell dennoch ein guter Weg, um in Kombination mit *in vitro* Experimenten einen ersten Einblick in die Grundlagen der Pathogenese des NSCLC zu erhalten.

### 4.3. Notch1 vermittelte Regulation des EGFR

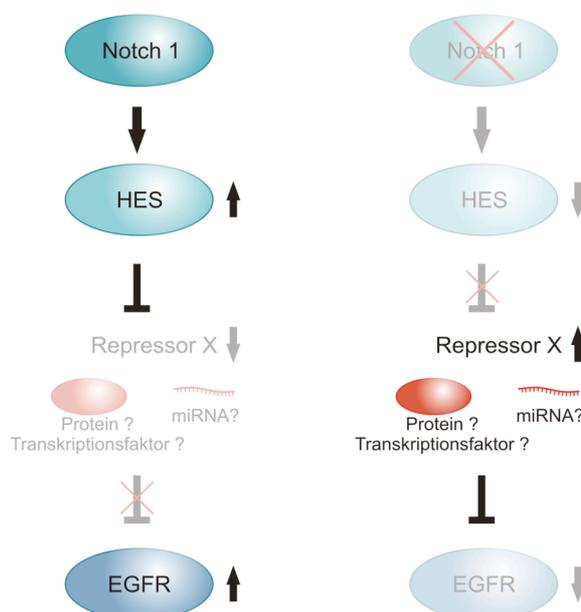
Die genauen Mechanismen, wie Notch1 die Pathogenese von Tumorzellen beeinflusst und welche nachgeschalteten Mediatoren dafür verantwortlich sein könnten, sind weitestgehend unklar. Weng *et al.* zeigten, dass *c-myc* ein direktes Zielgen von Notch1 ist und für die Proliferation von T-ALL Zelllinien notwendig ist. So reduziert die Überexpression von *c-myc* den Anti-Proliferativen Effekt der Notch1 Inhibition in diesen Zellen<sup>45</sup>. In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass Notch1 die Transformation von Nierenzellen von Ratten (*rat kidney epithelial cells* - RKE) durch verstärkte Expression von cyclinD1 begünstigt. Dadurch erreicht Notch1 eine Kontrolle über den Zellzyklus und beeinflusst so die Proliferation der Zellen<sup>47</sup>.

Im NSCLC könnte ein weiterer wichtiger Mechanismus die im Rahmen dieser Arbeit gefundene Regulation der EGFR Expression sein. So wurde in Notch1 *Knockdown* Zellen eine deutliche Reduktion der EGFR Proteinexpression (Abb. 3.13) und EGFR mRNA (Abb. 3.14) festgestellt. Der bestehende Zusammenhang zwischen Notch1 und EGFR wird von der Analyse der humanen NSCLC Biopsate weiter untermauert. So findet man bei einem Drittel der Patienten die Notch1 exprimieren auch eine stärkere EGFR Expression. Die Assoziation zwischen ADAM17, der Notch1 Signaltransduktion und starker EGFR Proteinexpression (Abb. 3.21) in diesen Proben ist ebenfalls signifikant.

Eine mögliche Regulation der EGFR Expression durch Notch1 ist von hoher klinischer Relevanz. Denn Untersuchungen im NSCLC zeigten, dass die Überexpression des EGFR ein häufiges Merkmal im NSCLC ist<sup>10,90,91</sup> und wahrscheinlich schon früh in der Tumorgenese auftritt<sup>195</sup>. Über die Mechanismen die dahinter stehen ist allerdings nur wenig bekannt, sodass auch über die Verbindung zwischen Notch und EGFR nur spekuliert werden kann. Eine direkte Regulation ist allerdings unwahrscheinlich, da auf der EGFR Promotor Sequenz keine Bindungsstelle für das DNA-bindende Protein CSL des Notch Signalweges zu finden ist<sup>171</sup>.

In Glioma Zellen konnte gezeigt werden, dass Notch1 die Expression von EGFR möglicherweise über p53 kontrolliert<sup>171</sup>. Bei den hier verwendeten NSCLC Zelllinien konnte

jedoch keine Korrelation zwischen Notch1 und der p53 Expression festgestellt werden (Abb. 3.16), so dass eine Regulation des EGFR über p53 eher unwahrscheinlich ist. Die primären Ziele von Notch sind die transkriptionellen Repressoren der HES und HEY Genfamilie<sup>196</sup>. Dies trifft auch auf die NSCLC Zellen zu. Hier wurde eine Abnahme der HES1 mRNA in den Notch1 *Knockdown* Zellen (Abb. 3.14) bzw. eine erhöhte HES1 Expression bei ektoptischer Expression von N1<sup>IC</sup> (Abb. 3.15) beobachtet. Wird HES durch Notch aktiviert, führt das zur Repression von HES Zielgenen. Daher ist ein in Abb. 4.2 dargestelltes Schema mit einem unbekanntem Repressor als Mediator zwischen HES und EGFR denkbar. Nach Notch Aktivierung reprimiert HES einen Repressor des EGFR Promotors wodurch die Transkription von EGFR möglich ist. Ist Notch inhibiert, kann HES den Repressor nicht blockieren. Dieser wird aktiv und reprimiert in Folge dessen die Transkription von EGFR.



**Abb. 4.2 Schematische Darstellung der EGFR Regulation durch Notch1**

Potentieller Mechanismus der EGFR Inhibition durch Notch1. Notch1 aktiviert den transkriptionellen Repressor HES1 der daraufhin einen Repressor des EGFR inhibiert. EGFR kann exprimiert werden. Ist der Repressor von EGFR dagegen durch Inhibition von Notch1 aktiv, kann EGFR nicht mehr exprimiert werden.

Es sind aber auch noch indirektere Mechanismen über weitere Mediatoren denkbar oder Mechanismen, die unabhängig von der Interaktion zwischen N1<sup>IC</sup> und dem DNA-bindenden Protein CSL (= klassische Aktivierung der Notch Zielgene) sind. So zeigten Dumont *et al.*, dass N<sup>IC</sup> Mutanten, die nur die intrazellulären *Ankryn Repeats* besaßen und damit nicht an CSL (bzw. RBPJ-κ in der Maus) binden können, dennoch die neoplastische Transformation in RKE Zellen induzieren<sup>37</sup>. Dabei interagieren die *Ankryn Repeats* mit dem Adenovirus *early antigen 1A* (E1A), welches zum immortalisieren der Zellen verwendet wurde und lösen so die Transformation der Zellen aus.

Eine weitere, erst in letzter Zeit entdeckte Klasse an Biomolekülen, könnte ebenfalls an der Regulation des EGFR beteiligt sein – mikro RNA's (miRNA). So konnte bereits sowohl für die miRNA-7<sup>197</sup> als auch für die miRNA-128b<sup>198</sup> eine negative Regulation des EGFR gezeigt werden.

Zusätzlich zur Regulation auf der Ebene des EGFR wäre auch denkbar, dass Notch Mediatoren der nachgeschalteten EGFR Signalwege reguliert und über einen negativen *feedback* Mechanismus die Expression des EGFR reduziert. Dafür sprechen würde die Beobachtung, dass nach Stimulation des EGFR mit EGF die nachgeschalteten Signalwege differentiell reagieren. So wurde eine unbeeinflusste Phosphorylierung von Akt (PI-3K Signalweg) beobachtet, während Erk (MAPK Signalweg) nur sehr schwach phosphoryliert wurde (Abb. 3.17). Auch Mittal *et al.* fanden in immortalisierten Brustepithelzellen, dass Notch mit dem MAPK Signalweg, nicht aber mit dem PI-3K Signalweg kollaboriert und so die Kolonienzahl im Softagar steigert<sup>199</sup>. Der Mechanismus dabei ist jedoch unklar. Aus Arbeiten an *C.elegans* ist bekannt, dass Notch die Transkription von *lateral signal target (Ist)* Genen steigert, welche für Inhibitoren der Ras Signalkaskade kodieren. Ras wiederum aktiviert hauptsächlich den MAPK Signalweg<sup>200</sup>. Bislang gibt es allerdings nur eine Studie die einen negativen *feedback* zwischen dem MAPK Signalweg und dem EGFR zeigt. So beobachteten Northwood *et al.* eine ERT (= Erk1) und MAP2 (= Erk2) spezifische Phosphorylierung von Threonin 669 des EGFR<sup>201</sup>. Es gibt jedoch bisher keine Daten, die diesen Signalweg mit der transkriptionellen Regulation des EGFR in Verbindung bringen.

In wie weit diese und andere genannte Mechanismen eine Rolle spielen und eventuell ein Verbindungsglied zwischen Notch1 und EGFR bilden, bleibt daher zu untersuchen.

Die fehlende Aktivierung des MAPK Signalweges in den Notch1 *Knockdown* Zellen ist möglicherweise einer der Gründe, weshalb die Zellen eine hohe Apoptoserate haben, nur wenige Kolonien im Softagar bilden und schlecht proliferieren. Dennoch ist in diesen Zellen der PI-3K Signalweg aktiv und es bleibt zu untersuchen, wie dieser sich auf die Tumorgenese der NSCLC Zellen auswirkt.

Neben anderen Proteinen wird insbesondere Akt als Regulator zwischen dem Überleben und Sterben einer Zelle angesehen. Eine Akt Phosphorylierung begünstigt eher das Überleben<sup>202</sup>. Die hier gezeigten Ergebnisse legen allerdings eine Akt unabhängige Apoptoseinduktion nahe. Bereits für Prostatakrebszellen konnte gezeigt werden, dass verringerte EGFR Expression alleine sehr effizient den Zelltod auslösen kann<sup>203</sup>. Durch Interaktion mit dem Glukosetransporter SGLT1 fördert EGFR hier die Glukoseaufnahme in die Zellen. Wird der EGFR nur inhibiert, kann immer noch genug Glukose aufgenommen werden, um ein Minimumlevel zu halten, wodurch die Zellen in ein Wachstumsarrest gehen,

aber nicht sterben. Exprimieren die Zellen dagegen kein EGFR, reduziert sich der intrazelluläre Glukoselevel so stark, dass Zelltod durch Autophagie ausgelöst wird<sup>203</sup>.

#### 4.4. Der Einfluss von Notch2 Deletion auf den Phänotyp

Deletion von Notch2 führte im Gegensatz zu der Notch1 Deletion zu einem gegenteiligen Tumorphänotyp in der Maus. Das mediane Überleben der Kras N2<sup>-/-</sup> Mäuse ist mit 271 Tagen signifikant kürzer als bei den Kras Mäusen (Tab. 3.3). Zudem ist die Tumorphäche in Prozent zur Gesamtlungenfläche bereits nach 6 Monaten signifikant höher als bei den Kontrollen (Abb. 3.26). Auch der Proliferationsindex dieser Zellen ist signifikant erhöht (Abb. 3.22). Da die Notch2 Deletion das Tumorstadium zu begünstigen scheint, ist es möglich, dass Notch2 ein Tumorsuppressor in der Kras<sup>G12D</sup>-induzierten Tumorgenese des NSCLC ist. Damit ist dies die erste Arbeit, die diese Funktion in Bronchialepithelien beschreibt. Bisher wurde die Funktion von Notch2 als Tumorsuppressor nur im Mammakarzinom beschrieben<sup>204</sup>. Dort zeigten Parr *et al.*, dass eine starke Expression von Notch2 im Brustkrebsgewebe von Patientinnen mit einer höheren Überlebensrate korreliert ist. Zudem haben Parr *et al.* auch die Expression von Notch1 untersucht und stellten fest, dass diese eher mit einer schlechten Überlebenswahrscheinlichkeit korrelierte.

Ergebnisse von soliden Tumoren in anderen Organen zeigen Notch2 dagegen auch als Tumorpromotor<sup>49,62,205</sup>. So ist Notch2 im Pankreas für die Differenzierung und Progression von intraepithelialen Neoplasien zu Adenokarzinomen notwendig<sup>205</sup> und in Medulloblastomen ist Notch2 mit hoher HES1 Aktivität assoziiert, was bei Patienten zu einer schlechten Überlebenswahrscheinlichkeit führt<sup>49</sup>. Die hohe Kontext- und Organspezifität, welche schon für Notch1 gezeigt werden konnte, trifft demnach auch auf Notch2 zu.

Ein weiterer großer Unterschied der Kras N2<sup>-/-</sup> Tumoren im Gegensatz zu den anderen Genotypen ist der Differenzierungsgrad der Tumoren. Bei einer Einteilung der Tumoren nach den von Jackson *et al.* publizierten Parametern<sup>156</sup> zeigte sich, dass die Kras N2<sup>-/-</sup> Tumoren bereits nach 6 Monaten schlechter differenziert waren als die Tumoren der anderen Genotypen. Als die Mäuse verstarben konnten über 95% der Tumoren dem Grad 4 oder 5 zugeordnet werden, während die Tumoren aus den anderen Genotypen meistens Grad 2 oder 3 waren (Abb. 3.29). Für die Klinik ist die Einteilung von Tumoren in Differenzierungsstadien ein Parameter, um Tumoren in Bezug auf ihre Aggressivität zu beschreiben. Gut differenzierte Tumoren ähneln dem Ursprungsgewebe in ihrer Morphologie, diese Patienten haben eine bessere Überlebensprognose. Schlecht differenzierte Tumoren dagegen ähneln dem Ursprungsgewebe morphologisch kaum und sind aggressiver, weshalb sie eine schlechtere Prognose aufzeigen<sup>206</sup>.

Das gerade die Notch Rezeptoren eine Funktion in der Differenzierung von Zellen haben, zeigen auch die Ergebnisse anderer Gruppen. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch meist noch unklar. So führt Notch2 - wie schon oben genannt - im Pankreas zur Differenzierung und Progression von intraepithelialen Neoplasien zu Adenokarzinomen. Ein Mediator für diesen Prozess ist dabei vermutlich c-myc<sup>205</sup>. Bei der Entwicklung des Kleinhirns zeigte sich dagegen, dass Notch2 die Differenzierung von neuronalen Vorstufen der Körnerzellen inhibiert. Dies geschieht hauptsächlich durch die Aufrechterhaltung der Proliferation der Vorstufenzellen durch verstärkte HES1 Aktivierung<sup>207</sup>. Des Weiteren beeinflusst Notch2 das proximale Zellschicksal von Nephronen<sup>208</sup> oder reguliert die Differenzierung von Myofibroblasten zu Myoblasten<sup>177</sup>. Doch nicht nur Notch2 hat eine Funktion in Differenzierungsprozessen. Auch in diesem Bezug findet man eine Kontext- und Organspezifität der einzelnen Notch Rezeptoren wieder. So werden in anderen Organen auch Notch1, -3 und -4 eine Funktion in Differenzierungsprozessen zugeschrieben<sup>48,57,71</sup>. Die Daten aus dieser Arbeit implizieren jedoch, dass hauptsächlich Notch2 und nicht Notch1, eine Funktion in der Differenzierung der Tumorzellen in diesem Mausmodell hat.

Weitere Ergebnisse zur Untersuchung der Morphologie der Tumoren (Abb. 3.30) zeigten, dass die Kras N2<sup>-/-</sup> Tumoren nicht nur schlechter differenziert sind, sondern auch weitere spezifische Eigenschaften aufweisen. So zeigten die Tumoren aus diesem Genotyp verstärkt Invasion von Tumorzellen in die Bronchien sowie Infiltrate aus Lymphozyten und Makrophagen (Abb. 3.30B). Zudem sind in den Lungen kaum noch bronchiale Strukturen zu erkennen. Möglicherweise kommt es durch die Größe der Tumoren zur Pelottierung oder Kompression der Bronchien. Dies führt zur Unterversorgung mit Sauerstoff und Sekretstau, was in einer Retentionspneumonie endet und die Lymphozyten- und Makrophageninfiltrate erklären könnte. Es bleibt zu untersuchen, durch welche Eigenschaften die Tumorzellen invasiv in die Bronchien wachsen können und ob diese Eigenschaften auch zu potentieller Metastasierung in andere Organe führen könnte. Mikroskopisch konnte eine Metastasierung in andere Organe bisher jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 3.30C-E).

Weiterführende Untersuchungen der tumorsuppressiven Rolle von Notch2 in *in vitro* Experimenten und Expressionsanalysen in humanen NSCLC Proben sind ausstehend.

#### **4.5. Funktionelle und Strukturelle Diversität des Notch1 und Notch2 Rezeptors**

Wie bereits in anderen Organen gezeigt werden konnte, können einzelne Notch Rezeptoren durchaus unterschiedliche Funktionen im selben Organ haben<sup>49,204</sup>. So legen auch die Ergebnisse aus dieser Arbeit nahe, dass Notch1 im NSCLC eine Rolle als Tumorpromotor hat, während Notch2 tumorsuppressiv wirkt.

Besonders interessant ist in diesem Bezug der beobachtete, sehr heterogene Tumorphänotyp bei Mäusen mit Doppeldeletion von Notch1 und Notch2. So entspricht die Tumorfläche der *Kras* N1<sup>-/-</sup>N2<sup>-/-</sup> Mäuse, besonders nach 6 Monaten, sehr den *Kras* N1<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 3.26). Jedoch war ihr medianes Überleben eher vergleichbar mit *Kras* N2<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 3.25). Zusätzlich ist auch die Differenzierung der Tumoren schlechter als bei *Kras* oder *Kras* N1<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 3.29). Dies ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass die Notch Rezeptoren zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt die Tumorgenese der Zellen beeinflussen könnten. Während Notch1 anscheinend im frühen Stadium des Tumorwachstums wichtig ist, ist Notch2 möglicherweise eher an der Tumorgenese etablierter Tumoren beteiligt.

Des Weiteren ist es ein Hinweis darauf, dass nicht nur die Funktion der Rezeptoren (Promotor/Suppressor) unterschiedlich ist sondern, zumindest in Bezug auf die Differenzierung, auch unterschiedliche nachgeschaltete Mediatoren die Aktivität der Notch Rezeptoren im NSCLC vermitteln. So beobachteten Fan *et al.* in Gehirntumorzellen, dass ein antagonistischer Effekt auf das Tumorwachstum zustande kommt, weil Notch1 nur HEY1 aktiviert, während Notch2 sowohl HEY1 als auch HES1 und den *Hedgehog* Signalweg aktiviert. So ist Notch1 in diesen Zellen ein Tumorsuppressor und Notch2 ein Tumorpromotor.

Strukturell sind *Notch1* und *Notch2* hochkonservierte Gene, sodass nur geringfügige Unterschiede zu den funktionellen Unterschieden führen können. Daher ist noch nicht genau bekannt, ob die beobachteten Unterschiede zwischen den Notch Rezeptoren in den Organen strukturell bedingt sind oder möglicherweise durch unterschiedliche Expressionsprofile der Rezeptoren und/oder Liganden zustande kommen. Bekannt ist, dass Notch1 eine stärkere TAD hat als Notch2 und die Sequenz in diesem Bereich nicht sehr konserviert ist (20%)<sup>209,25</sup>. Zusätzlich unterscheiden sich auch die *Ankryn Repeats* und NCR Regionen bei beiden Rezeptoren geringfügig<sup>210</sup>. Bigas *et al.* beobachteten, dass die NCR Region der Rezeptoren die Zytokin Spezifität von Notch1 und Notch2 in 32D Zellen vermitteln. So inhibiert Notch1 Differenzierungsprozesse der Zelle nach Stimulation mit dem *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), nicht aber mit dem *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), während das bei Notch2 genau andersherum der Fall ist<sup>210</sup>. Kramann *et al.* dagegen konstruierten Fusionsproteine, in denen sie die letzten 426 Aminosäuren von Notch2<sup>IC</sup> mit der korrespondierenden Sequenz aus N1<sup>IC</sup> (entspricht der Region C-Terminal der *Ankryn Repeats*) fusionierten. Jedoch konnten sie in Mäusen keine phänotypischen Unterschiede zu WT Notch2 Mäusen erkennen<sup>211</sup>. Daher postulierten die Autoren, dass - trotz struktureller Unterschiede in dieser Region - diese nicht zum funktionellen Unterschied zwischen Notch1 und Notch2 beitragen.

Doch neben Unterschieden in der intrazellulären Region der Rezeptoren könnten auch die Liganden einen Einfluss auf die Regulation der Zielgene und damit Modulation der Funktion haben. So wird z.B. die Bindung von Jagged2 an Notch mit Tumor-induzierter Inflammation in Verbindung gebracht. Dagegen ist das bei Bindung von Jagged1 an Notch nicht der Fall<sup>191</sup>. Zudem zeigten einige Publikationen, dass Notch Rezeptoren auch bevorzugte Liganden haben können, die an sie binden<sup>174,212</sup>. So bindet Delta-like4 *in vivo* in T-Zellen exklusiv an Notch1 und reguliert so die Reifung der T-Zellen. Delta-like1 bindet dagegen in diesem Umfeld eher an Notch2, kann aber nicht die T-Zell Reifung induzieren<sup>174</sup>. Des Weiteren kann eine Rezeptor-Liganden Spezifität auch durch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen erreicht werden. So wurde gezeigt, dass durch O-Fucose Bindung an die extrazellulären *EGF-like Repeats* des Rezeptors, die Bindung von Jagged1 an Notch1 verhindert wird, nicht aber die Bindung Jagged1/Notch2<sup>213</sup>. Dagegen moduliert die Glycosyltransferase *Lunatic fringe* die Bindung der Delta-Liganden an die Notch Rezeptoren. Während in HEK293T-Zellen Delta-like4 bevorzugt an Notch1 bindet, bindet es bei Überexpression von *Lunatic fringe* auch an Notch2. Zusätzlich verstärkt *Lunatic fringe* die Bindungseffizienz von Delta-like1 an Notch1 und -2<sup>174</sup>. Eine genauere Untersuchung der Notch Rezeptoren und ihrer Mediatoren in der Lunge ist daher unerlässlich.

#### 4.6. Therapeutische Ansätze zur Behandlung von Lungenkarzinomen

Die traditionelle Krebstherapie basiert vorwiegend auf dem Einsatz zytotoxischer, chemotherapeutischer Wirkstoffe. Um die Tumorzellen zu reduzieren, wirken Chemotherapeutika aggressiv auf die DNA ein und inhibieren Prozesse wie DNA Synthese und Reparatur, um die Zellteilung zu stören und Apoptose auszulösen. Dabei macht man sich die hohe Teilungsrate maligner Zellen zu Nutze, die darum empfindlicher auf Schäden in der DNA reagieren. Da jedoch die zellulären Prozesse der DNA Synthese, Zellteilung und DNA Reparatur in allen sich teilenden Zellen stattfinden, haben diese Formen der Therapie häufig erhebliche Nebenwirkungen. Darum war die Entwicklung therapeutischer Maßnahmen die gezielt Tumorzellen angreifen können ein Fortschritt in der Tumorthherapie.

So ist in der Therapie des NSCLC ein gezieltes Eingreifen gegen den EGFR vielversprechend<sup>214,168</sup>, da dieser Rezeptor bei vielen Patienten überexprimiert wird (bis zu 60% der Fälle) oder konstitutiv aktiv ist (10-30% der Fälle)<sup>90-94</sup>. Zum Einsatz kommen hier Therapeutika aus 2 verschiedenen Kategorien: zum einen mAK, welche gegen die Ligandenbindende Domäne gerichtet sind (z.B. Cetuximab<sup>98</sup>, Panitumumab<sup>99</sup>) und zweitens die niedrig molekularen Tyrosinkinaseinhibitoren (z.B. Gefitinib, Erlotinib<sup>100</sup>).

Aufgrund von unterschiedlichen genetischen Hintergründen und weiteren Mutationen, profitiert die Mehrheit der Patienten leider nicht von einer zielgerichteten Therapie gegen den EGFR<sup>101,100</sup>. Erst seit kurzem ist ein weiteres Protein für eine gezielte Therapie beim NSCLC im Fokus - das EML4-ALK Fusionsprotein. Obwohl nur 4-7% der NSCLC Patienten eine solche onkogene Translokation des ALK Gens aufweisen<sup>215-217</sup>, sind erste Behandlungsergebnisse aus klinischen Studien sehr vielversprechend<sup>218</sup>. Um weitere potentielle Proteine für die gezielte Therapie ausfindig zu machen, ist es dringend notwendig, Prozesse der Krebsentstehung zu erforschen und zu verstehen. Dazu gehören neben der Aufklärung der beteiligten Netzwerke auch die Analyse einzelner Proteine und Moleküle, um auf molekularer Ebene therapeutisch eingreifen zu können und die Überlebensraten der Patienten zu verbessern. Die Daten aus dieser Arbeit zeigen, dass ADAM17 und Notch1 mögliche Ziele für eine gezielte NSCLC Therapie sein könnten.

#### 4.6.1. Therapeutischer Einsatz von ADAM17 Inhibitoren

Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit gezeigten Zusammenhänge und dem negativen Einfluss der ADAM17 Inhibition *in vitro* und *in vivo*, wäre ein therapeutisches Eingreifen gegen ADAM17 durchaus vielversprechend. ADAM17 Inhibition reduzierte das Transformationspotential von NSCLC Zelllinien im Softagar Assay, reduzierte die Proliferation und erhöhte die Apoptose der Zellen.

Leider entstehen bei selektiver Inhibition von nur einem Protein oft Resistenzen gegen den Inhibitor, da alternative Signalwege die Funktion des inhibierten Signalweges übernehmen. Oder es entstehen Mutationen im nachgeschalteten Signalweg, womit die Tumorzelle nicht mehr auf das inhibierte Protein angewiesen ist. Dieser Mechanismus konnte z.B. für Trastuzumab, einem mAK gegen Her2 gezeigt werden. Patienten mit Her2 Überexpression reagieren zunächst gut auf die Therapie, wobei die Aktivierung von PTEN zur Antitumor Aktivität beiträgt. Wird PTEN Expression als Resistenzmechanismus runterreguliert oder mutiert, führt das zur Resistenz gegen Trastuzumab<sup>219</sup>

Ein Vorteil für einen Inhibitor oder mAK gegen ADAM17 liegt im breiten Substratspektrum dieser Metalloproteinase. Durch fehlende Prozessierung ADAM17-abhängiger Liganden und Rezeptoren werden gleichzeitig mehrere Signalwege blockiert. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass die Zelle keinen alternativen Ausweg hat, um Resistenzen zu entwickeln. Des Weiteren reagierten in dieser Arbeit auch Zellen mit Kras Mutation (H358) sensitiv auf ADAM17 Inhibition, obwohl Kras ein sehr starkes Onkogen ist, das in vielen Tumoren zur EGFR-Unabhängigkeit führt. Zusätzlich zeigen die Daten, dass ADAM17 Inhibition nicht nur die EGFR Aktivierung direkt beeinflusst, sondern über Notch1 Aktivierung auch die EGFR Expression reguliert. Die genannten Punkte lassen es durchaus sinnvoll

erscheinen eine gezielte therapeutische Intervention von ADAM17 im NSCLC durchzuführen.

Einer der in dieser Arbeit verwendeten ADAM17 Inhibitoren BB-94 gehört zu der Gruppe der Breitband-Metalloproteinase Inhibitoren, welche ursprünglich gegen Rheumatoide Arthritis entwickelt wurden<sup>220</sup>. Als der Zusammenhang der reduzierten Prozessierung von EGFR Liganden durch ADAM17 Inhibition bekannt wurde, wurde BB-94 auch bei Tumorpatienten im Rahmen von Studien erprobt. Leider hatte BB-94, wie auch andere Inhibitoren dieser Wirkstoffklasse, starke muskuloskeletale Nebenwirkungen<sup>221</sup> und wurde daher vom Einsatz bei Patienten zurückgezogen. Die Nebenwirkungen begründen sich hauptsächlich durch die Inhibition diverser Metalloproteinasen mit vielfältigen Funktionen. BMS dagegen ist ein relativ selektiver Inhibitor von ADAM17<sup>170</sup> und ist damit vielversprechender aufgrund fehlender Kreuzreaktivität mit anderen Metalloproteinasen. Jedoch musste auch BMS nach Phase II Studien zurückgezogen werden, da Fälle von Hepatotoxizität auftraten<sup>222</sup>. Bisher wurden viele weitere selektive ADAM17 Inhibitoren aus verschiedenen Wirkstoffklassen entwickelt und in vorklinischen Versuchen getestet. Doch obwohl das Interesse an einem selektiven ADAM17 Inhibitor sehr hoch ist, scheiterten bisher alle Versuche spätestens in Phase II klinischer Studien<sup>223</sup>. Ein weiterer Ansatz um unspezifische Nebenwirkungen zu umgehen, ist die Entwicklung von selektiven mAK. Hierzu gibt es jedoch noch keine klinischen Studien.

### 4.6.2. Therapeutischer Einsatz von Notch Inhibitoren

Eine zentrale Bedeutung der Notch Signaltransduktion in der Pathogenese von Tumorerkrankungen wird immer deutlicher<sup>60-62,189,63,64</sup>. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit und Beispiele aus der Literatur zeigen allerdings, dass die Aktivierung des Notch Signalweges stark Kontext- und Zelltyp-abhängig ist<sup>49-51</sup>. Wie bereits diskutiert, unterscheiden sich auch im NSCLC die Funktionen von Notch1 und Notch2. Während Notch1 eine eher Rolle als Tumorpromotor zeigt, hat Notch2 möglicherweise eine tumorsuppressive Rolle.

Die Gemeinsamkeit aller Notch Rezeptoren liegt darin, dass für ihre Aktivierung eine proteolytische Spaltung durch einen  $\gamma$ -Sekretase Komplex notwendig ist<sup>30</sup>. Dies wurde als Ansatzpunkt genommen, um  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren (GSI) als potentielle Therapeutika für Karzinome zu testen. So gibt es derzeit 2 Phase II Studien (Stand März 2011), welche den Einsatz von GSI's auf das metastasierte Sarkom bzw. Melanom untersuchen ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Der Nachteil dieser GSI's ist allerdings, dass durch einheitliche Inhibition aller Notch Mitglieder keine Rücksicht auf unterschiedliche Expressionsmuster und Funktionen von Notch1 – Notch4 in verschiedenen Organen genommen wird. Daher sind starke Nebenwirkungen, wie bereits im Dünndarm<sup>224</sup> gezeigt, möglich.

Als weitere fatale Nebenwirkung der GSI Therapie eines Karzinoms wäre die Inhibition von Notch als Tumorsuppressor bzw. Aktivierung von Notch als Tumorpromotor in einem anderen Organ. In dieser Arbeit konnte zwar beobachtet werden, dass der Verlust von Notch *in vivo* nur in Kombination mit einem klassischen Onkoprotein (hier Kras<sup>G12D</sup>) zur Tumorgenese führt. Dadurch könnte jedoch dennoch ein gewisses Risiko für ein beschleunigtes Tumorwachstum bzw. für die Entstehung eines Zweittumors bestehen. So ist eine Kras Mutation bei Rauchern keine Seltenheit und tritt schon sehr früh in der Tumorgenese des NSCLC auf<sup>9</sup>. Dadurch könnte bei gleichzeitiger GSI Therapie, die gleiche genetische Situation wie in dem hier verwendeten Mausmodell entstehen.

Eine gezieltere Strategie wären mAk, welche die einzelnen Notch Rezeptoren selektiv erkennen und inhibieren. So publizierten Wu *et al.* 2010 die ersten Ergebnisse über selektive Antikörper gegen Notch1 und Notch2<sup>69</sup>. Sie beobachteten, dass der Antikörper gegen Notch1 das Wachstum von T-ALL Zelllinien, welche Mutationen in Notch1 tragen, hemmen konnte. Gleichzeitig zeigten sie, dass die Behandlung mit beiden Antikörpern bei Mäusen schwere Nebenwirkungen im Dünndarm hervorriefen, vergleichbar zu den Ergebnissen aus Studien mit GSI's<sup>224</sup>. Dagegen reduzierte oder vermied jeder Antikörper für sich diese Toxizität<sup>69</sup>. Li *et al.* entwickelten dagegen mAk gegen Notch3 und zeigten, dass diese die Proliferation von Notch3-überexprimierenden HEK293T Zellen reduzierten<sup>225</sup>.

Diese beiden Arbeiten zeigen, dass spezifische Antikörper gegen individuelle Notch Rezeptoren funktionieren und dass sie Komplikationen durch nicht-selektive Notch Inhibitoren reduzieren könnten. Speziell für die Behandlung des NSCLC legen unsere Daten nahe, dass eine Therapie mit mAk gegen Notch1 denkbar wäre. Zum einen, um dem Tumorwachstum direkt entgegenzuwirken und zum anderen, um auch durch die Regulation des EGFR Signalweges die Proliferation und Apoptose der Tumorzellen zu regulieren.

Zusammenfassend sind Therapien gegen ADAM17 oder Notch1 sicherlich interessante Ziele im NSCLC. Jedoch ist besonders durch die unterschiedlichen Funktionen der Notch Rezeptoren eine präzise Analyse notwendig.

## 5. Zusammenfassung

Das Lungenkarzinom ist die häufigste Krebstodesursache bei Menschen weltweit. Leider gibt es nur wenige therapeutische Optionen und die Prognose bei Diagnosestellung ist sehr schlecht. Eines der Hauptmerkmale im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) ist die Aktivierung und Überexpression des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR). ADAM17 induziert die Aktivierung des EGFR durch Prozessierung der membranständigen Liganden. Es konnte gezeigt werden, dass Inhibition oder *Knockdown* von ADAM17 die Tumorgenese und das Überleben von NSCLC Zellen stark reduziert. Dies geschieht zum einen durch fehlende Aktivierung des EGFR, zum anderen deutet jedoch die unvollständige Kompensation der fehlenden ADAM17 Aktivität durch exogenes EGF, auf zusätzliche EGFR-unabhängige ADAM17 Funktionen hin. Es wurde die Notch1 Signaltransduktion als weiterer, von ADAM17 kontrollierter Signalweg identifiziert. Durch Experimente mit Notch1 shRNA und ektopischer Überexpression des aktiven Notch Fragmentes N1<sup>IC</sup> stellte sich dieser Signalweg als kritischer Regulator für die Tumorgenese der Zellen heraus. Der gezielte *Knockdown* von Notch1 reduzierte die Proliferation, sowie das Kolonienwachstum im Softagar und steigerte die Apoptose deutlich. Auffallend war auch die starke Reduktion der EGFR Proteinexpression und EGFR mRNA in Zellen mit Notch1 *Knockdown*. Die zusätzliche Stimulation mit EGF steigerte weder die Kolonienformation im Softagar bzw. die Proliferation, noch wurde die Apoptoserate der NSCLC Zellen dadurch reduziert. Auch die immunhistochemische Analyse von humanem NSCLC Biopsaten zeigte eine signifikante Assoziation zwischen ADAM17, Notch Aktivität und hoher EGFR Expression.

Die Notch Rezeptoren sind Schlüssel moleküle in den Schicksalsentscheidungen der Zelle. Die Rolle der individuellen Notch Rezeptoren in der Tumorgenese des NSCLC ist jedoch weitgehend unklar. Aufgrund des onkogenen Potentials von Notch1 *in vitro* sollte die Rolle dieses Rezeptors sowie die Rolle von Notch2 in einem Kras<sup>G12D</sup>-induzierten Lungentumormodell *in vivo* untersucht werden. In diesem Modell wird das onkogene Kras Allel in der Lunge aktiviert und ist gekoppelt an die simultane Deletion von Notch1 (N1<sup>-/-</sup>) oder Notch2 (N2<sup>-/-</sup>). Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Notch1 zunächst zu einer reduzierten Bildung von Adenokarzinomen in der Lunge führte, das Überleben der Kras N1<sup>-/-</sup> Mäuse aber mit dem der Kontrollmäuse (Kras) vergleichbar war. Zudem war auch die Differenzierung beider Genotypen vergleichbar. Nur der Ki67 Proliferationsindex war in den Tumoren der Kras N1<sup>-/-</sup> Mäuse geringer. Dem gegenüber führte die Deletion von Notch2 zu einer signifikant beschleunigten Tumorgenese. Kras N2<sup>-/-</sup> Mäuse entwickelten aggressivere, schlecht differenzierte Tumoren. Nach 6 Monaten zeigten sich bereits größere Tumormassen

in der Lunge und die Mäuse starben signifikant früher. Darüber hinaus zeigten diese Tumoren verdrängendes Wachstum, Invasion in die Bronchien sowie Retentionspneumonien. Diese *in vivo* Resultat deuten darauf hin, dass die Notch Signaltransduktion ein elementarer Regulator der Tumorgenese bei Adenokarzinomen der Lunge ist. Dabei fungiert Notch1 eher als Tumorpromotor während Notch2, über die Differenzierung der Tumoren, eine Tumorsuppressorfunktion ausübt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein neuer molekularer Schaltkreis im NSCLC beobachtet werden, der ADAM17 als Regulator der EGFR Expression über die Aktivierung von Notch1 zeigt. Weiterhin wurde gezeigt, dass Notch1 *in vitro* eine essentielle Rolle als Tumorpromotor in der Tumorgenese des NSCLC hat. Diese tumorbiologische Funktion findet sich auch *in vivo*, wenngleich das Überleben der Mäuse nicht beeinflusst wird. Demgegenüber wurde Notch2 in diesem Tumormodell als Tumorsuppressor identifiziert, der die Differenzierung und Aggressivität der Tumoren maßgeblich reguliert. Insgesamt legen diese Daten nahe, dass die Notch Rezeptoren elementare und unterschiedlichen Funktionen in der Tumorgenese von Adenokarzinomen der Lunge ausüben.

Durch ihre zentrale Rolle in der Tumorgenese des NSCLC, stellen ADAM17 und Notch1 viel versprechende Ziele für die NSCLC Therapie dar. Dabei ist es jedoch notwendig, die genauen biologischen Mechanismen zu identifizieren, um unerwünschte oder sogar schädliche Therapieeffekte vermeiden zu können.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. & Ward, E. Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* **caac.20073** (2010).doi:10.3322/caac.20073
2. Ferlay, J. u. a. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* (2010).doi:10.1002/ijc.25516
3. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int. J. Cancer* **94**, 153-156 (2001).
4. DOLL, R. & HILL, A.B. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J* **2**, 739-748 (1950).
5. Askoxylakis, V. u. a. Long-term survival of cancer patients compared to heart failure and stroke: A systematic review. *BMC Cancer* **10**, 105 (2010).
6. Sutherland, K.D. & Berns, A. Cell of origin of lung cancer. *Molecular Oncology* **4**, 397-403 (2010).
7. Girard, L., Zöchbauer-Müller, S., Virmani, A.K., Gazdar, A.F. & Minna, J.D. Genome-wide Allelotyping of Lung Cancer Identifies New Regions of Allelic Loss, Differences between Small Cell Lung Cancer and Non-Small Cell Lung Cancer, and Loci Clustering. *Cancer Research* **60**, 4894 -4906 (2000).
8. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
9. Rodenhuis, S. u. a. Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res* **48**, 5738-5741 (1988).
10. Reissmann, P.T., Koga, H., Figlin, R.A., Holmes, E.C. & Slamon, D.J. Amplification and overexpression of the cyclin D1 and epidermal growth factor receptor genes in non-small-cell lung cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **125**, 61-70 (1999).
11. Takahashi, T. u. a. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* **246**, 491-494 (1989).
12. Wistuba, I.I. u. a. High Resolution Chromosome 3p Allelotyping of Human Lung Cancer and Preneoplastic/Preinvasive Bronchial Epithelium Reveals Multiple, Discontinuous Sites of 3p Allele Loss and Three Regions of Frequent Breakpoints. *Cancer Research* **60**, 1949 -1960 (2000).
13. Bray, S.J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 678-689 (2006).
14. Morgan, T.H. The Theory of the Gene. *The American Naturalist* **51**, 513-544 (1917).
15. Collins, B.J., Kleeberger, W. & Ball, D.W. Notch in lung development and lung cancer. *Semin. Cancer Biol* **14**, 357-364 (2004).
16. Logeat, F. u. a. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 8108-8112 (1998).
17. Blaumueller, C. Intracellular Cleavage of Notch Leads to a Heterodimeric Receptor on the Plasma Membrane. *Cell* **90**, 281-291 (1997).
18. Lardelli, M., Dahlstrand, J. & Lendahl, U. The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech. Dev* **46**, 123-136 (1994).
19. Uyttendaele, H. u. a. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* **122**, 2251-2259 (1996).
20. Rebay, I. u. a. Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* **67**, 687-699 (1991).
21. Sanchez-Irizarry, C. u. a. Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. *Mol. Cell. Biol* **24**, 9265-9273 (2004).
22. Tamura, K. u. a. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr. Biol* **5**, 1416-1423 (1995).
23. Lubman, O.Y., Korolev, S.V. & Kopan, R. Anchoring notch genetics and biochemistry; structural analysis of the ankyrin domain sheds light on existing data. *Mol. Cell* **13**, 619-626 (2004).
24. Oswald, F. u. a. p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. *Mol. Cell. Biol* **21**, 7761-7774 (2001).
25. Kurooka, H., Kuroda, K. & Honjo, T. Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse notch1 intracellular region. *Nucleic Acids Res* **26**, 5448-5455 (1998).

26. Kidd, S., Kelley, M.R. & Young, M.W. Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Mol Cell Biol* **6**, 3094-3108 (1986).
27. Wharton, K.A., Johansen, K.M., Xu, T. & Artavanis-Tsakonas, S. Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* **43**, 567-581 (1985).
28. Allenspach, E.J., Maillard, I., Aster, J.C. & Pear, W.S. Notch signaling in cancer. *Cancer Biol. Ther* **1**, 466-476 (2002).
29. Brou, C. u. a. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell* **5**, 207-216 (2000).
30. Mumm, J.S. u. a. A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol. Cell* **5**, 197-206 (2000).
31. Parks, A.L., Klueg, K.M., Stout, J.R. & Muskavitch, M.A. Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* **127**, 1373-1385 (2000).
32. Hsieh, J.J., Zhou, S., Chen, L., Young, D.B. & Hayward, S.D. CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 23-28 (1999).
33. Kao, H.Y. u. a. A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev* **12**, 2269-2277 (1998).
34. Oswald, F. u. a. SHARP is a novel component of the Notch/RBP-J[ $\kappa$ ] signalling pathway. *EMBO J* **21**, 5417-5426 (2002).
35. Wu, L. u. a. MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat. Genet* **26**, 484-489 (2000).
36. Kurooka, H. & Honjo, T. Functional interaction between the mouse notch1 intracellular region and histone acetyltransferases PCAF and GCN5. *J. Biol. Chem* **275**, 17211-17220 (2000).
37. Dumont, E. u. a. Neoplastic transformation by Notch is independent of transcriptional activation by RBP-J signalling. *Oncogene* **19**, 556-561 (2000).
38. Radtke, F. & Raj, K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat. Rev. Cancer* **3**, 756-767 (2003).
39. Iso, T., Kedes, L. & Hamamori, Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J. Cell. Physiol* **194**, 237-255 (2003).
40. Katoh, M. & Katoh, M. Integrative genomic analyses on HES/HEY family: Notch-independent HES1, HES3 transcription in undifferentiated ES cells, and Notch-dependent HES1, HES5, HEY1, HEY2, HEYL transcription in fetal tissues, adult tissues, or cancer. *Int. J. Oncol* **31**, 461-466 (2007).
41. Kageyama, R., Ohtsuka, T. & Tomita, K. The bHLH Gene Hes1 Regulates Differentiation of Multiple Cell Types. *Mol Cells* **10**, 1-7 (2000).
42. Kuroda, K. u. a. Delta-induced Notch Signaling Mediated by RBP-J Inhibits MyoD Expression and Myogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 7238 -7244 (1999).
43. Reizis, B. & Leder, P. Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes & Development* **16**, 295 -300 (2002).
44. Fang, T.C. u. a. Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* **27**, 100-110 (2007).
45. Weng, A.P. u. a. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes & Development* **20**, 2096 -2109 (2006).
46. Palomero, T. u. a. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **103**, 18261-18266 (2006).
47. Ronchini, C. & Capobianco, A.J. Induction of Cyclin D1 Transcription and CDK2 Activity by Notchic: Implication for Cell Cycle Disruption in Transformation by Notchic. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5925-5934 (2001).
48. Rangarajan, A. u. a. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J* **20**, 3427-3436 (2001).
49. Fan, X. u. a. Notch1 and Notch2 Have Opposite Effects on Embryonal Brain Tumor Growth. *Cancer Research* **64**, 7787 -7793 (2004).
50. Balint, K. u. a. Activation of Notch1 signaling is required for beta-catenin-mediated human primary melanoma progression. *J. Clin. Invest* **115**, 3166-3176 (2005).
51. Lefort, K. & Dotto, G.P. Notch signaling in the integrated control of keratinocyte growth/differentiation and tumor suppression. *Semin. Cancer Biol* **14**, 374-386 (2004).
52. Ellisen, L.W. u. a. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* **66**, 649-661 (1991).
53. Weng, A.P. u. a. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia.

- Science* **306**, 269-271 (2004).
54. Demarest, R.M., Ratti, F. & Capobianco, A.J. It's T-ALL about Notch. *Oncogene* **27**, 5082-5091 (0).
  55. Rohn, J., Luring, A., Linenberger, M. & Overbaugh, J. Transduction of Notch2 in feline leukemia virus-induced thymic lymphoma. *J. Virol.* **70**, 8071-8080 (1996).
  56. Gallahan, D. & Callahan, R. The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). *Oncogene* **14**, 1883-1890 (1997).
  57. Smith, G.H. u. a. Constitutive expression of a truncated INT3 gene in mouse mammary epithelium impairs differentiation and functional development. *Cell Growth Differ* **6**, 563-577 (1995).
  58. Harrison, H. u. a. Regulation of Breast Cancer Stem Cell Activity by Signaling through the Notch4 Receptor. *Cancer Research* **70**, 709 -718 (2010).
  59. Li, G., Satyamoorthy, K. & Herlyn, M. N-Cadherin-mediated Intercellular Interactions Promote Survival and Migration of Melanoma Cells. *Cancer Research* **61**, 3819 -3825 (2001).
  60. Haruki, N. u. a. Dominant-Negative Notch3 Receptor Inhibits Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway and the Growth of Human Lung Cancers. *Cancer Research* **65**, 3555 -3561 (2005).
  61. Grynfeld, A., Pählman, S. & Axelson, H. Induced neuroblastoma cell differentiation, associated with transient HES-1 activity and reduced HASH-1 expression, is inhibited by Notch1. *Int. J. Cancer* **88**, 401-410 (2000).
  62. Miyamoto, Y. u. a. Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* **3**, 565-576 (2003).
  63. Talora, C., Sgroi, D.C., Crum, C.P. & Dotto, G.P. Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. *Genes Dev* **16**, 2252-2263 (2002).
  64. Shou, J., Ross, S., Koeppen, H., de Sauvage, F.J. & Gao, W. Dynamics of Notch Expression during Murine Prostate Development and Tumorigenesis. *Cancer Research* **61**, 7291 -7297 (2001).
  65. Sjölund, J. u. a. Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest* **118**, 217-228 (2008).
  66. Nicolas, M. u. a. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* **33**, 416-421 (2003).
  67. Malanchi, I. u. a. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on [bgr]-catenin signalling. *Nature* **452**, 650-653 (2008).
  68. Konishi, J. u. a. Gamma-secretase inhibitor prevents Notch3 activation and reduces proliferation in human lung cancers. *Cancer Res* **67**, 8051-8057 (2007).
  69. Wu, Y. u. a. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature* **464**, 1052-1057 (2010).
  70. Konishi, J. u. a. Notch3 cooperates with the EGFR pathway to modulate apoptosis through the induction of bim. *Oncogene* **29**, 589-596 (2009).
  71. Dang, T.P., Eichenberger, S., Gonzalez, A., Olson, S. & Carbone, D.P. Constitutive activation of Notch3 inhibits terminal epithelial differentiation in lungs of transgenic mice. *Oncogene* **22**, 1988-1997 (0).
  72. Lee, S.M. u. a. Expression of Notch 1 and 3 is related to inhibition of lymph node metastasis and progression in non-small cell lung carcinomas. *Basic and Applied Pathology* **1**, 93-97 (2008).
  73. Chen, Y. u. a. Oxygen concentration determines the biological effects of NOTCH-1 signaling in adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res* **67**, 7954-7959 (2007).
  74. Elias, S. u. a. Notch-1 stimulates survival of lung adenocarcinoma cells during hypoxia by activating the IGF-1R pathway. *Oncogene* **29**, 2488-2498 (2010).
  75. Westhoff, B. u. a. Alterations of the Notch pathway in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **106**, 22293-22298 (2009).
  76. Ullrich, A. & Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203-212 (1990).
  77. Carpenter, G. & Cohen, S. Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem* **265**, 7709-7712 (1990).
  78. Cohen, S., Ushiro, H., Stoscheck, C. & Chinkers, M. A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J. Biol. Chem* **257**, 1523-1531 (1982).
  79. Harris, R.C., Chung, E. & Coffey, R.J. EGF receptor ligands. *Exp. Cell Res* **284**, 2-13 (2003).
  80. Blobel, C.P. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **6**, 32-43 (2005).
  81. Borrell-Pages, M., Rojo, F., Albanell, J., Baselga, J. & Arribas, J. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-[alpha] in tumors. *EMBO J* **22**, 1114-1124 (2003).
  82. Horiuchi, K. u. a. Substrate Selectivity of Epidermal Growth Factor-Receptor Ligand Sheddases

- and their Regulation by Phorbol Esters and Calcium Influx. *Mol. Biol. Cell* **18**, 176-188 (2007).
83. Sahin, U. u. a. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *The Journal of Cell Biology* **164**, 769-779 (2004).
  84. Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M. & Hynes, N.E. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* **16**, 1647-1655 (1997).
  85. Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A. & Hynes, N.E. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* **19**, 3159-3167 (2000).
  86. Schlessinger, J. & Lemmon, M.A. SH2 and PTB Domains in Tyrosine Kinase Signaling. *Sci. STKE* **2003**, re12 (2003).
  87. Pawson, T., Olivier, P., Rozakis-Adcock, M., McClade, J. & Henkemeyer, M. Proteins with SH2 and SH3 Domains Couple Receptor Tyrosine Kinases to Intracellular Signalling Pathways. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* **340**, 279-285 (1993).
  88. Slamon, D.J. u. a. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 177-182 (1987).
  89. Zhou, B.S. u. a. Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell* **10**, 39-50 (2006).
  90. Brabender, J. u. a. Epidermal Growth Factor Receptor and HER2-neu mRNA Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Is Correlated with Survival. *Clinical Cancer Research* **7**, 1850-1855 (2001).
  91. Rusch, V. u. a. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin. Cancer Res* **3**, 515-522 (1997).
  92. Hirsch, F.R. u. a. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J. Clin. Oncol* **21**, 3798-3807 (2003).
  93. Shigematsu, H. u. a. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J. Natl. Cancer Inst* **97**, 339-346 (2005).
  94. Marchetti, A. u. a. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J. Clin. Oncol* **23**, 857-865 (2005).
  95. Drebin, J.A., Link, V.C., Stern, D.F., Weinberg, R.A. & Greene, M.I. Down-modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell* **41**, 697-706 (1985).
  96. Cohenuram, M. & Saif, M.W. Panitumumab the first fully human monoclonal antibody: from the bench to the clinic. *Anticancer Drugs* **18**, 7-15 (2007).
  97. Romond, E.H. u. a. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med* **353**, 1673-1684 (2005).
  98. Humblet, Y. Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opin Pharmacother* **5**, 1621-1633 (2004).
  99. Jakobovits, A., Amado, R.G., Yang, X., Roskos, L. & Schwab, G. From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotech* **25**, 1134-1143 (2007).
  100. Pao, W. u. a. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 13306-13311 (2004).
  101. Lynch, T.J. u. a. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med* **350**, 2129-2139 (2004).
  102. Giaccone, G. u. a. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J. Clin. Oncol* **22**, 777-784 (2004).
  103. Herbst, R.S. u. a. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J. Clin. Oncol* **22**, 785-794 (2004).
  104. Peschon, J.J. u. a. An Essential Role for Ectodomain Shedding in Mammalian Development. *Science* **282**, 1281-1284 (1998).
  105. Edwards, D.R., Handsley, M.M. & Pennington, C.J. The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med* **29**, 258-289 (2008).
  106. Stöcker, W. u. a. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci* **4**, 823-840 (1995).
  107. Black, R.A. u. a. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**, 729-733 (1997).
  108. Moss, M.L. u. a. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-

- necrosis factor-alpha. *Nature* **385**, 733-736 (1997).
109. Schlöndorff, J., Becherer, J.D. & Blobel, C.P. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J* **347**, 131-138 (2000).
  110. Black, R.A. & White, J.M. ADAMs: focus on the protease domain. *Current Opinion in Cell Biology* **10**, 654-659 (1998).
  111. Gschwind, A., Hart, S., Fischer, O.M. & Ullrich, A. TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J* **22**, 2411-2421 (2003).
  112. Chalaris, A. u. a. Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* **110**, 1748-1755 (2007).
  113. Huovila, A.J., Turner, A.J., Pelto-Huikko, M., Kärkkäinen, I. & Ortiz, R.M. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 413-422 (2005).
  114. Zhao, J. u. a. Pulmonary Hypoplasia in Mice Lacking Tumor Necrosis Factor-[alpha] Converting Enzyme Indicates an Indispensable Role for Cell Surface Protein Shedding during Embryonic Lung Branching Morphogenesis. *Developmental Biology* **232**, 204-218 (2001).
  115. Shi, W. u. a. TACE is required for fetal murine cardiac development and modeling. *Developmental Biology* **261**, 371-380 (2003).
  116. Franovic, A. u. a. Multiple Acquired Renal Carcinoma Tumor Capabilities Abolished upon Silencing of ADAM17. *Cancer Research* **66**, 8083 -8090 (2006).
  117. Kenny, P.A. & Bissell, M.J. Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer. *J. Clin. Invest* **117**, 337-345 (2007).
  118. Blanchot-Jossic, F. u. a. Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. *J. Pathol* **207**, 156-163 (2005).
  119. Vetter, I.R. & Wittinghofer, A. The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions. *Science* **294**, 1299-1304 (2001).
  120. Wennerberg, K., Rossman, K.L. & Der, C.J. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* **118**, 843-846 (2005).
  121. Malumbres, M. & Barbacid, M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* **3**, 459-465 (2003).
  122. HARVEY, J.J. An Unidentified Virus which causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature* **204**, 1104-1105 (1964).
  123. Kirsten, W.H. & Mayer, L.A. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J. Natl. Cancer Inst* **39**, 311-335 (1967).
  124. Goldfarb, M., Shimizu, K., Perucho, M. & Wigler, M. Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Nature* **296**, 404-409 (1982).
  125. Shih, C., Padhy, L.C., Murray, M. & Weinberg, R.A. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* **290**, 261-264 (1981).
  126. Pulciani, S. u. a. Oncogenes in human tumor cell lines: molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **79**, 2845-2849 (1982).
  127. Hall, A., Marshall, C.J., Spurr, N.K. & Weiss, R.A. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature* **303**, 396-400 (1983).
  128. Esteban, L.M. u. a. Targeted Genomic Disruption of H-ras and N-ras, Individually or in Combination, Reveals the Dispensability of Both Loci for Mouse Growth and Development. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1444-1452 (2001).
  129. Plowman, S.J. u. a. While K-ras Is Essential for Mouse Development, Expression of the K-ras 4A Splice Variant Is Dispensable. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 9245-9250 (2003).
  130. Johnson, L. u. a. K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev* **11**, 2468-2481 (1997).
  131. Simon, J.A. & Schreiber, S.L. Grb2 SH3 binding to peptides from Sos: evaluation of a general model for SH3-ligand interactions. *Chemistry & Biology* **2**, 53-60 (1995).
  132. Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, J., Pawson, T. & Bowtell, D. The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* **363**, 83-85 (1993).
  133. Schmidt, A. & Hall, A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes & Development* **16**, 1587-1609 (2002).
  134. Bernards, A. & Settleman, J. GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol* **14**, 377-385 (2004).
  135. Herrmann, C. Ras-effector interactions: after one decade. *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 122-129 (2003).
  136. Repasky, G.A., Chenette, E.J. & Der, C.J. Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends in Cell Biology* **14**, 639-647 (2004).
  137. Schubbert, S., Shannon, K. & Bollag, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and

- cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 295-308 (2007).
138. Maldonado, J.L., Timmerman, L., Fridlyand, J. & Bastian, B.C. Mechanisms of Cell-Cycle Arrest in Spitz Nevi with Constitutive Activation of the MAP-Kinase Pathway. *Am J Pathol* **164**, 1783-1787 (2004).
  139. Vivanco, I. & Sawyers, C.L. The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 489-501 (2002).
  140. Bos, J.L. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**, 4682-4689 (1989).
  141. Verlaan-de Vries, M. u. a. A dot-blot screening procedure for mutated ras oncogenes using synthetic oligodeoxynucleotides. *Gene* **50**, 313-320 (1986).
  142. Smit, V.T. u. a. KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res* **16**, 7773-7782 (1988).
  143. Vogelstein, B. u. a. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med* **319**, 525-532 (1988).
  144. van Engeland, M. u. a. K-ras mutations and RASSF1A promoter methylation in colorectal cancer. *Oncogene* **21**, 3792-3795 (2002).
  145. Keller, J.W. u. a. Oncogenic KRAS provides a uniquely powerful and variable oncogenic contribution among RAS family members in the colonic epithelium. *J. Cell. Physiol* **210**, 740-749 (2007).
  146. Scheffzek, K. u. a. The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants. *Science* **277**, 333 -339 (1997).
  147. Rodenhuis, S. u. a. Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. *N. Engl. J. Med* **317**, 929-935 (1987).
  148. Riely, G.J., Marks, J. & Pao, W. KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Proc Am Thorac Soc* **6**, 201-205 (2009).
  149. Chen, B., Johanson, L., Wiest, J.S., Anderson, M.W. & You, M. The second intron of the K-ras gene contains regulatory elements associated with mouse lung tumor susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1589-1593 (1994).
  150. Meuwissen, R. & Berns, A. Mouse models for human lung cancer. *Genes Dev* **19**, 643-664 (2005).
  151. Geick, A. u. a. Uteroglobin promoter-targeted c-MYC expression in transgenic mice cause hyperplasia of Clara cells and malignant transformation of T-lymphoblasts and tubular epithelial cells. (2001).
  152. DeMayo, F.J. u. a. Expression of SV40 T antigen under control of rabbit uteroglobin promoter in transgenic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **261**, L70-76 (1991).
  153. Zhao, B. u. a. Phenotypic consequences of lung-specific inducible expression of FGF-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 5898-5903 (2001).
  154. Perl, A.T., Tichelaar, J.W. & Whitsett, J.A. Conditional gene expression in the respiratory epithelium of the mouse. *Transgenic Res* **11**, 21-29 (2002).
  155. Fisher, G.H. u. a. Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. *Genes & Development* **15**, 3249 -3262 (2001).
  156. Jackson, E.L. u. a. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes & Development* **15**, 3243-3248 (2001).
  157. Sauer, B. & Henderson, N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5166-5170 (1988).
  158. Specht, K. u. a. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am. J. Pathol* **158**, 419-429 (2001).
  159. Giulietti, A. u. a. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **25**, 386-401 (2001).
  160. Mullis, K. u. a. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* **51 Pt 1**, 263-273 (1986).
  161. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**, 248-254 (1976).
  162. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **76**, 4350-4354 (1979).
  163. DuPage, M., Dooley, A.L. & Jacks, T. Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of Cre recombinase. *Nat. Protocols* **4**, 1064-1072 (2009).
  164. Jackson, E.L. u. a. The Differential Effects of Mutant p53 Alleles on Advanced Murine Lung Cancer. *Cancer Research* **65**, 10280 -10288 (2005).
  165. Sunnarborg, S.W. u. a. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme (TACE) Regulates Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Availability. *Journal of Biological Chemistry* **277**,

- 12838 -12845 (2002).
166. Hart, S., Fischer, O.M. & Ullrich, A. Cannabinoids Induce Cancer Cell Proliferation via Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -Converting Enzyme (TACE/ADAM17)-Mediated Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Cancer Research* **64**, 1943 -1950 (2004).
167. Davies, B., Brown, P.D., East, N., Crimmin, M.J. & Balkwill, F.R. A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice bearing human ovarian carcinoma xenografts. *Cancer Res* **53**, 2087-2091 (1993).
168. Woodburn, J.R. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol. Ther* **82**, 241-250 (1999).
169. van Tetering, G. u. a. Metalloprotease ADAM10 is required for Notch1 site 2 cleavage. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 11754 (2010).
170. Grootveld, M. & McDermott, M.F. BMS-561392. Bristol-Myers Squibb. *Curr Opin Investig Drugs* **4**, 598-602 (2003).
171. Purow, B.W. u. a. Notch-1 regulates transcription of the epidermal growth factor receptor through p53. *Carcinogenesis* **29**, 918 -925 (2008).
172. Jänicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R. & Porter, A.G. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem* **273**, 9357-9360 (1998).
173. Radtke, F. u. a. Deficient T Cell Fate Specification in Mice with an Induced Inactivation of Notch1. *Immunity* **10**, 547-558 (1999).
174. Besseyrias, V. u. a. Hierarchy of Notch–Delta interactions promoting T cell lineage commitment and maturation. *The Journal of Experimental Medicine* **204**, 331 -343 (2007).
175. Anton, M. & Graham, F. Site-specific recombination mediated by an adenovirus vector expressing the Cre recombinase protein: a molecular switch for control of gene expression. *J. Virol.* **69**, 4600-4606 (1995).
176. Soriano, P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* **21**, 70-71 (1999).
177. Ono, Y., Sensui, H., Okutsu, S. & Nagatomi, R. Notch2 negatively regulates myofibroblastic differentiation of myoblasts. *J. Cell. Physiol* **210**, 358-369 (2007).
178. Sun, Z. u. a. Histologic grade is an independent prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer: An analysis of 5018 hospital- and 712 population-based cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* **131**, 1014-1020 (2006).
179. Gerdes, J. u. a. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol* **133**, 1710-1715 (1984).
180. Vallier, L. u. a. Early Cell Fate Decisions of Human Embryonic Stem Cells and Mouse Epiblast Stem Cells Are Controlled by the Same Signalling Pathways. *PLoS ONE* **4**, e6082 (2009).
181. Wodarz, A. & Nusse, R. MECHANISMS OF WNT SIGNALING IN DEVELOPMENT. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **14**, 59-88 (1998).
182. Turner, N. & Grose, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 116-129 (2010).
183. Sunaga, N. u. a. Constitutive activation of the Wnt signaling pathway by CTNNB1 (beta-catenin) mutations in a subset of human lung adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **30**, 316-321 (2001).
184. Leong, K.G. & Karsan, A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood* **107**, 2223-2233 (2006).
185. Ringel, J. u. a. Aberrant Expression of a Disintegrin and Metalloproteinase 17/Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme Increases the Malignant Potential in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Research* **66**, 9045 -9053 (2006).
186. Karan, D. u. a. Expression of ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) and TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) in human prostatic adenocarcinomas. *Int. J. Oncol* **23**, 1365-1371 (2003).
187. Hynes, N.E. & Lane, H.A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 341-354 (2005).
188. Post, L.C., Ternet, M. & Hogan, B.L. Notch/Delta expression in the developing mouse lung. *Mech. Dev* **98**, 95-98 (2000).
189. Weijzen, S. u. a. Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat. Med* **8**, 979-986 (2002).
190. Dang, T.P. u. a. Chromosome 19 Translocation, Overexpression of Notch3, and Human Lung Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **92**, 1355 -1357 (2000).
191. Choi, K. u. a. Distinct biological roles for the notch ligands Jagged-1 and Jagged-2. *J. Biol. Chem* **284**, 17766-17774 (2009).
192. Mazzone, M. u. a. Dose-dependent induction of distinct phenotypic responses to Notch pathway

- activation in mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **107**, 5012-5017 (2010).
193. Mueller, M.M. & Fusenig, N.E. Friends or foes [mdash] bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**, 839-849 (2004).
  194. Downward, J. Targeting RAS and PI3K in lung cancer. *Nat Med* **14**, 1315-1316 (2008).
  195. Tang, X. u. a. Epidermal Growth Factor Receptor Abnormalities in the Pathogenesis and Progression of Lung Adenocarcinomas. *Cancer Prevention Research* **1**, 192 -200 (2008).
  196. Davis, R.L. & Turner, D.L. Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* **20**, 8342-8357 (2001).
  197. Kefas, B. u. a. microRNA-7 Inhibits the Epidermal Growth Factor Receptor and the Akt Pathway and Is Down-regulated in Glioblastoma. *Cancer Research* **68**, 3566 -3572 (2008).
  198. Weiss, G.J. u. a. EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. *Annals of Oncology* **19**, 1053 -1059 (2008).
  199. Mittal, S., Subramanyam, D., Dey, D., Kumar, R.V. & Rangarajan, A. Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis. *Mol Cancer* **8**, 128-128
  200. Yoo, A.S., Bais, C. & Greenwald, I. Crosstalk Between the EGFR and LIN-12/Notch Pathways in *C. elegans* Vulval Development. *Science* **303**, 663 -666 (2004).
  201. Northwood, I.C., Gonzalez, F.A., Wartmann, M., Raden, D.L. & Davis, R.J. Isolation and characterization of two growth factor-stimulated protein kinases that phosphorylate the epidermal growth factor receptor at threonine 669. *J. Biol. Chem* **266**, 15266-15276 (1991).
  202. Song, G., Ouyang, G. & Bao, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med* **9**, 59-71 (2005).
  203. Weihua, Z. u. a. Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity. *Cancer Cell* **13**, 385-393 (2008).
  204. Parr, C., Watkins, G. & Jiang, W.G. The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumour clinicopathological parameters in human breast cancer. *Int. J. Mol. Med* **14**, 779-786 (2004).
  205. Mazur, P.K. u. a. Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **107**, 13438-13443 (2010).
  206. Riede, U.N., Werner, M. & Freudenberg, N. *Basiswissen allgemeine und spezielle Pathologie*. (Springer: 2009).
  207. Solecki, D.J., Liu, X., Tomoda, T., Fang, Y. & Hatten, M.E. Activated Notch2 Signaling Inhibits Differentiation of Cerebellar Granule Neuron Precursors by Maintaining Proliferation. *Neuron* **31**, 557-568 (2001).
  208. Cheng, H. u. a. Notch2 (but not Notch1) is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Development* **134**, 801-811 (2007).
  209. Allman, D., Aster, J.C. & Pear, W.S. Notch signaling in hematopoiesis and early lymphocyte development. *Immunol. Rev* **187**, 75-86 (2002).
  210. Bigas, A., Martin, D.I. & Milner, L.A. Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol. Cell. Biol* **18**, 2324-2333 (1998).
  211. Kraman, M. & McCright, B. Functional conservation of Notch1 and Notch2 intracellular domains. *The FASEB Journal* **19**, 1311 -1313 (2005).
  212. Hozumi, K. u. a. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med* **205**, 2507-2513 (2008).
  213. Hicks, C. u. a. Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nat. Cell Biol* **2**, 515-520 (2000).
  214. Dowell, J.E. & Minna, J.D. EGFR mutations and molecularly targeted therapy: a new era in the treatment of lung cancer. *Nat Clin Prac Oncol* **3**, 170-171 (2006).
  215. Wong, D.W. u. a. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer* **115**, 1723-1733 (2009).
  216. Takeuchi, K. u. a. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin. Cancer Res* **14**, 6618-6624 (2008).
  217. Perner, S. u. a. EML4-ALK Fusion Lung Cancer: A Rare Acquired Event. *Neoplasia* **10**, 298-302 (2008).
  218. Kwak, E.L. u. a. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med* **363**, 1693-1703 (2010).
  219. Nagata, Y. u. a. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* **6**, 117-127 (2004).
  220. Brown, P.D. & Giavazzi, R. Matrix metalloproteinase inhibition: A review of anti-tumour activity. *Annals of Oncology* **6**, 967 -974 (1995).

221. Brown, P.D. Ongoing trials with matrix metalloproteinase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* **9**, 2167-2177 (2000).
222. Moss, M.L., Sklair-Tavron, L. & Nudelman, R. Drug insight: tumor necrosis factor-converting enzyme as a pharmaceutical target for rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* **4**, 300-309 (2008).
223. DasGupta, S., Murumkar, P.R., Giridhar, R. & Yadav, M.R. Current perspective of TACE inhibitors: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**, 444-459 (2009).
224. van Es, J.H. u. a. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435**, 959-963 (2005).
225. Li, K. u. a. Modulation of Notch Signaling by Antibodies Specific for the Extracellular Negative Regulatory Region of NOTCH3. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 8046 -8054 (2008).



## 7. Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
$\lambda$	Wellenlänge
$\mu\text{g}$	$10^{-6}$ Gramm
$\mu\text{l}$	$10^{-6}$ Liter
$\mu\text{mol}$	$10^{-6}$ Mol
$\mu\text{M}$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	$10^{-6}$ Mol/Liter
Abb.	Abbildung
A.d.	<i>Aqua destillata</i>
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
ADAM17	<i>a disintegrin and metalloproteinase 17</i>
AdCre	Adenovirus mit Cre-exprimierenden Vektor
ANK	<i>Ankryn-Repeats</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BB-94	Batimastat-94
BMS	Bristol-Myers Squibb-561392
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
C	Celsius
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
D	Aspartat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i> Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E1A	<i>Adenovirus early antigen 1A</i>
ECD	extrazelluläre Domäne
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )

EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor ( <i>epidermal growth factor receptor</i> )
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i>
f	gefloxtes Allel
FACS	Durchflusszytometer ( <i>fluorescence activated cell scan</i> )
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor ( <i>fibroblast growth factor</i> )
for	vorwärts ( <i>forward</i> )
FS	Vorwärtsstreulicht ( <i>forward scatter</i> )
G	Glycin, Guanosin
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GDP	Guanosin Diphosphat
GTP	Guanosin Triphosphat
GSI	γ-Sekretase Inhibitor
Gy	Gray (1 Gy=1 J/kg)
h	human / Stunde
HB-EGF	<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HD	Heterodimerisierungsdomäne
HE	Hämatoxylin Eosin
HEK	Humane embryonale Nierenzellen ( <i>human embryonic kidney cells</i> )
HES1	<i>Hairy/Enhancer of Split</i>
HRP	Meerrettich Peroxidase (horseradish peroxydase)
IHC	Immunhistochemie
i.p.	<i>intra peritoneal</i> (in den Bauch)
JMD	juxtamembranäre Domäne
kb	Kilobase(n), 1000 Basenpaare
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
KO	<i>Knockout</i>
Kras	Kirsten-ras
Kras <sup>G12D</sup>	Kirsten-ras mit Mutation in Codon 12 von Glycin zu Aspartat
LB	Luria-Bertani
log	logarithmisch
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	murin/ Milli (10 <sup>-3</sup> )
M	Marker/ Mol pro Liter, molar

mA	Milliampere
mAK	monoklonaler Antikörper
MAML	<i>Mastermind-like</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
min	Minute(n)
miRNA	Mikro RNA
mM (mmol/l)	10 <sup>-3</sup> Mol/Liter
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
n	nano
N1	Notch1
N1 <sup>IC</sup>	Notch1 intrazelluläres Fragment
N1 <sup>TM</sup>	Notch1 Transmembran
N2	Notch2
NCR	<i>notch cytokin response</i>
ng	10 <sup>-9</sup> Gramm, Nanogramm
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
nm	10 <sup>-9</sup> Meter, Nanometer
nM (nmol/l)	10 <sup>-9</sup> Mol/Liter
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom ( <i>non-small cell lung cancer</i> )
p	Phospho
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PBST	PBS mit 0,1% Tween 20
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>Plaque forming units</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i> (neg. dek. Logarithmus der Protonenkonzentration)
PI	Propidiumiodid
PI-3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pY	Phosphotyrosin
Raf	<i>Rapidly growing fibrosarcom</i>
rev	Rückwärts (reverse)

---

RKE	Nierenzellen von Ratten ( <i>rat kidney epithelial cells</i> )
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT	Reverse Transkriptase / Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde
S1	Schnittstelle 1
S2	Schnittstelle 2
S3	Schnittstelle 3
SCLC	kleinzelliges Bronchialkarzinom ( <i>small cell lung cancer</i> )
SH	Src-homology
shRNA	<i>small hairpin</i> RNA
SS	Seitwärtsstreulicht (sideward scatter)
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SH2	Src Homologie 2
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAD	Translationelle Aktivierungsdomäne
T-ALL	T-Zell-akute lymphatische Leukämie ( <i>T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma</i> )
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF $\alpha$	<i>Transforming growth factor alpha</i>
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
THC	$\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (unit)
u.a.	unter anderem
Rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
V	Volt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fl-D-galactopyranosid
Y	Tyrosin

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Stammbaum der Notch Rezeptoren .....	9
Abb. 1.2 Struktur der humanen Notch Rezeptoren (modifiziert nach Allenspach <i>et al.</i> <sup>28</sup> ).....	11
Abb. 1.3 Der Notch Signalweg (modifiziert nach Radtke und Raj. <sup>38</sup> ).....	12
Abb. 1.4 Schematische Darstellung des EGFR und der EGFR-vermittelten Signaltransduktion.....	17
Abb. 1.5 Schematische Darstellung der Metalloproteinase ADAM17 (modifiziert nach Black und White <sup>110</sup> ).....	19
Abb. 1.6 Ras-vermittelte Aktivierung von Signaltransduktionswegen nach Malumbres und Barbacid <sup>121</sup> .....	20
Abb. 1.7 Schematische Darstellung der konditionell exprimierten Kras <sup>G12D</sup> Allele .....	24
Abb. 3.1 ADAM17 vermittelte EGFR Signaltransduktion in H292 Zellen .....	59
Abb. 3.2 ADAM17 Inhibition blockiert die Transformation von NSCLC Zellen EGFR-abhängig und - unabhängig .....	60
Abb. 3.3 ADAM17 <i>Knockdown</i> blockiert die Transformation von NSCLC Zellen EGFR- abhängig und -unabhängig .....	61
Abb. 3.4 Einfluss von ADAM17 Expression auf die Proliferation von H292 Zellen .....	62
Abb. 3.5 Einfluss von ADAM17 Expression auf das Überleben von H292 Zellen.....	63
Abb. 3.6 Konditionierter Überstand von WT-H292 Zellen enthält keine löslichen Faktoren die proliferationsfördernd sind .....	64
Abb. 3.7 Expressionsanalyse von Notch Rezeptoren und seiner Liganden auf NSCLC Zellen .....	65
Abb. 3.8 ADAM17 vermittelt Notch1 Aktivierung in H292 Zellen .....	66
Abb. 3.9 ADAM17 vermitteltes Wachstum und Analyse von Tumoren in Nacktmäusen.....	67
Abb. 3.10 Der Notch1 <i>Knockdown</i> reduziert die Transformation von NSCLC Zellen.....	69
Abb. 3.11 Der transformierte Phänotyp von NSCLC Zellen wird von der Notch1 <sup>IC</sup> Expression moduliert .....	70
Abb. 3.12 Modulation von Proliferation und Überleben durch Notch1 <sup>IC</sup> Expression .....	71
Abb. 3.13 Notch1 und ADAM17 <i>Knockdown</i> reduzieren die EGFR Proteinexpression .....	72
Abb. 3.14 Notch1 <i>Knockdown</i> reguliert EGFR auf transkriptioneller Ebene .....	73
Abb. 3.15 Notch1 Aktivierung steigert die EGFR Expression.....	73
Abb. 3.16 Einfluss von shN1 auf die p53 Proteinexpression .....	74
Abb. 3.17 EGFR-abhängige Signaltransduktion in H292 Zellen mit Notch1 <i>Knockdown</i> .....	75

---

Abb. 3.18 EGF Supplementation antagonisiert nicht die durch Notch1 <i>Knockdown</i> entstandenen Defizite hinsichtlich Transformation, Proliferation und Apoptose .....	76
Abb. 3.19 Auswirkung einzelner Behandlungsstrategien auf das Überleben von H292 Zellen .....	77
Abb. 3.20 Immunhistochemie humaner Lungengewebeprobe(n) .....	78
Abb. 3.21 Korrelation der Proteinexpression in humanen Gewebeprobe(n) .....	79
Abb. 3.22 Schematische Darstellung der Lokalisation der <i>loxP</i> Sequenzen bei konditionellen Notch1 und Notch2 Mäusen .....	80
Abb. 3.23 Schematische Darstellung der Lokalisation der <i>loxP</i> Sequenzen im <i>lacZ</i> Gen ....	82
Abb. 3.24 Nachweis der Cre-Aktivität durch X-Gal Färbung .....	83
Abb. 3.25 Die verschiedenen Genotypen zeigen Unterschiede beim Überleben .....	84
Abb. 3.26 Analyse der Tumorflächen in der Lunge 6 Monate nach Induktion .....	86
Abb. 3.27 Analyse der Tumorflächen in der Lunge zum terminalen Zeitpunkt.....	87
Abb. 3.28 Darstellung der Tumordifferenzierungsgrade in einer konditionellen <i>Kras</i> <sup>G12D</sup> Maus .....	89
Abb. 3.29 Quantifizierung des Tumordifferenzierungsgrad .....	90
Abb. 3.30 Morphologie der Tumoren .....	91
Abb. 3.31 Analyse der Proliferationsrate der Tumoren 6 Monate nach Induktion.....	92
Abb. 3.32 Analyse der Proliferationsrate der Tumoren zum terminalen Zeitpunkt.....	93
Abb. 4.1 Schematische Darstellung der ADAM17 vermittelten Prozesse in NSCLC Zellen .	95
Abb. 4.2 Schematische Darstellung der EGFR Regulation durch Notch1 .....	101

## 9. Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1 Expression von ADAM17, Notch1, EGFR und HES1 in humanen Lungengewebeproben.....	78
Tab. 3.2 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Maus Genotypen.....	81
Tab. 3.3 Zusammenfassung der Daten aus den Überlebensexperimenten.....	85

## 10. Publikationen

Baumgart A., Seidl S., Vlachou P., Michel L., Mitova N., Schatz N., Specht K., Koch I., Schuster T., Grundler R., Kremer M., Fend F., Siveke JT., Peschel C., Duyster J., Dechow T. „ADAM17 regulates epidermal growth factor receptor expression through the activation of Notch1 in non-small cell lung cancer.“ *Cancer Res.* 2010 Jul 1;70(13):5368-78.

Baumgart A., Siveke S., Mitova N., Anton M., Wildgruber M., Braren R., Prazeres da Costa O., Walch A., Feuchtinger A., Loddenkemper C., Rudelius M., Peschel C., Duyster J., Dechow T. „Notch2 regulates differentiation and tumorigenicity of adenocarcinomas in a KRAS<sup>G12D</sup>-driven murine NSCLC model.“ Manuskript in Bearbeitung



## 11. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und geholfen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Tobias Dechow für die Möglichkeit dieses interessante Thema in seiner Forschungsgruppe bearbeiten zu dürfen. Vielen Dank für die hervorragende Betreuung, engagierte Unterstützung und wissenschaftlichen Ratschläge.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Küster für die freundliche Bereitschaft, diese Arbeit von Seiten des Wissenschaftszentrums Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zu betreuen.

Bei Herrn Prof. Dr. Christian Peschel und Herrn Prof. Dr. Justus Duyster möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Hämatologischen Forschungslabor am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den wissenschaftlichen Kooperationspartnern: Herrn PD Dr. Jens Siveke, Frau Dr. Martina Anton, Herrn Dr. Stefan Seidl und Herrn Prof Dr. Axel Walch für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Allen Mitgliedern des Labors möchte ich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft bezüglich dem Erlernen neuer Methoden, hilfreichen Anregungen und Tricks des täglichen Laboralltags danken. Danke auch für die tolle Arbeitsatmosphäre. Ein dickes Dankeschön gilt dabei besonders Nadya Mitova, die mir in den letzten Monaten sehr geholfen hat.

Meinen lieben Eltern, meiner Familie und meinen Freunden möchte ich danken, da sie mich in jeder Situation unterstützt haben und mich ermutigt haben, alle meine Ziele zu verfolgen.

Das Beste zum Schluss: Jens, vielen Dank, dass du immer für mich da warst!