

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

Medizin

FG Klinische und Experimentelle Pathologie

Medizinischer Direktor: Prof. Dr. med. Peter Zabel

**„Untersuchungen zum TGF β -Signalweg bei
Lungenerkrankungen unter besonderer Berücksichtigung
des Pseudorezeptors BAMBI“**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Sebastian Alexander Marwitz

aus Lübeck

Lübeck 2014

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Torsten Goldmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2014

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 30.06.2014

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
1. EINLEITUNG.....	6
1.1. LUNGENERKRANKUNGEN.....	6
1.1.1. Nichtneoplastische Lungenerkrankungen.....	7
1.1.2. Neoplastische Lungenerkrankungen: Lungenkrebs.....	9
1.2. DER TGF β -SIGNALWEG.....	11
1.2.1. Der TGF β -Signalweg bei Lungenerkrankungen: Fibrosierung, EMT und Karzinogenese	14
1.2.2. BAMBI und der TGF β -Signalweg.....	16
1.3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	18
2. MATERIAL UND METHODEN.....	19
2.1. PATIENTENMATERIAL UND ETHIK.....	19
2.2. PROZESSIERUNG VON BIOLOGISCHEN MATERIALIEN	20
2.2.1. FIXIERUNG VON GEWEBE MITTELS HOPE UND FORMALIN.....	20
2.2.2. HERSTELLUNG VON GEWEBE-ARRAYS.....	21
2.2.3. Ex-vivo-Stimulation von Geweben und Zellen	22
2.3. TIERVERSUCHE: BLEOMYCIN-MODELL DER LUNGENFIBROSE	22
2.3.1. Verwendete Mausstämme.....	22
2.3.2. Induktion von Lungenfibrose mittels Bleomycin.....	23
2.3.3. Einbettung von Tiergeweben	24
2.3.4. Standard-Entfaltung von Lungengewebe.....	24
2.3.5. Einbettung in Agarose und stereologische Aufarbeitung.....	25
2.3.6. Quantifizierung von murinem TGF β in BAL und Ex-vivo-Kulturüberstand	25
2.4. HISTOLOGISCHE UND ZYTOLOGISCHE TECHNIKEN.....	25
2.4.1. Entparaffinierung.....	26
2.4.2. Histochemie.....	26
2.4.3. Immunhistochemie.....	28
2.5. FLUORESCENZFÄRBUNGEN.....	31
2.5.1. Darstellung vom Aktin-Zytoskelett mittels Rhodamin-konjugiertem Phalloidin	31
2.5.2. Immunfluoreszenzfärbungen.....	32
2.5.3. Bildanalytische Auswertung mit ImageJ.....	33
2.6. DURCHFLUSSZYTOMETRIE	33
2.6.1. Annexin-V Assay.....	33
2.6.2. Fluoreszenzaktivierte Zell-Sortierung	35
2.7. MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNIKEN	35
2.7.1. Isolierung von Nukleinsäuren aus Frisch- und Paraffin-Material	35
2.7.2. Nukleinsäurequantifizierung- und Qualitätskontrolle	38
2.7.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) für Genotypisierung.....	39
2.7.4. Agarose-Gelelektrophorese.....	39
2.7.5. Epigenetische Untersuchungen.....	40
2.7.6. cDNA-Synthese.....	40
2.7.7. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	41
2.7.8. Transkriptom-Analyse.....	42
2.7.9. Transiente Transfektion von A549-Zellen mit Expressionsplasmiden.....	47
2.7.10. Retrovirale Transfektion	48

2.8. PROTEINBIOCHEMISCHE TECHNIKEN.....	48
2.8.1. Quantifizierung intrazellulären Kollagens mittels Sirius-Red.....	48
2.8.2. MTT-Assay.....	48
2.9. ZELLKULTUR.....	49
2.9.1. Dauerzellkultur immortalisierter Zelllinien.....	49
2.9.2. Isolierung und Kultivierung Alveolärer Epithelzellen Typ II (AECII).....	49
2.9.3. Zytozentrifugationspräparation.....	51
2.10. STATISTISCHE AUSWERTUNG UND DATENDARSTELLUNG.....	51
3. ERGEBNISSE.....	52
3.1. BAMBI UND DER TGF β -SIGNALWEG BEI NICHTNEOPLASTISCHEN LUNGENERKRANKUNGEN	52
3.1.1. Histologische Darstellung des TGF β -Signalwegs.....	52
3.1.2. Der Einfluss von BAMBI auf Fibrosierung	56
3.1.2. Versuch zur Etablierung einer stabil-transfizierten Zelllinie	63
3.1.3. Der Einfluß von TGF β auf EMT und Fibrosierung in AECII.....	64
3.2. BAMBI UND DER TGF β -SIGNALWEG BEI LUNGENKREBS.....	76
3.2.1. Lokalisierung der Signalwegsmediatoren auf Proteinebene	76
3.2.2. Darstellung des TGF β -Signalwegs und BAMBI in Tumorzelllinien	81
3.2.3. Die Genexpression des TGF β -Signalwegs im Patientengewebe.....	82
3.2.4. Epigenetische Untersuchungen des TGF β -Signalwegs bei Lungenkrebs.....	89
3.2.5. Einfluss der Überexpression von BAMBI in Lungenkrebszellen	92
3.2.6. Anzeichen für EMT in Lungenkrebsgeweben.....	96
4. DISKUSSION	101
4.1. DER TGF β -SIGNALWEG UND BAMBI: FIBROSIERUNG DURCH EMT?.....	101
4.1.1. Differenzielle Expression der Signalwegsmediatoren bei IPF, Emphysem und COPD-freier Lunge	101
4.1.2. Einfluss von Bambi ^{-/-} auf die bleomycininduzierte, murine Lungenfibrose.....	102
4.1.3. AECII zeigen EMT-Eigenschaften und produzieren TGF β -abhängig Kollagen.....	105
4.2. DER TGF β -SIGNALWEG BEI LUNGENKREBS	111
4.2.1. Organspezifische Beteiligung des Signalwegs in der Karzinogenese?.....	111
4.3. BAMBI ALS MÖGLICHER TUMORSUPPRESSOR BEI LUNGENKREBS	116
4.4. SYNOPSIS: TGF-SIGNALING BEI FIBROSE UND KREBS	121
5. AUSBLICK.....	122
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	123
7. ABSTRACT	124
8. LITERATURVERZEICHNIS	126
9. APPENDIZES	139
APPENDIX I :VERWENDETES PATIENTENMATERIAL FÜR IHC	139
APPENDIX II :VERWENDETE PRIMÄRANTIKÖRPER	144
APPENDIX III: VERWENDETE REAGENZIEN & CHEMIKALIEN.....	145
APPENDIX IV: VERWENDETE GERÄTE	147
APPENDIX V: VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE.....	148
APPENDIX VI: ERGEBNISSE DER GO-ANALYSE.....	148
APPENDIX VII: INPUT-LISTE FÜR MICROARRAY-ANALYSEN TGF β WEG	153
APPENDIX VIII: INPUT LISTE FÜR MICROARRAY-ANALYSEN ECM-MOLEKÜLE	154
10. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	157

11. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	159
12. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	161
12.1. PEER-REVIEWED ARTICLES	161
12.2. POSTER-PRÄSENTATIONEN & VORTRÄGE AUF KONGRESSEN:	162
13. ERKLÄRUNG	164
14. DANKSAGUNG	165

1. Einleitung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist der *Transforming Growth Factor beta* (TGF β) Signalweg bei Lungenerkrankungen unter Berücksichtigung des neuentdeckten Pseudorezeptors *BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor* (BAMBI). TGF β -Signale steuern Embryonalentwicklung, Morphogenese, Gewebekomöostase und sind in der lokalen Immunmodulation beteiligt. Alterationen der normalen Signalwegsaktivität sind unter anderem bei der Pathogenese von Fibrosierungen (Crosby & Waters 2010) und Krebs (Jeon & Jen 2010) maßgeblich involviert. TGF β -abhängige Fibrosierungsreaktionen stehen an zentraler Stelle der *Remodelling*-assoziierten Lungenerkrankungen. Besonders der Ursprung der kollagenproduzierenden Zellen in der Pathophysiologie der Lungenfibrose ist bisher ungeklärt. Ebenso wenig ist das Verständnis der dualen Rolle vom TGF β -Signalweg mit seinen tumorsuppressiven und tumorfördernden Eigenschaften und daraus entstehenden Folgen bei Krebs als vollständig zu bezeichnen. Genau an diesen Punkten setzt die vorliegende Arbeit an und geht unter Berücksichtigung des Pseudorezeptors BAMBI auf die Rolle der TGF β -Signalwegsaktivität bei Fibrosierung und im Lungenkrebs ein. Gerade im Hinblick auf die Signalwegsaktivität und Regulation im Patientengewebe, das einen Fokus dieser Arbeit darstellt, könnte die Einbeziehung des Pseudorezeptors BAMBI ein tieferes Verständnis dieser Vorgänge erlauben. Verbesserte Erkenntnisse des Signalwegs und seiner Mediatoren im Gewebe könnten damit einen therapeutischen oder diagnostischen Ansatzpunkt bei Lungenfibrose oder Lungenkrebs darstellen.

1.1. Lungenerkrankungen

Erkrankungen der Atemwege und der Lunge betreffen einen Großteil der Bevölkerung und gehören inzwischen zu den führenden Todesursachen. Die WHO zählte 2011 allein 4 Lungenerkrankungen zu den globalen 10 häufigsten Todesursachen mit weltweit mehr als 9,5 Millionen Todesfällen. Unter ihnen forderten Lungeninfektionen (ohne Tuberkulose) 3,5 Millionen Todesopfer, gefolgt von chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) mit 3,3 Millionen Opfern sowie Lungenkrebs mit 1,4 Millionen und 1,3 Millionen Todesfällen durch Tuberkulose (WHO 2013). Darüber hinaus hat sich die Mortalität zwischen 1990 und 2010 für COPD und Lungenkrebs weltweit verändert.

War die COPD 1990 noch auf Platz 4, so stieg die Anzahl der Todesfälle bis 2010 an und wird nun auf Platz 3 gelistet. Ein ähnlicher Anstieg der Mortalität ist bei Lungenkrebs zu beobachten, der von Platz 8 auf den 5. Platz der häufigsten Todesursachen 2010 vorrückte (Lozano et al. 2012). Allein in Europa haben die Lungenkrankheiten einen Anteil von insgesamt 15% an den verzeichneten Todesursachen und sorgen mit zunehmender Tendenz für Krankenhauseinweisungen und Belastungen der Gesundheitssysteme. Unter den erfassten Erkrankungen sind Lungenkrebs (5,8%) und COPD/Bronchiektasien (3,4%) die häufigsten Diagnosen in Europa (European Respiratory Society 2013).

1.1.1. Nichtneoplastische Lungenerkrankungen

Der Großteil der alveolären Oberfläche (95-99%) besteht aus Alveolären Epithelzellen Typ I (AECI) (Stone et al. 1992), welche hauptsächlich für den Gasaustausch zuständig sind. Die Lunge, als ein Barriereorgan, erleidet in regelmäßigen Abständen Verletzungen auf Epithelzellebene. Ein im Zuge der Verletzung einhergehender Verlust von AECI und Freilegung der Basalmembranen setzt zunächst eine lokale Entzündungsreaktion mit Zytokinausschüttung, Immunzellrekrutierung und Aktivierung der Koagulationskaskade in Gang. Als Folge daraus wird die Barriere durch Proliferation und Migration von epithelialen Vorläuferzellen rekonstituiert (Crosby & Waters 2010).

Alveoläre Epithelzellen Typ II regenerieren Gewebeschädigungen

Die Alveolären Epithelzellen Typ II (AECII) stehen im Mittelpunkt der Reepithelialisierung der Basalmembranen. Durch ihre Fähigkeit zur Proliferation und Differenzierung in AECI (Mason & Williams 1977), wird ihnen eine zentrale Rolle in der Homöostase des Alveolarepithels beigemessen (Fehrenbach 2001; Fehrenbach 2012). Im Verlauf von Regenerationsprozessen kommt es zu einer temporären Ablagerung von *Extra Cellular Matrix* (ECM)-Molekülen wie Kollagen oder Fibronectin. Diese reaktionäre Neubildung dient als Matrix für proliferierende bzw. sich differenzierende AECII und wird im Prozess der Reepithelialisierung wieder resorbiert. Der physiologische Reparaturprozess gilt als abgeschlossen wenn sich sowohl Epithel als auch Endothel wieder in ihrer normalen Orientierung auf der Basalmembran etabliert haben (Strieter & Mehrad 2009).

Kaum therapierbare Entzündung bei der idiopathischen pulmonalen Fibrose

Sollten jedoch die Basalmembranen, welche AECI und Endothelzellen trennen, zerstört werden, oder es zu einer wiederholten Schädigung der Barriere kommen, kann ein irreversibler Regenerationsprozess einsetzen, der zu einer permanenten Ablagerung von Kollagenen sowie damit einhergehender Vernarbung des Gewebes führt. In diesem Fall spricht man von Fibrosierung, die das Gewebe versteift und damit in seiner physiologischen Funktion einschränkt. In der Lunge können hiervon sowohl die Atemwege, als auch das Interstitium betroffen werden. Im ersten Fall handelt es sich um irreversible Prozesse, die als *airway remodelling* bezeichnet werden und bei obstruktiven Lungenerkrankungen wie Asthma oder COPD eine Rolle spielen. Im Gegensatz hierzu bezeichnet man die Vernarbung des alveolären Interstitiums als Lungenfibrose.

Eine Abgrenzung der fibrotischen Prozesse beider Kompartimente wird aufgrund des inflammatorischen Anteils versucht. Während bei COPD und Asthma ein Zusammenhang zwischen (chronischer) Entzündung und dem Fortschreiten der Krankheit beobachtet wird (Araya & Nishimura 2010), gilt dieser Anteil bei der idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF) als fraglich (Beers & Morrisey 2011). So ist in den Biopsien von IPF-Patienten keine prominente Entzündung zu beobachten und antiinflammatorische sowie immunsuppressive Therapien haben sich bislang als wenig erfolgreich erwiesen (Thannickal et al. 2004). Im Fall der vorliegenden Arbeit steht die interstitielle Fibrose des Alveolarbereichs im Fokus. Sie wird zu den diffusen parenchymalen Lungenerkrankungen (*diffuse parenchymal lung diseases*; DPLD) gezählt. DPLD stellen einen Sammelbegriff für insgesamt mehr als 150 Entitäten dar und zeichnen sich durch ähnliche radiologische, klinische oder physiologische Manifestationen aus. Eine Unterscheidung der einzelnen Krankheiten erfolgt aufgrund ihrer Ätiologie und Pathophysiologie (Eickelberg & Selman 2010).

Myofibroblasten: Ursprung des Kollagens in der Fibrose?!

In der westlichen Welt sind DPLD mit einer Prävalenz von 800.000 Fällen nicht so weit verbreitet wie COPD oder Asthma. Die häufigste Unterform der DPLD stellt die IPF dar mit einem Anteil von ca. 39% (Michaelson et al. 2000). IPF gilt als die aggressivste Unterform und weist ein mit Lungenkrebs vergleichbares Medianüberleben von weniger als 3 Jahren auf (Raghu et al. 2006). Zu den

Haupteigenschaften dieser Form der DPLD zählen fokale Ansammlungen von Fibroblasten, die als Fibroblastenfoki bezeichnet und als Quelle des Kollagens gesehen werden. Weiterhin typisch sind massive, fibrotische Areale welche einer Bienenwabenstruktur (*honeycombing*) ähneln und allgemein einen hypozellulären Bereich darstellen. Außerdem kann es zu einem progressiven, durch akute Exazerbationen gekennzeichneten, Krankheitsverlauf kommen (Eickelberg & Selman 2010; Fernandez & Eickelberg 2012). Aktivierte Fibroblasten werden als Myofibroblasten bezeichnet. Sie besitzen die Fähigkeit zur Kollagensynthese und exprimieren eine besondere Form des Aktins (*alpha smooth muscle actin*; *aSMA/ACTA2*). Die Ätiologie der IPF ist unbekannt und die Krankheit zeichnet sich durch Aktivierung und Proliferation sowohl von AECII als auch mesenchymaler Zellen wie Fibroblasten bei einer gleichzeitigen Immunität gegen Immunsuppressiva und Kortikosteroide aus. Der Ursprung der (Myo)-Fibroblasten bleibt bisher ungeklärt und umstritten (Araya & Nishimura 2010). Auf molekularer Ebene wurde in einer Vielzahl von Studien beobachtet, dass bei der IPF Entwicklungs- bzw. an der Embryogenese und Morphogenese beteiligte Signalwege aktiviert werden und in der Pathophysiologie beteiligt sind (Selman et al. 2008; Coward et al. 2010; Fernandez & Eickelberg 2012).

1.1.2. Neoplastische Lungenerkrankungen: Lungenkrebs

Weltweit ist Lungenkrebs die häufigste diagnostizierte Krebserkrankung mit 1,6 Millionen neuen Erkrankungen in 2008 und die häufigste letale Krebsform mit 1,3 Millionen Todesfällen (Ferlay et al. 2010). Durch Lungenkrebs wurden in 2011 über 180.000 Todesopfer allein in Europa verzeichnet, mit einer Inzidenz von über 243.000 neuen Erkrankungen pro Jahr (European Respiratory Society 2013).

NSCLC stellen die häufigste Tumorentität dar

Eine Unterteilung der Lungenkrebsentitäten erfolgt histologisch nach Richtlinien der WHO (Travis 2004). Man unterscheidet zwischen Kleinzelligen Karzinomen (*small-cell lung cancer*, SCLC) und Nicht-Kleinzelligen Karzinomen (*non-small cell lung cancer*, NSCLC); hierbei entfallen die Mehrzahl der diagnostizierten Fälle (ca. 80%) auf die NSCLC (Devesa et al. 2005). Die Nicht-Kleinzelligen Karzinome werden weiter unterteilt in Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und Großzellige Karzinome. Unter diesen stellen Adenokarzinome die häufigsten Subtypen dar (Gabrielson 2006; Wahbah et al. 2007; Pao & Girard 2011). Obwohl Rauchen als die

häufigste Ursache von Lungenkrebs gilt (Pfeifer et al. 2002), wird geschätzt, dass 15% der Fälle bei Männern beziehungsweise 53% der Fälle bei Frauen nicht durch Zigarettenkonsum verursacht werden (Parkin et al. 2005). Diese Gruppe wird wegen ihrer Unterschiede in Ätiologie und Genese daher abseits von den rauchinduzierten Fällen als eine gesonderte Entität betrachtet (Sun et al. 2007).

Behandlungsoptionen: Resektion, Chemotherapie und targeted therapies

Aufgrund der weitestgehend symptomfreien Karzinogenese erfolgt eine Diagnose in 60% der Fälle im bereits fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium (Morgensztern et al. 2010). Nur 16% der Patienten leben noch 5 Jahre nach Diagnosestellung; unabhängig der individuellen Tumorstadien (Siegel et al. 2012). Bei den NSCLC sind die Behandlungsoptionen abhängig vom Tumorstadium und in den meisten Fällen können nur frühe Formen chirurgisch therapiert werden. Für alle weiteren Stadien ist eine platinbasierte Chemotherapie die häufigste Behandlungsform. Im Fall der SCLC, einer Krebsform mit einer sehr schlechten Resektabilität, ist Chemotherapie, oft in Kombination mit Radiotherapie, die primäre Therapieoption (Fox & Scadding 1973; Abedallaa et al. 2012). In den letzten Jahren haben sich vermehrt die zielgerichteten Therapien (*targeted therapies*) als effektive Alternativen zusätzlich zu den etablierten Behandlungen durch Chemotherapeutika, Bestrahlung oder Operation etabliert. Hierbei handelt es sich um eine neue Generation von Therapeutika, die gezielt gegen bestimmte Moleküle wirken und nicht wie Chemo- oder Radiotherapie generell alle schnell wachsenden Zellen angreift. Die Anwendung beruht im größten Teil auf dem diagnostischen Nachweis von Veränderungen auf DNA-Ebene (z.Bsp. Mutation oder Genamplifikation). Im Fall vom *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)* werden aktivierende Mutationen nachgewiesen, gegen die sich die Therapie richtet und die sich als effektiv im Hinblick auf die Überlebensrate erwiesen hat. Die Patienten profitieren in diesen Fällen von einer Antikörper- oder *small molecule*-basierten Therapie gegen das spezifische Protein (Reck et al. 2013). Neben den mutationsabhängigen Therapien gegen EGFR sind in letzter Zeit weitere Biomarker für zielgerichtete Ansätze entwickelt worden wie z. B. KRAS, BRAF, MET oder HER2 (Herbst et al. 2008; Haura et al. 2010).

Mögliche Ursprungszellen der Tumore haben Stammzeleigenschaften

Der zelluläre Ursprung bei Lungenkrebs im Menschen ist bisher weitestgehend unbekannt. In der humanen Lunge wurde beobachtet, dass die Tumorentitäten einer proximal-distalen Achse von der Trachea ausgehend folgen und in dieser Reihenfolge Plattenepithelkarzinom, Kleinzelliges Karzinom und Adenokarzinom entstehen (Giangreco et al. 2007). Deshalb wird vermutet, dass die unterschiedlichen Zelltypen, welche entlang dieser Achse auftreten, die Ursprünge der verschiedenen Tumorentitäten darstellen. Man vermutet, dass diese Zelltypen ähnliche Eigenschaften wie Gewebstammzellen aufweisen. Im Fall der NSCLC wurde in den *bronchoalveolar duct junctions* (BADJ) von Mäusen, der Region in der sich respiratorische Bronchioli mit dem Alveolarraum vereinigen, eine Zellpopulation mit Stammzeleigenschaften beschrieben. Diese Zellen stehen im Verdacht als möglicher Ursprung von Lungenkrebs bei Mäusen (Sutherland & Berns 2010).

1.2. Der TGF β -Signalweg

Die Pionierarbeiten zum TGF β -Signalweg bzw. seiner Liganden gehen auf die 1980er Jahre zurück. De Larco und Todaro beschrieben ein teilweise aufgereinigtes Polypeptid, das an EGFR binden konnte und im Gegensatz zu EGF in der Lage war Fibroblasten zu transformieren. Dieses Polypeptid entstammte *Molony Sarcoma Virus* (MSV) transformierten Fibroblasten und wurde im folgenden *Sarcoma Growth Factor* (SGF) genannt (de Larco & Todaro 1978). Nur 2 Jahre später wurde es dann in seiner Wirkung näher beschrieben, die Isolationen biochemisch charakterisiert und in *Transforming Growth Factor* (TGF) β umbenannt (Roberts et al. 1980; Roberts et al. 1981; Moses et al. 1981). Allgemein gilt der TGF β -Signalweg als eine der ältesten Signalkaskaden des Tierreichs und lässt sich bis zu den Anfängen der multizellulären Tiere zurückverfolgen. Im Laufe der Evolution hat sich der Signalweg mit zunehmender Komplexität der Körperbaupläne weiter entwickelt und diversifiziert (Huminiacki et al. 2009).

TGF β wird durch 9, Inhibin, BMP und GDF durch 7 Cysteine, charakterisiert

Im Menschen sind 33 verschiedene Unterformen des Liganden bekannt. Sie werden durch eine spezifische Tertiärstruktur, konservierte Anzahl und Position von Cysteinen im C-terminalen Teil des Polypeptids charakterisiert. Die namensgebenden Isoformen TGF β 1-3 weisen 9 Cysteine auf, während Inhibine,

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) und *Growth and Differentiation Factors* (GDFs) nur 7 Cysteine besitzen. Die Liganden werden als Vorläuferproteine synthetisiert und lagern sich aufgrund intermolekularer Disulfidbrücken zu Dimeren zusammen. Die Liganden bestehen jeweils aus einem N-terminalen Propeptid sowie einem kürzeren C-terminalen Hauptteil und werden innerhalb des sekretorischen Wegs durch furinähnliche Proteasen gespalten. Das daraus resultierende, abgespaltene Propeptid wird auch als *latency-associated peptide* (LAP) bezeichnet und dient als Chaperon des maturen Peptids im Zuge der Exozytose. Im extrazellulären Bereich übernimmt das LAP die Deposition in der ECM, mittels kovalenter Bindung von TGF β an die *latent TGF β binding proteins* (LTBPs) und ECM-Proteine wie Fibronectin. Eine Aktivierung bzw. Freisetzung erfolgt durch Proteasen (MMP2, -9) oder einen niedrigen pH-Wert (Moustakas & Heldin 2009).

TGF β RI+II leiten die Signale durch Phosphorylierung der SMAD-Moleküle weiter

Es gibt 12 verschiedene TGF β Rezeptoren beim Menschen: von denen 7 Typ I Rezeptoren (TGF β RI) darstellen und 5 Typ II Rezeptoren (TGF β RII). Beide Rezeptortypen weisen eine zytoplasmatische Kinasedomäne auf, die sowohl eine Serin-/Threoninkinaseaktivität besitzt als auch eine schwächere Tyrosinkinaseaktivität (Moustakas & Heldin 2009). Die Aktivierung der Signalkaskade erfolgt durch Bindung des Ligandendimers an jeweils 2 TGF β RII-Moleküle, deren Kinasedomänen konstitutiv aktiv sind und sich mit jeweils 2 TGF β RI zu einem heterotetrameren Liganden-Rezeptor-Komplex zusammenlagern. Die TGF β RII aktivieren durch Phosphorylierung die Kinasedomänen der TGF β RI. Das Signal wird durch erneute Phosphorylierung der intrazellulären SMAD-Proteine transduziert. Innerhalb der großen Familie an Liganden und Rezeptoren unterscheidet man zwei verschiedene Wege der Signalkaskade: im ersten TGF β -Signalweg wird das Signal von TGF β , Activin und Nodal durch SMAD2 und -3 übertragen, während im zweiten Signalweg die Transduktion der Liganden BMP und GDF über SMAD1, -5 und -8 erfolgt. Die direkt von TGF β RI phosphorylierten SMAD-Moleküle werden auch als Rezeptor-SMADs (R-SMAD) bezeichnet und aggregieren mit SMAD4, das als Co-SMAD bezeichnet wird. Eine Transkription von TGF β -abhängigen Genen erfolgt nach Translokation der R-SMAD/Co-SMAD-Komplex in den Nukleus. Weil die Affinität des R-SMAD/Co-SMAD-Komplexes für die Zielsequenz CAGAC schwach ist, werden für eine Transkription weitere Kofaktoren/Koaktivatoren wie CBP oder p300

benötigt. Die Kombination verschiedener Koaktivatoren miteinander ermöglicht eine spezifische Transkription diverser TGF β -responsiver Gene (Massagué & Chen 2000). Innerhalb der SMAD-Moleküle sind weiterhin die inhibitorischen SMADs (I-SMADs), SMAD6 und SMAD7, zu nennen. Auf der zyttoplasmatischen Seite der TGF β RI können sie zum Zweck der Signalwegsregulation eine Phosphorylierung verhindern, indem mit der Bildung des Rezeptorkomplexes interferiert wird oder eine Ubiquitinierung via SMURF-Proteine (Itoh & Dijke 2007) erfolgt. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass SMAD7 DNA binden, R-SMAD/Co-SMAD-Komplexe im Zellkern beeinträchtigen und damit eine Transkription verhindern kann (Zhang et al. 2007).

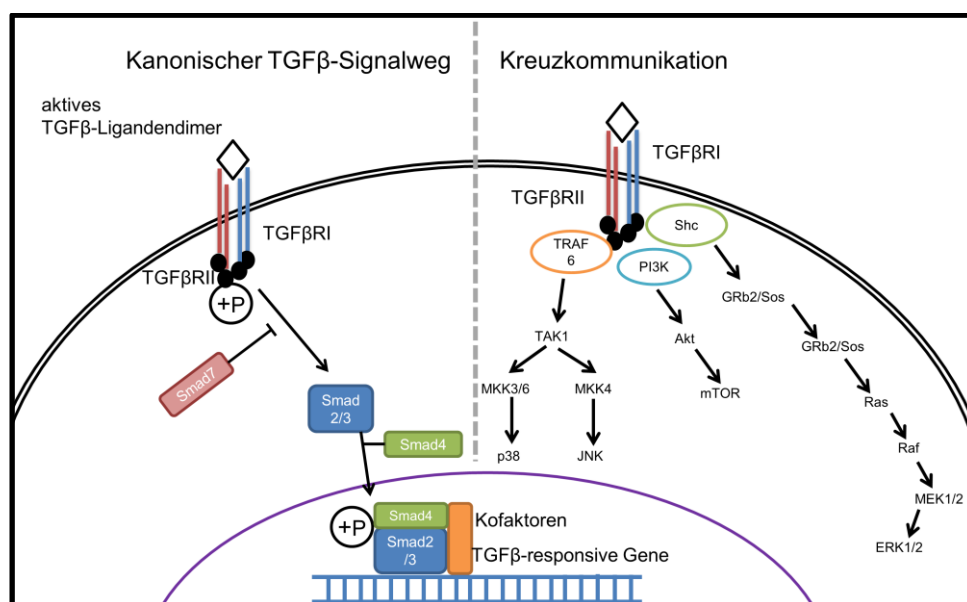


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema des kanonischen TGF β -Signalwegs und seiner Kreuzkommunikation (nach Moustakas & Heldin 2009 sowie Xu et al., 2009)

Kreuzkommunikation mit MAPK, JNK und ERK Signalweg

Neben dem kanonischen Signalweg (Abbildung 1), der über die SMAD-Moleküle TGF β -abhängige Gene reguliert, gibt es zahlreiche Kreuzkommunikationen (Abbildung 1) mit anderen Signalwegen. Unter anderem reguliert TGF β den NF- κ B Signalweg durch Acetylierung von p65 (Ishinaga et al. 2007) oder aktiviert *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) wie p38 (Kim et al. 2004), c-Jun N-terminale Kinase (JNK) oder *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK) (Burch et al. 2010). Hierbei hat sich herausgestellt, dass die Aktivierung des ERK Signalwegs in Kooperation mit der Phosphoinositol-3 Kinase (PI3K) erfolgt. Dies ermöglicht eine zellkontextspezifische Unterscheidung zwischen epithelialen und mesenchymalen

Zellen durch differenzielle Expression von Mediatoren wie PAK2, AKT oder c-Abl (Hong et al. 2011; Hough et al. 2012).

1.2.1. Der TGF β -Signalweg bei Lungenerkrankungen: Fibrosierung, EMT und Karzinogenese

Es ist seit langem bekannt, dass der TGF β -Signalweg bei der Embryonalentwicklung, Gewebemöostase und Morphogenese eine Rolle spielt (Heine et al. 1987; Roberts & Sporn 1992) indem Differenzierung, Apoptose und Proliferation der Zellen durch ihn kontrolliert werden (Massagué & Chen 2000; Siegel & Massagué 2003; Massagué & Gomis 2006).

TGF β -Signale sind involviert in der Entwicklung und Erkrankungen der Lunge

Sowohl in der embryonalen als auch der postnatalen Entwicklung der Lunge sind TGF β -Signale involviert (Zhao et al. 2000). Das zeigt sich insbesondere durch Phosphorylierung von SMAD2 im Alveolar- und Atemwegsepithel im Zuge der späten Lungenentwicklung und Alveolarisierung (Alejandre Alcázar et al. 2011). Aufgrund seiner zentralen Rolle in der Gewebemöostase äußert sich eine Deregulation des Signalwegs in vielen Krankheiten bzw. können Mutationen in Signalwegsmediatoren zu genetisch bedingten Erkrankungen führen (Massagué & Chen 2000; Gordon & Blobe 2008). Im Kontext von Lungenerkrankungen gilt die TGF β -Signalkaskade als einer der zentralen Signalwege und ist an der Entstehung verschiedener Erkrankungen wie Bronchopulmonaler Dysplasie (BPD) (Morty et al. 2009), Asthma (Salam et al. 2007) oder Pulmonaler Arterieller Hypertonie (PAH) (Gordon & Blobe, 2008) beteiligt. Daten aus Tierversuchen haben gezeigt, dass ein Knockout von *Smad2* aufgrund fehlender Gastrulation und Mesodermentwicklung letal ist (Weinstein et al. 1998). In *Smad3*^{-/-}-Mäusen tritt während des Alterungsprozesses eine verstärkte Expression von Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP9) und MMP12 in der Lunge auf. Durch die Proteaseaktivität entwickeln diese Mäuse spontane Emphyseme und erweisen sich als resistent gegen eine adenoviral-induzierte, TGF β -abhängige Ausbildung von Lungenfibrose (Bonniaud et al. 2004).

TGF β induziert EMT und steuert fibrotische Prozesse

Bei der Lungenfibrose wurde schon früh eine entscheidende Rolle vom TGF β -Signalweg vermutet. Es wurden in den Fibroblastenfoki von IPF-Patienten sowohl eine verstärkte Expression des Liganden auf mRNA- und Proteinebene, als auch die

nötigen Rezeptoren zur Signaltransduktion nachgewiesen (Broekelmann et al. 1991). Weiterhin erfolgten Beobachtungen, dass nur in den Lungen von IPF-Patienten biologisch aktives TGF β vorhanden ist, während es in den Lungen von gesunden Patienten nur in inaktiver Form vorkommt (Khalil et al. 2001). Das führte zu der Annahme, dass der TGF β -Signalweg als ein zentraler Mediator von fibrotischen Prozessen gilt (Goodwin & Jenkins 2009). Zwar ist viel über die mechanistische Rolle von TGF β bei Lungenfibrose bekannt, doch ist nach wie vor ungeklärt woher die aktivierten Myofibroblasten stammen, die für Kollagenproduktion und -ablagerung verantwortlich sind. Im Verdacht stehen (Abbildung 2): vor Ort proliferierende und sich ausdifferenzierende Fibroblasten, aus dem Knochenmark einwandernde Vorläuferzellen oder sich transdifferenzierende Epithelzellen (Willis et al. 2006; Araya & Nishimura 2010).

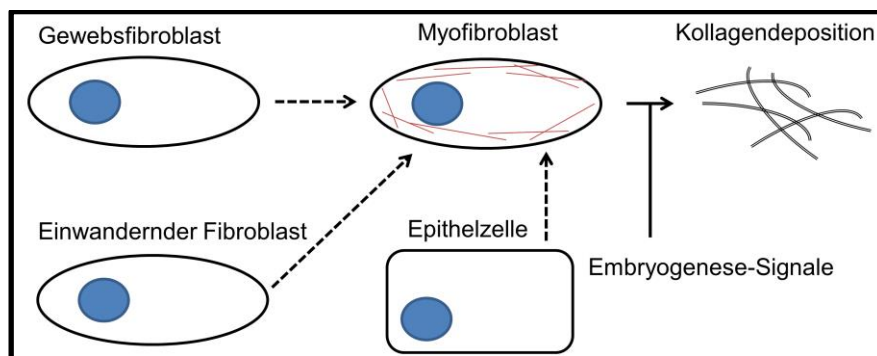


Abbildung 2: Mögliche Ursprünge kollagenproduzierender Myofibroblasten in der IPF (nach Willis et al., 2006; Kasai et al., 2005; Kim et al., 2007).

Erste Hinweise auf eine mögliche Implikation der Epithelzellen lieferten Experimente von Kasai (Kasai et al. 2005) und Kim (Kim et al. 2007), die A549-Zellen mit TGF β stimulierten und den Einfluss auf epitheliale und mesenchymale Marker untersuchten. Die stimulierten Zellen wiesen eine veränderte, spindelförmigere Morphologie auf die Fibroblasten ähnelt, sowie eine verminderte Expression des epithelialen Markers E-Cadherin. Darüber hinaus fingen diese Zellen an mesenchymale Marker wie Vimentin zu exprimieren und erlangten die Fähigkeit Kollagen (I+III) zu synthetisieren. Dieser Prozess der Transdifferenzierung von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften wird als Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet und ist ein bekannter Mechanismus bei Embryonalentwicklung, Krebs und Wundheilungsprozessen (Thiery et al. 2009; Kalluri & Weinberg 2009; Lim & Thiery 2012).

TGFβ-Signalweg: Tumorförderung und -Suppression

Im Vergleich zur Rolle des TGFβ-Signalwegs bei Fibrosierung wo TGFβ unidirektional als auslösender Faktor gesehen wird, ist die Funktion des Signalwegs bei Lungenkrebs und Karzinogenese weitaus komplexer. Dem Signalweg werden sowohl tumorsuppressive als auch tumorfördernde Eigenschaften zugeordnet. Die jeweilige Wirkung des Signalwegs gilt als kontextbezogen und wird in einem prämaligen Stadium sowohl durch seinen antiproliferativen und proapoptotischen Effekt auf Epithelzellen als auch die Unterdrückung von tumorfördernder Inflammation als tumorsuppressiv betrachtet. Ein Wechsel zu tumorfördernden Eigenschaften erfolgt entweder durch Inaktivierung von zentralen Molekülen der Signalkaskade, wie der Rezeptoren, oder durch Veränderungen die nur den tumorsuppressiven Arm betreffen. In diesem Fall tritt der Effekt durch TGFβ verstärkt zu Tage und kann zum Zweck der Tumorprogression „missbraucht“ werden, indem die Immunantwort lokal gedämpft wird und Invasion sowie Metastasierung begünstigt werden (Bierie & Moses 2006; Massagué 2008). Verlust oder Mutationen von Kernkomponenten (TGFβRI+II; SMADs) des Signalwegs sind im Fall des kolorektalen Karzinoms beschrieben (Markowitz et al. 1995; Försti et al. 2010), gelten aber nicht als prominent und häufig im Fall von NSCLC (Anumanthan et al. 2005). Bei Lungenkrebs wurden nur wenige *Small Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) für den TGFβ-Signalweg mit Metastasierung assoziiert (Li et al. 2011). Insgesamt ist die Rolle des Signalwegs im Kontext von Lungenkrebs umstritten und zum Teil widersprüchlich: Obwohl Lungentumore in hohem Maß TGFβ exprimieren können und dies mit Tumorprogression sowie schlechter Prognose korreliert (Toonkel et al. 2010), ist in vielen Fälle eine Repression des TGFβRII zu beobachten (Borczuk et al. 2005).

1.2.2. BAMBI und der TGFβ-Signalweg

Mit der Entdeckung des TGFβ-Pseudorezeptors *BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor* (Bambi) beim Krallenfrosch (Onichtchouk et al. 1999) wurde ein weiterer regulatorischer Mediator der TGFβ-Superfamilie beschrieben.

BAMBI ähnelt TGFβRI und wird in verschiedenen Tumoren stark exprimiert

Erstmalig in Screening-Experimenten durch seine gemeinsame Expression mit BMP4 in der Krallenfroschembryogenese entdeckt, weist *bambi* eine hohe

Übereinstimmung auf DNA-Ebene (53%) mit dem TGF β RI auf, besitzt jedoch keine intrazelluläre Kinasedomäne. Bambi ist in der Lage mit den TGF β RI und –II zu interagieren aber nicht alleine TGF β zu binden. Wenn sich Bambi jedoch in den Rezeptorkomplex einbringt, kann eine Bindung an TGF β erfolgen. Im Falle einer Interaktion mit dem Rezeptorkomplex wird vermutet, dass Bambi diesen beeinträchtigt und so zu einer Inhibition des Signalwegs auf Rezeptorebene führt (Onichtchouk et al. 1999). Zusätzlich zu seiner Expression im Krallenfrosch wurden darauf folgend Homologe in weiteren Organismen wie Zebrafisch (Tsang et al. 2000), Ratten (Loveland et al. 2003), Vögeln (Higashihori et al. 2008) sowie eine Koexpression von BAMBI und BMP4 in der Embryogenese von Mäusen beobachtet (Grotewold et al. 2001)

Ein Knockout dieses Gens hatte keinen letalen Effekt in der Embryonalentwicklung und die Mäuse zeigten eine normale Fertilität und Entwicklung (Chen et al. 2007). Es scheint jedoch, dass BAMBI bzw. TGF β Signale generell einen Effekt auf die Schmerzwahrnehmung dieser Tiere haben (Tramullas et al. 2010). Beim Menschen wurde eine positive Regulation durch β -Catenin gefunden sowie eine Überexpression im kolorektalen Karzinom (Sekiya et al. 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass umgekehrt BAMBI ebenso β -Catenin induziert und damit über c-Myc proliferative Effekte fördert (Lin et al. 2008), sowie im Fall des kolorektalen Karzinoms als ein Marker einer metastatischen Gensignatur gilt (Togo et al. 2008; Fritzmann et al. 2009). Weiterhin wurde beobachtet, dass BAMBI beim Ovarialkarzinom (Pils et al. 2010) und Osteosarkom (Zhou et al. 2013) überexprimiert wird sowie eine Expression beim Blasenkrebs epigenetisch reguliert wird (Khin et al. 2009). Eine erstmalige Beschreibung im Fokus von Lungenerkrankungen erfolgte durch unsere Gruppe und zeigte eine Überexpression in den Lungen von COPD-Patienten und Regulation durch *Haemophilus influenzae* (Drömann et al. 2010). Einen Zusammenhang zwischen Leberfibrose und LPS/*Toll Like Receptor 4* (TLR4) vermittelte Repression von BAMBI konnten Seki und Kollegen im Mausmodell zeigen (Seki et al. 2007). Dies bietet Raum für Spekulationen einer Rolle von BAMBI bei der humanen Lungenfibrose.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es den TGF β -Signalweg und seine Rolle unter besonderer Betrachtung des neuentdeckten TGF β -Pseudorezeptors BAMBI in neoplastischen und nichtneoplastischen Lungenerkrankungen zu untersuchen. Insbesondere der Einfluss des TGF β -Signalwegs auf EMT und Fibrosierung als auch seine Rolle bei Lungenkrebs stehen im Mittelpunkt der Untersuchungen. Zwar gilt der TGF β -Signalweg als ein intensiv bearbeitetes Thema, wie die mehr als 5000 Einträge in der Pubmed-Datenbank (Suchbegriffe „*tgf beta AND lung*“; Stand 02.01.2014) zeigen, doch ist gerade im Bereich Fibrosierung und EMT seine Rolle im Menschen umstritten und durchaus widersprüchlich.

Zentrale Fragestellungen sind:

- 1. Wie verhält sich der Signalweg bei phänotypisch unterschiedlichen Krankheiten wie Fibrose und Emphysem im Patientengewebe? Bewirkt ein Knockout von Bambi eine schwerere Fibrosierung im Maus-Modell der Lungenfibrose?
- 2. Ist eine TGF β -abhängige EMT bei der humanen Lungenfibrose relevant? Gibt es Modulationsmöglichkeiten auf Signalwegesebene?
- 3. Welche Rolle spielen der Signalweg und BAMBI im Patientengewebe bei Lungenkrebs
- 4. Ist der TGF β -Signalweg ein mögliches therapeutisches Ziel?

2. Material und Methoden

So nicht anders angegeben sind die Bezugsquellen und genauen Bezeichnungen der verwendeten Reagenzien, Chemikalien, Geräte und Oligonukleotide in den Appendizes II-V vermerkt. Pufferlösungen wurden grundsätzlich mit Reinstwasser (MilliPore-gereinigt) angesetzt. Die verwendeten Glasgefäße wurden von der Firma Schott bezogen, Zellkulturgefäße von Corning, sowie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen von Sarstedt.

2.1. Patientenmaterial und Ethik

Es wurden im Laufe der experimentellen Arbeiten sowohl humane Gewebe in Form von archiviertem Paraffinmaterial als auch frisches Lungengewebe zur Isolierung von Primärzellen eingesetzt. Frisch- und Archivgewebe stammte von Pneu- bzw. Lobektomien von Patienten der LungenClinic Großhansdorf im Zuge diagnostisch oder therapeutisch nötiger Eingriffe. Die Arbeiten mit Humanmaterial sowie die Verwendung von Archivmaterial in Form von Paraffinblöcken und dazugehörigen Basisdaten als auch die Ex-vivo-Stimulation von humanen Geweben wurden durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck positiv begutachtet. Tierexperimentelle Arbeiten *in vivo* wurden von dem Ministerium für Ländliche Räume und Naturschutz Schleswig-Holstein im Rahmen des Antrages genehmigt. Der Entnahme von Organen wurde durch eine Anzeige stattgegeben. Die genauen Bezeichnungen der genehmigten Ethikanträge sind:

1. Archivmaterial und Patientenbasisdaten: „ Verwendung historischer Biomaterialproben aus sog. Überschussmaterial inkl. zugehöriger „Klinischer Basisdatensätze“ für die medizinische Wissenschaft der Zukunft“; Aktenzeichen 12-220
2. Ex-vivo-Stimulation von Gewebe: „ Neuartige Therapieansätze für nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome – Ex-vivo-Kultur humaner Gewebe“ Aktenzeichen 07-157
3. In-vivo-Tierversuche: „ Untersuchung zur Rolle des TGF- β Pseudorezeptors Bambi im Mausmodell der Lungenfibrose“ Aktenzeichen V 312-7224.123-3 (94-7/12)
4. Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken im Rahmen der genehmigten Anzeige: „Charakterisierung der Rolle des TGF- β Pseudorezeptors Bambi für die Gewebhomeostase“ Aktenzeichen V312-7224.123-3

Eine Übersicht über das verwendete Patientenmaterial ist in Appendix I zu finden.

2.2. Prozessierung von biologischen Materialien

2.2.1. Fixierung von Gewebe mittels HOPE und Formalin

Im Rahmen der experimentellen Arbeiten wurden Zellen und Gewebe verwendet und diese in Abhängigkeit von den geforderten Analysetechniken unterschiedlich fixiert. Die Mehrheit der Proben wurde mittels HOPE fixiert, dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die HOPE-Technik (Olert et al. 2001), (zusammengefasst in (Vollmer et al. 1999; Vollmer et al. 2006) zeichnet sich durch eine geringe Degradierung von Nukleinsäuren aus (Wiedorn et al. 2002), zeigt keine kovalente Kreuzvernetzung von antigenen Strukturen (Goldmann et al. 2003) und ermöglicht so eine breite Auswahl von Analysemethoden aus einem einzigen Paraffinblock (Marwitz et al. 2011) bei gleichzeitiger exzellenter Konservierung der Morphologie. Mit Hope-fixierten Gewebe und Zellen lassen sich u.a. mRNAs *in situ* visualisieren (Goldmann et al. 2002), proteomweite Untersuchungen mittels 2D-Elektrophorese durchführen (Kähler et al. 2010) sowie Gewebe-Arrays anfertigen (Goldmann et al. 2005). Patientengewebe aus dem diagnostischen Routinebetrieb wurden standardmäßig mit Formalin fixiert. Eine Übersicht über die detaillierten Fixierungs- und Einbettungsprotokolle ist Tabelle 1 zu entnehmen. Zur Einbettung in Paraffin wurden die Zellen und Gewebe mittels unterschiedlicher Lösungsmittel entwässert. Formalinfixiertes Material (*Neutral-buffered Formaline*; NBF) aus dem pathologischen Routinebetrieb wurde in einem Shandon Pathcentre vollautomatisch über eine ansteigende Alkoholreihe entwässert und zum Schluss in Paraffin (Schmelzpunkt 56°C) überführt. Mit Hope fixierte Gewebe wurden per Hand über Aceton entwässert und in *Low-Melting* Paraffin (52-54°C Schmelzpunkt) überführt. Hope-fixierte Zellpellets wurden über Aceton entwässert und schließlich im Reaktionsgefäß mit *Low-Melting* Paraffin überschichtet um einen Konus zu erhalten. Der Konus wurde nach Aushärten aus dem Reaktionsgefäß entnommen und in einen leeren Empfängerblock transferiert um schließlich einen Zellblock zu erhalten (Marwitz et al. 2011).

Tabelle 1: Fixierung und Entwässerung von Biomaterial

	Formalin		Hope			
Biomaterial	Gewebe	Zellen	Gewebe	Zellen		
Fixativ	4% NBF	PFA	HOPE I	HOPE I		
Dauer Ink.	12-20 h	10 min	12-20 h	12-20 h		
Entwässerung & Paraffineinbettung	EtOH-Reihe /		Aceton			
	70% EtOH 1h		6x 1h 100%	6x 30 min 100%		
	80% EtOH 1h		Aceton		Aceton	
	2x 96% EtOH 1h		54°C <i>low-melting</i> Paraffin			
	3x Abs. EtOH 1h					
	Xylol 1h					
Xylol 45 min						
2x Paraplast 45 min						
2x Paraplast 1h						

Im Fall von Zytozentrifugationspräparaten die mittels Hope fixiert wurden, erfolgte eine Entwässerung über 3x 10 min 100% Aceton. Anschließend konnte das Präparat mit einem Tropfen *Low-Melting* Paraffin überdeckt werden oder es erfolgte eine Rehydrierung über 10 min 70% Aceton und 10 min A. dest für eine anschließende zytologische Färbung.

2.2.2. Herstellung von Gewebe-Arrays

Für die Hochdurchsatzanalyse von Geweben sowie um eine vergleichbare Probenbehandlung zu garantieren, wurden von verschiedenen Geweben Arrays hergestellt (Goldmann et al. 2005). Hierfür wurden die Gewebe der Spenderblöcke vorher mittels eines HE-Schnitts auf Nekrose untersucht um eine möglichst große Anzahl an vitalem Gewebe in einem Paraffinblock zu vereinigen. Zunächst wurde ein Empfängerblock hergestellt indem aus einem vorher gegossenen Paraffinblock mit einer Stanze 2-mm messende Zylinder entfernt wurde um Platz für das Zielgewebe zu schaffen. Aus den Geweben der Spenderblöcke wurden dann mit einer kleineren Stanze Zylinder entnommen und in den leeren Empfängerblock übertragen. Nachdem Transfer aller Stanzen wurden die fertigen Arrayblöcke bei 42°C für 30 min. inkubiert um das Paraffin anzuweichen. Restliche Lücken im Array wurden durch sanftes Drücken des weichen Blocks geschlossen und mit flüssigem Paraffin versiegelt.

2.2.3. Ex-vivo-Stimulation von Geweben und Zellen

Zur Stimulation von Geweben und Zellen mit TGF β und dem TGF β RI-Inhibitor SB431542 wurde mindestens 2 h vor Stimulation das Zellkulturmedium zu serum-freien Medium gewechselt. Lyophilisiertes TGF β wurde als 20 μ g/ml Stock-Lösung in 4 mM HCl mit 1 mg/ml BSA rekonstituiert, aliquotiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. SB431542 wurde mit einer Konzentration von 26 mM in DMSO rekonstituiert, aliquotiert und ebenso bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. TGF β wurde in den Versuchen in einer Endkonzentration von 5-20 ng/ml eingesetzt. Die jeweilige Konzentration im Versuch ist der Bildunterschrift zu entnehmen. SB431542 wurde in einer Endkonzentration von 10 μ M verwendet. Der Appendix III enthält genauere Angaben von Bezugsquellen und Herstellerbezeichnungen.

2.3. Tierversuche: Bleomycin-Modell der Lungenfibrose

2.3.1. Verwendete Mausstämme

Für die tierexperimentellen Arbeiten *in vivo* und *ex vivo* wurden Tiere vom Stamm C57BL/6NTac verwendet. Bei den Tieren handelte es sich um Knockout (KO)-Tiere die vom KOMP-Repositorium an der Universität Kalifornien, Campus Davis bezogen wurden. In den Mäusen wurde eine Deletion im *Bambi*-Gen (siehe Tabelle 2) mittels Homologer Rekombination durch eine artifizielle Kasette hervorgerufen. Von kryokonserviertem Keimplasma wurden heterozygote Tiere am Repositorium durch Embryonentransfer erzeugt und verschickt. Vor Ort erfolgte die Kreuzung der heterozygoten Tiere zu einer homozygoten KO-Linie (*Bambi*^{-/-}) und einer Wildtyp-Linie (Wt) mit dem gleichen genetischen Hintergrund.

Tabelle 2: Übersicht Deletion

Lokalisation	Deletion Start	Deletion Ende	Deletion Größe (bp)
Chr. 18	3508192	3512398	4207

Ein Knockout des Gens via der Cre/Lox-Technik zeigte, dass die Exzision des Gens keine fatalen Entwicklungsstörungen des Embryos bewirkt und die Tiere sich normal reproduzieren sowie keinen Unterschied in Vitalität zu Wildtyp-Tieren aufweisen (Chen et al. 2007). Deletionen der Exone 2 und 3 zeigten eine Verminderung im akuten Schmerzverhalten bei thermischen, chemischen, inflammatorischen und mechanischen Reizen (Tramullas et al. 2010). Davon abgesehen waren zum

Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten keine weiteren Beschreibungen des KOs bekannt.

2.3.2. Induktion von Lungenfibrose mittels Bleomycin

Im Rahmen der Etablierung des Modells fand eine Hospitation am CPC-München im Labor von Herrn Prof. Dr. Oliver Eickelberg statt unter Anleitung von Isis Fernandez, mit der Applikationsmenge und -Route diskutiert wurde. Das Bleomycin-Modell gilt momentan als das am weitesten verbreitete Tiermodell zur Erforschung der IPF. In diesem Modell wird eine Gewebeschädigung durch Gabe von Bleomycinsulfat im alveolären Bereich hervorgerufen. Bleomycinsulfat ist eine Mischung zytotoxischer Glykopeptidantibiotika und wird aus *Streptomyces verticillus* gewonnen. Primär wurde es zuerst als Chemotherapeutikum in der Krebstherapie eingesetzt. Auf zellulärer Ebene wird vermutet, dass es zu Brüchen in DNA-Einzel- und Doppelsträngen führt und damit den Zellzyklus beeinträchtigt sowie Apoptose induziert. Die darauf folgende Entzündungsreaktion schädigt das umliegende Gewebe und setzt im Zuge der Entzündungsresolution die kollagenproduzierenden Regenerationsmechanismen in Gang. Sowohl die Route der Applikation als auch der genetische Hintergrund haben einen maßgeblichen Effekt im Mausmodell (Moeller et al. 2008; Mouratis & Aidinis 2011) und zeigen C57/BL6-Tiere als die empfänglichsten. Im vorliegenden Fall wurde die oropharyngeale Applikation unter Anästhesie direkt auf den Kehledeckel angewendet. Hierfür wurden die Tiere mit Sevoflurandampf betäubt und an den vorderen Schneidezähnen aufgehängt um eine vollständige Streckung der Trachea zu gewährleisten. Die Applikation des Bleomycinsulfats erfolgte in einem Volumen von 50 µl unter einem Binokular. Durch mechanische Blockierung der Nasenöffnung mittels Pinzette wurden die Tiere gezwungen die Flüssigkeit tief zu aspirieren um eine homogene Verteilung zu gewährleisten. Kontrolltiere erhielten jeweils 50 µl PBS appliziert. Da der Einfluss des Knockouts von *Bambi* auf die Fibrosierungsreaktion bisher nicht bekannt ist, wurde zunächst in Vorversuchen die optimale Dosis bestimmt. Initial wurden zunächst 3 U/kg Körpergewicht je Tier appliziert. Diese Dosis wurde in einem Folgeversuch um 30% auf 2 U/kg Körpergewicht reduziert. Die Versuchsdauer erstreckte sich in beiden Fällen über 14 Tage mit Tag 0 als Applikationszeitpunkt. In einem ersten Versuchsdurchlauf wurden insgesamt 40 Tiere (alles Männchen; Durchschnittsalter bei Versuchbeginn 7,6 +/- 1,6 Wochen) eingesetzt. Hiervon waren jeweils 20 Tiere Wt und 20 Tiere *Bambi*^{-/-} mit je 4 Tieren der PBS und 16 Tieren der Bleomycin-

Gruppe zugeordnet. In einem zweiten Versuch wurde die Bleomycinmenge auf 2 U/kg reduziert und insgesamt 24 Tiere (alles Männchen; Durchschnittsalter bei Versuchsbeginn 9,7 +/- 0,6 Wochen) eingesetzt. Hiervon waren jeweils 12 Wt und 12 Tiere *Bambi*^{-/-} mit jeweils 8 Tieren in der Bleomycin-Gruppe und 4 Tieren in der PBS-Gruppe. Die Arbeiten wurden in Kooperation mit der Forschungsgruppe Experimentelle Pneumologie (Herr Prof. Dr. Fehrenbach) durchgeführt. Frau Dr. Christina Vock führte die Leitung über die Tierversuche und war gemeinsam mit Frau Franziska Beyersdorf für die Substanzapplikation sowie Betäubung der Tiere verantwortlich.

2.3.3. Einbettung von Tiergeweben

Um eine Quantifizierung von Strukturen und Ereignissen anhand histologischer Präparate durchführen zu können, ist eine Entnahme und Entfaltung unter standardisierten Bedingungen erforderlich. Das Problem der Anisotropie (Hsia et al. 2010) wurde durch eine randomisierte Orientierung der Gewebe nach dem Orientator-Prinzip umgangen. Zur Entnahme von Organen oder am Versuchsende wurden die Tiere mittels Verabreichung von 300 µl Ketamin/Rompun-Lösung i.p. terminal betäubt. Nach Einsetzen des Todes wurde die Bauchhöhle eröffnet, das Zwerchfell angeritzt und bei Bedarf Blut über die zentrale Bauchvene entnommen. Nach Durchschneiden der Rippen wurde der Brustkorb geöffnet und die Lunge freipräpariert. Zur Gewinnung von Zellmaterial aus dem Alveolarbereich wurden die Lungen lavagiert. Hierfür wurde die Trachea angeschnitten und eine Trachealkanüle eingeführt. Die Kanüle wurde mit einem Faden fixiert und die Lavagierung erfolgte mit 1 ml PBS/ Protease-Inhibitor-Cocktail (Complete plus, Roche). Die Lavageflüssigkeit (*BAL fluid*, BALF) wurde vom zellulären Bestandteil mittels Zentrifugation für 5 min bei 500 x g und 4°C getrennt.

2.3.4. Standard-Entfaltung von Lungengewebe

Um eine vollständige Entfaltung des Lungengewebes zu garantieren, wurden die Lungen für 20 min unter 20 cm para-Formaldehyd (PFA)-Säule perfundiert. Während der Perfusion über die Trachea wurden hierbei die Alveolen entfaltet und gleichzeitig fixiert. Nach 20 min wurde die Lunge in ein Glasgefäß mit PFA überführt und die Fixation über Nacht bei 4°C fortgesetzt. Bei Bedarf konnte hiernach das Lungenvolumen bestimmt werden, indem das Organ unter Wasser versenkt und die Gewichtsänderung auf einer Waage abgelesen wurde.

2.3.5. Einbettung in Agarose und stereologische Aufarbeitung

Um das Gewebe für stereologische Aufarbeitung schneiden zu können, wurden die Lungen in jeweils 50 ml 2%igen, warmen Agar-Agar getaucht und in physiologischer Orientierung ausgerichtet. Nach Erkalten des Agars und Lagerung über Nacht bei 4°C wurde überflüssiges Agar-Agar rund um die Gewebe entfernt und jedem Tier eine Zufallszahl (0-9) zugeordnet, die die Orientierung des Gewebes in Relation zur Längssachse beim Schneiden definierte. Von den Lungen wurden dann 2mm dicke Schnitte angefertigt, in Einbettkassetten überführt, über eine ansteigende Alkoholreihe (siehe Tabelle 1) entwässert und schließlich über Nacht mit Paraffin inkubiert.

2.3.6. Quantifizierung von murinem TGFβ in BAL und Ex-vivo-Kulturüberstand

TGFβ in BALF muriner Lungengewebe wurde mittels ELISA quantifiziert. Die ELISA-Analysen wurden in der FG Experimentelle Pneumologie von Frau Franziska Beyersdorf durchgeführt. Die Quantifizierung von TGFβ im Kulturüberstand der *ex vivo* stimulierten Gewebe erfolgte am UKSH Campus Lübeck Medizinische Klinik III im Labor von PD Dr. Daniel Drömann.

2.4. Histologische und zytologische Techniken

Histo- und zytologische Schnittpräparate von Paraffinblöcken wurden je nach Art der angewendeten Fixierungstechnik unterschiedlich angefertigt (Abbildung 3). Formalinfixierte Gewebe wurden nach dem Schneiden an einem Mikrotom zur Ausbreitung des Präparates und Vermeidung von Falten auf ein Wasserbad mit 44°C gegeben. Danach wurde der Schnitt auf SuperFrost-Objektträger gezogen und auf einem Strecktisch bei 58°C zur Trocknung gelassen, um eine optimale Adhäsion auf dem Glas zu gewährleisten. Anschließend erfolgte eine Inkubation in einem Wärmeschrank bei 60°C für 10 min in aufrechter Lagerung. Von Hope-fixierten Geweben wurden Schnitte zunächst auf einem Wasserbad bei RT geglättet und dann auf einen nicht beschichteten Objektträger gezogen um sie auf einem Strecktisch bei 37°C zu trocknen. In einem weiteren Schritt wurden sie nach dem Glätten wieder in das Wasserbad gegeben um sie dann final auf SuperFrost-Objektträger zu ziehen und auf einem Strecktisch bei 37°C über Nacht zu adhären.

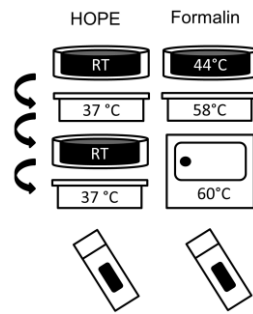


Abbildung 3: Herstellung histologischer Schnittpräparate

2.4.1. Entparaffinierung

Je nach Art der Fixation und Einbettung der Gewebe (FFPE/HOPE) wurden unterschiedliche Entparaffinierungsprotokolle angewandt. Mit Formalin fixierte Gewebeschnitte wurden über Xylol entparaffiniert und mittels Ethanol von absteigender Konzentration rehydriert. HOPE-fixierte Gewebeschnitte wurden durch eine Inkubation von 10 min in Isopropanol bei 60 °C entparaffiniert und mit 70% Aceton (v/v) rehydriert. Ein Ablaufprotokoll der verschiedenen Entparaffinierungsschritte ist Tabelle 3 zu entnehmen:

Tabelle 3: Entparaffinierung für Formalin-/HOPE-fixierte, Paraffineingebettete Gewebe für die Immunhistochemie

Formalin	HOPE
10 min Xylol	10 min Isopropanol (60°C)
2 min EtOH absolut	Waschen in frischen Isopropanol
2 min EtOH 96 %	Trocknen bei RT
2 min EtOH 90 %	10 min Aceton 70% bei 4°C
2 min EtOH 80 %	10 min DEPC Wasser bei 4°C
2 min EtOH 70 %	Temperieren in Waschpuffer bei RT

2.4.2. Histochemie

2.4.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Morphologische Untersuchungen von Gewebeschnitten wurden anhand von Hämatoxylin-Eosin-(HE) gefärbtem Material durchgeführt. Die Gewebe wurden in Abhängigkeit ihrer Fixierung entparaffiniert und nach unten stehendem Protokoll (Tabelle 4) gefärbt mit Hämalaun nach Meyer als Farbstoff (0,1% Hämatoxylin, 0,3 M Chloralhydrat, 0,1% Citronensäure, 0,1 mM Natriumiodat, 0,1 M Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat).

Tabelle 4: HE-Färbung

Reagenz	Dauer [min]
Hämalaun nach Meyer	5
Leitungswasser	1
1% Kaliumacetat (w/v)	2
Leitungswasser	1
0,2% (w/v) Eosin	1,5
Leitungswasser	1

2.4.2.2. Masson-Goldner-Färbung

Zur differenziellen Darstellung von Bindegewebe/Kollagenen wurden entparaffinierte Gewebeschnitte mit einer Trichromfärbung gefärbt. Die nach Masson und Goldner benannte Färbung stellt die Kerne in braunschwarz, Cytoplasma in orange-rot und Bindegewebe in grün dar. Für einen Ablauf der Färbung siehe Tabelle 5.

Tabelle 5: Masson-Goldner-Färbung

Reagenz bzw. Lösung	Dauer [min]
Eisenhämatoxylin nach Weigert	1-2
Spülen in fließend Wasser	10-15
Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin	5-7
Spülen mit 1% Essigsäure	/
Differenzierung mit Wolframatophosphoräure-Orange	Bis zur Entfärbung des Bindegewebes
Spülen mit 1% Essigsäure	/
Lichtgrün	5
Spülen mit 1% Essigsäure	5

Die Zusammensetzung der benötigten Lösungen ist aus Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Benötigte Lösungen für Masson-Goldner-Färbung

Bezeichnung	Chemikalien-Name	MW [g/mol]	Konz.	Konzentration
Masson-Lösung	Ponceau de Xylidine	436,46	0,66 g/l	1,5 mM
	Säurefuchsin	585,54	0,33 g/l	0,56 mM
	Essigsäure rein	60,05	1,98 ml/l	32 mM
Azophloxin-Lsg.	Azophloxin/ Rot 2G	509,42	5 g/l	9,8 mM
	Essigsäure rein	60,05	2 ml/l	32 mM
Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin-Lsg	Essigsäure (0,2 %)		88 ml	
	Masson-Lösung		7 ml	
	Azophloxin-Lsg		2 ml	
Wolframatophosphorsäure-Orange	Wolframatophosphorsäure	2880,17	30-50 ml/l	
	Orange G		20 g/l	
Lichtgrün	Lichtgrün SF	792,85	1-2g g/l	1,2 - 2,5 mM
Eisenhämatoxylin nach Weigert Lsg A	Hämatoxylin	302,29	10 ml/l	33 mM
Eisenhämatoxylin nach Weigert Lsg B	Eisen(III)-chlorid	162,21	11,6 g/l	71 mM
	25% HCl		10ml/l	1%

2.4.1.3. Diff-Quik Cytologische Färbung

Cytospins von BAL-Zellen aus den Tierversuchen wurden über Nacht getrocknet und am Folgetag mit der Diff-Quik-Färbelösung (Medion Diagnostik) angefärbt.

2.4.3. Immunhistochemie

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden in Glasküvetten durchgeführt. Die Inkubation der entparaffinierten Schnitte mit den Reagenzien erfolgte in feuchten Kammern, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern. Die optimalen Verdünnungen, sowie im Fall von formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE)-Geweben die optimalen *heat induced epitope retrieval* (HIER)-Bedingungen, wurden für jeden Antikörper unter Benutzung von Kontrollgewebe individuell ermittelt. Es wurden generell gleiche Chromogenzeiten (je Antikörper) für Präparate eines Experiments bzw. die in einem gemeinsamen Kontext untersucht wurden, eingehalten und für jede Färbung eine Negativkontrolle ohne Applikation des Primärantikörpers mitgeführt. Die Spezifität der Färbungen sowie der zu erwartenden Signallokalisationen wurde anhand von Kontrollgeweben durchgeführt.

2.4.3.1. Antigendemaskierung bei formalinfixierten Geweben

Formalin wirkt als Fixativ indem es Proteine durch kovalente Bindungen quervernetzt. Dies hat zur Folge, dass antigene Strukturen maskiert werden und für die

immunhistochemische Detektion schwer zu erreichen sind. Aufwändige Prozeduren, die möglicherweise das Gewebe und seine Morphologie negativ beeinträchtigen, sind deshalb in den meisten Fällen notwendig um die Epitope zu demaskieren (Shi et al. 1991; Srinivasan et al. 2002). Um gewünschte Proteine im formalinfixierten Gewebeschnitt mittels Antikörper nachweisen zu können, war eine Antigendemaskierung erforderlich. Am geläufigsten und auch hier angewandt ist die Hitzevorbehandlung (HIER) im Dampfgarer bei 90°C in entsprechenden Pufferlösungen. Für jeden Antikörper wurde der optimale Puffer individuell ermittelt. Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden in den per Mikrowelle erwärmten Puffer gestellt und in einem Dampfgarer für 30 min bei 90°C inkubiert. Die Inkubation und Erwärmung in der sauren (Citratpuffer pH 6: 2 mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 5 mM Citronensäure) oder alkalischen Pufferlösungen (Tris-EDTA pH 9 HIER-Lösung, Zytomed Systems) hat zur Folge, dass die durch das Formalin hervorgerufene Quervernetzung der Epitope teilweise wieder aufgehoben wird.

2.4.3.2. Deaktivierung endogener Peroxidasen

Im entparaffinierten Gewebe möglicherweise vorkommende, endogene Peroxidasen wurden mittels 10 min. Inkubation in 3 % (v/v) H₂O₂-Lösung deaktiviert um unspezifische Hintergrundsignale bei der späteren Farbreaktion zu unterdrücken.

2.4.3.3. Detektion und Visualisierung

Die Detektion von Proteinen im Gewebeschnitt wurde mit nachfolgendem Protokoll standardmäßig durchgeführt. Hierbei wird der Primärantikörper in Abhängigkeit von seiner Spezies mit einem Polymer (ZytoChem Plus HRP-Polymer-Kit, Zytomed Systems) detektiert. Im Fall von Primärantikörpern aus Maus wurde in einem Zwischenschritt eine Inkubation mit Brückenantikörpern (Kaninchen anti-Maus) durchgeführt. Das Polymer ist mit einer Vielzahl von Meerrettich-Peroxidasen konjugiert und dient der Farbreaktion. Diese erfolgte durch Substratzugabe (Aminoethylcarbazol, AEC). Auf jeden Objektträger wurden 200 µL des jeweiligen Reagenzes gegeben und nach jedem Schritt in Glasküvetten ausgiebig mit Waschpuffer (50 mM Tris; 0,05% Tween-20) gewaschen. Die Inkubation erfolgte in feuchten Kammern und die Farbreaktion wurde mit Reinstwasser abgestoppt. Zur Vergleichbarkeit von unterschiedlichen Färbungen im selben Experiment, wurde für die verschiedenen Zielantigene jeweils eine gleiche Chromogenzeit gewählt. Die

Verdünnung der Antikörper erfolgte individuell in einer speziellen Lösung (Antibody-Diluent), wie in Appendix II beschrieben.

Tabelle 7: Standardprotokoll für Immunhistochemische Detektion von Proteinen im Gewebeschnitt

Schritt	Wiederholung	Dauer [min]	Reagenz
1	3x	2	Waschpuffer
2	-----	5	Proteinblock
3	3x	2	Waschpuffer
4	-----	60	Primärantikörper
5	3x	5	Waschpuffer
6	-----	15	Postblock
7	3x	5	Waschpuffer
8	-----	20	Polymer
9	3x	2	Waschpuffer
10	-----	∞	Chromogen (permanent AEC)

2.4.3.4. Gegenfärbung in Gewebedünnschnitten und Eindecken

Nach der Farbreaktion wurden die Objektträger in einen Glasschlitten überführt und mit Hämatoxylin nach Meyer nach folgender Prozedur gegengefärbt:

Tabelle 8: Standardprotokoll Kernfärbung mit HTX

Dauer Inkubation [s]	Glasküvette mit Reagenz
30	Hämatoxylin nach Meyer
10	A.dest
10	A.dest.
10	A.dest.
30	0,05 % (v/v) NH ₃ -Wasser
8 - ∞	A.dest.

Nach der Gegenfärbung wurden die Präparate über eine ansteigende Ethanolreihe (2x 70%, 2x 90%, 2x 100%; jeweils 15 s) entwässert und final mit Xylol gewaschen. Aus dem Xylol heraus wurden die Präparate mit Pertex (Medite) permanent eingedeckt.

2.5. Fluoreszenzfärbungen

2.5.1. Darstellung vom Aktin-Zytoskelett mittels Rhodamin-konjugiertem Phalloidin

Phallotoxine, bityklische Peptide aus dem Grünen Knollenblätterpilz *Amanita phalloides* weisen eine hohe Affinität und Spezifität für F-Aktin Filamente auf. Konjugiert mit Fluoreszenzfarbstoffen wird mit ihnen so das Aktin-Zytoskelett von Zellen mikroskopisch visualisiert. Zur Darstellung des Aktin-Zytoskeletts von Zellen wurde zunächst das Medium verworfen und die Zellen für 10 min mit 4 % (v/v) PFA bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurde das PFA entfernt und die Zellen mit 0,1 % (v/v) Triton X-100/PBS für 7 min permeabilisiert, um ein Eindringen des Farbstoffes in das Zytoplasma zu gewährleisten. Um unspezifische Bindung des Farbstoffes zu vermeiden, wurden die Zellen mit 1% (v/v) BSA/PBS für 20 min blockiert und anschließend mit PBS gespült. Tetramethylrhodamin-(TRITC/Rhodamin) konjugiertes Phalloidin wurde gemeinsam mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in Antibody-Diluent verdünnt (Rhodamin-Phalloidin [165 nM] + DAPI [1 µg/ml]) und mit den Zellen für 20 min inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde überschüssiger Farbstoff mittels PBS-Spülens entfernt und die Präparate mit dem Eindeckmedium DABCO (2,5% (w/v) 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan [DABCO] in 90% Glycerol; pH 8,6) eingedeckt.

Tabelle 9: Kurzprotokoll Rhodamin-Phalloidin Färbung von F-Aktin

Beschreibung	Reagenz	Dauer [min]
Fixierung	4% PFA	10
Permeabilisierung	0,1 % (v/v) Triton X-100/PBS	7
Waschen	PBS	/
Blockierung	1% (w/v) BSA/PBS	20
Waschen	PBS	/
Färbung	Rhodamin-Phalloidin [165 nM] + DAPI [1 µg/ml]	20
Waschen	PBS	/
Eindecken	DABCO	/

2.5.2. Immunfluoreszenzfärbungen

Zur simultanen Visualisierung von zwei oder mehr Zielantigenen wurden Immunfluoreszenz-Färbungen angewendet. Hierbei wurden Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies gewählt um diese durch spezifische, fluorochromkonjugierte Sekundärantikörper zu detektieren. Bei Zellkulturen wurde zuerst das Medium entfernt, die Zellen mit 4% (v/v) PFA für 10 min fixiert und das PFA anschließend entfernt. Eine Permeabilisierung erfolgte für 7 min bei RT mit 0,25% (v/v) Triton X-100/PBS und anschließenden Waschen mit PBS. Die Primärantikörper wurden getrennt voneinander mit Antibody Diluent verdünnt und nacheinander jeweils für 45 min bei RT appliziert. Nach Inkubation erfolgte ein gründliches Waschen mit PBS und Applikation des nächsten Primärantikörpers für 45 min. Die Sekundärantikörper wurden gemeinsam in Antibody Diluent 1/200 verdünnt, mit DAPI versetzt (1 µg/ml) und für 45 min bei RT inkubiert. Nach Beendigung wurden überschüssige Antikörper mittels PBS Waschens entfernt und die Proben mit DABCO eingedeckt. Bei jeder Färbung wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die keine Primärantikörper enthielt, um die Spezifität der jeweiligen Sekundärantikörper zu überprüfen. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Eclipse 80i, Nikon) mit einer optischen Fluoreszenzkamera. Um Autofluoreszenz aufgrund von Fixierungsartefakten, zellulären Vesikeln etc. vom spezifischen Signal der Färbung zu diskriminieren, wurde für jede Färbung die Belichtungszeit der Proben individuell angepasst. Hierfür wurde eine kürzere Belichtungszeit der zu untersuchenden Probe gewählt, als die Belichtungszeit der Negativkontrolle bei der bereits Eigenfluoreszenz erscheint. Die Fluorochrome der Sekundärantikörper wurden den Filtern des Analysemikroskops entsprechend gewählt. Im Regelfall wurden für Doppelfärbungen Alexa488- sowie Rhodamin-konjugierte Sekundärantikörper verwendet. Tabelle 10 zeigt ein Kurzprotokoll der Immunfärbung:

Tabelle 10: Kurzprotokoll Immunfluoreszenzfärbung für zwei verschiedene Antigene

Beschreibung	Reagenz	Dauer [min]
Fixierung	4% PFA	10
Permeabilisierung	0,25 % (v/v) Triton X-100/PBS	7
Waschen	PBS	/
1. Primärantikörper	Antikörper	45
Waschen	PBS	/
2. Primärantikörper	Antikörper	45
Waschen	PBS	/
Sekundärantikörper	Antikörper 1/200 mit DAPI (1µg/ml)	45
Waschen	PBS	/
Eindecken	DABCO	/

2.5.3. Bildanalytische Auswertung mit ImageJ

Im Falle von Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte eine Auswertung mittels ImageJ (Version 1.47 bezogen von: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Zur relativen Quantifizierung des Aktin-Signals sowie des HSP47-Signals wurde jeweils das im TRITC- bzw. FITC-Filter aufgenommene Bild im RGB-Modus auf den Anteil der Farbe untersucht. Der Anteil der jeweiligen Farbe im Bild wurde dann auf die Anzahl der im Bild vorhandenen Zellen normalisiert. Im Fall der Transfektionsversuche wurden für jede Art von Plasmid zwei Wells transfiziert. Für die Analyse wurden bei 100x Vergrößerung von jedem der beiden Wells 4 Bilder aufgenommen sowie jeweils 8 Bilder von der Vehikel-Kontrolle und den nicht-transfizierten Zellen. Die Einzelbilder des DAPI, FITC und TRITC-Filters wurden übereinander gelegt und der Anteil der Ki67-positiven Zellen von den DAPI/GFP-doppel positiven Zellen gezählt.

2.6. Durchflusszytometrie

2.6.1. Annexin-V Assay

Zur Detektion und Quantifizierung apoptotischer Zellen wurde die Verlagerung von Phosphatidylserin (PS) von der Zellinnenseite der Membran auf die Außenseite mittels fluoreszenzkonjugiertem Annexin-V nachgewiesen. PS befindet sich normalerweise nur auf der Innenseite und wird erst beim programmierten Zelltod auf die Außenseite der Membran verfrachtet. Annexin-V ist in der Lage PS mit einer hohen Affinität zu binden. Diese Bindung lässt sich im Falle einer Konjugation mit Fluorochromen detektieren sowie quantifizieren. Um den Einfluss der erzwungenen

Expression von BAMBI in Tumorzellen (A549) auf Apoptose zu untersuchen, wurden die Zellen 48h nach Transfektion abgelöst, gewaschen und anschließend gezählt. 1×10^6 Zellen je Transfektion (BAMBI-Expressionsplasmid und Kontroll-Plasmid) sowie der nicht-transfizierten Kontrollzellen (Wildtyp) wurden in 5 ml FACS-Röhrchen mit 1 ml 1x Annexin-V Puffer (10x: 0,1 M Hepes pH 7,4; 1,4 M Natriumchlorid; 25 mM Calciumchlorid) resuspendiert. Zur Kompensationseinstellung am Durchflusszytometer sowie als Positivkontrolle für die Färbung wurden Zellen permeabilisiert. Hierfür wurden jeweils 1×10^6 Zellen für 7 min mit 0,1 % (v/v) Triton X-100/PBS inkubiert und anschließend bei $300 \times g$ für 5 min pelletiert um überschüssiges Detergenz zu entfernen. Nach Entfernen der restlichen Flüssigkeit wurden die Zellen in 1 ml Annexin-V Puffer resuspendiert und gemeinsam mit den zu untersuchenden Zellen weiter bearbeitet. $300 \mu\text{l}$ Zelllösung (3×10^5 Zellen) wurden in neue 5 ml FACS-Röhrchen überführt und nach unten stehendem Schema mit den Fluoreszenzfarbstoffen für 15-25 min im Dunkeln bei RT inkubiert:

Tabelle 11: Kurzprotokoll Annexin-V Assay

Beschreibung	Zellzahl	Annexin-V APC [μl]	7-AAD [μl]	Fixierung	1x Puffer nach Inkubation [μl]	Kompensation
Ungefärbte Kontrolle	3×10^5	/	/	x	200	x
Positiv Kontrolle Annexin V	3×10^5	15	/	x	200	x
Positiv Kontrolle 7- AAD	3×10^5	/	15	x	200	x
GFP ungefärbt	3×10^5	/	/	x	200	x
Wildtyp	3×10^5	15	15	/	200	/
Plasmid Kontrolle	3×10^5	15	15	/	200	/
Insert	3×10^5	15	15	/	200	/

Um ein Auseinanderbrechen der permeabilisierten Zellen während der Analyse zu verhindern, wurden die mit Triton X-100 behandelten Zellen mit 1% PFA für 5 min bei RT im Dunkeln fixiert. Überschüssiges PFA wurde nach Pelletieren der Zellen für 5 min bei $300 \times g$ entfernt und die Zellen mit $500 \mu\text{l}$ Annexin-V Puffer resuspendiert. Die Analyse erfolgte innerhalb von 60 min an einem BD LSRII Durchflusszytometer mit der BD FACSAria Software Version 6. Als Fluorochrom für Annexin-V wurde Allophycocyanin (APC) gewählt, das eine Anregungswellenlänge von 633 nm und

eine Emissionswellenlänge von 680 nm besitzt. Da die positiv transfizierten Zellen GFP exprimieren (Anregungswellenlänge 475 nm, Emissionswellenlänge 509 nm), ist so eine sichere Diskriminierung der Signale möglich. Zur Anfärbung von DNA wurde 7-Aminoactinomycin (7-AAD) verwendet, welches bei 540 nm angeregt wird und bei 647 nm sein Emissionsmaximum aufweist.

Für jeden Versuch erfolgte eine individuelle Kompensation in der Software. Da nur die positiv-transfizierten Zellen untereinander auf Apoptose untersucht werden sollten, wurden nach folgendem Schema die *gates* gesetzt bzw. Populationen definiert: Zuerst wurde anhand der Flächen des Streulichts im *forward scatter* (FSC) und *side scatter* (SSC) die korrekte Größe (FSC) und Granularität der zu untersuchenden Zellen definiert. Mögliche Dupletten bzw. Zellaggregate erscheinen im Streulicht von FSC und SSC bei gleichzeitiger Betrachtung von Fläche (*area*) und Intensität (*height*) abseits der Diagonalen im *plot*. Da die Analyse ausgerichtet ist, die Apoptose-Rate pro Einzelzelle zu bestimmen, wurden diese Signale deshalb subtrahiert. Um nur erfolgreich transfizierte Zellen zu untersuchen, wurden ausschließlich Zellen mit einem Mindestmaß an GFP-Expression ($>10^3$ relative Fluoreszenz) für die Auswertung zugelassen. Für jede Messung wurden mindestens 5×10^4 Ereignisse gezählt.

2.6.2. Fluoreszenzaktivierte Zell-Sortierung

Transfizierte A549 Zellen wurden in der FACS Core Facility des UKSH Campus Lübeck durch Dr. Tilman Vollbrandt nach GFP-Expression sortiert, um homogene Kulturen von erfolgreich transfizierten Zellen zu erhalten.

2.7. Molekularbiologische Techniken

2.7.1. Isolierung von Nukleinsäuren aus Frisch- und Paraffin-Material

2.7.1.1. Entparaffinierung zur Isolierung von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren aus Paraffinmaterial zu isolieren, wurden zunächst mit einem Mikrotom 10 μm dünne Schnitte von den Gewebelöcken angefertigt und diese in Reaktionsgefäße überführt. Das Paraffin wurde mittels Xylol aus dem Gewebe herausgelöst und anschließend in Alkohol überführt. Die jeweiligen Mengen an Reagenz und die Inkubationszeiten sind Tabelle 12 zu entnehmen. Die Inkubation mit Xylol und Alkohol erfolgte unter Rotation bei 30 U/min. Das Material wurde anschließend für 5 min bei 13000 x g vom Reagenz getrennt und der Überstand

verworfen. Nach Abnehmen des letzten EtOH-Überstandes wurden verbleibende Alkoholreste in einer Unterdruckzentrifuge bei 2000 U/min. für 5 min evaporiert. Die so getrockneten Gewebeproben wurden dann je nach Art der Nukleinsäureisolierung mit den entsprechenden Lysepuffern versetzt und weiter prozessiert. Die Entparaffinierung wurde im Fall von Frischmaterial bzw. Gefriermaterial nicht angewendet.

Tabelle 12: Entparaffinierung zur Isolierung von Nukleinsäuren

Menge [ml]	Reagenz	Dauer [min]	Vorgang
1	Xylol	10	Rotation
		5	Zentrifugation
1	Xylol	10	Rotation
		5	Zentrifugation
1	100% EtOH	10	Rotation
		5	Zentrifugation
1	100% EtOH	10	Rotation
		5	Zentrifugation
		5	Unterdruckzentrifugation

2.7.1.2. DNA-Isolierung

DNA aus Mäuseohren und Paraffinmaterial wurde standardmäßig mit dem QIAmp DNA Mini Kit isoliert. Das Gewebe wurde zunächst mittels Proteinase K bei 56°C im Wasserbad über Nacht lysiert. Die Proteinase K wurde nach Zugabe von AL-Puffer und durch Erhitzen der Probe im Wasserbad bei 70°C für 10 min inaktiviert. Um die Probenlösung in ein geeignetes Milieu für die Bindung an die Silikamembran zu bringen, wurde EtOH zugegeben und resuspendiert. Das gesamte Volumen wurde auf die Säule gegeben und bei 6000 x g für 1 min zentrifugiert. Bei diesem Schritt bindet die DNA an die Silikamembran der Säule, während Proteine und restlicher Debris eluiert werden. Die Säule wurde dann auf ein neues 2 ml Reaktionsgefäß transferiert und durch aufeinanderfolgende Waschriffe mit den Puffern AW1 und AW2 entsalzt. Nach jedem Waschriff wurde die Säule auf ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Zur Elution der DNA wurde 100 µl Reinstwasser auf die Membran gegeben, 1 min bei RT inkubiert und anschließend für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Bei Bedarf wurde der Elutionsschritt ein zweites Mal wiederholt. Eine detaillierte Übersicht der applizierten Mengen und Reagenzien ist Tabelle 13 zu entnehmen:

Tabelle 13: Kurzprotokoll DNA-Isolierung

Menge [μ l]	Reagenz	Dauer	Vorgang
180	ATL-Puffer		
20	Proteinase K	ü.N. bei 56°C	Lyse und Zellaufschluß
200	AL-Puffer	10 min bei 70°C	Inaktivierung Proteinase K
200	EtOH (100%)		Umpufferung
		15 s	Vortexen
600	Probengemisch		Bindung an Silikamembran
		1	Zentrifugation
500	AW1		
		1	Zentrifugation
500	AW2		
		1	Zentrifugation
100	Reinstwasser	1	
		1	Zentrifugation/Elution

2.7.1.3. RNA-Isolierung

Der Zellaufschluß erfolgte mit einem Guanidinisothiocyanat (GITC)-haltigen Lysepuffer, dem frisches beta-Mercaptoethanol (BME) zugesetzt wurde (1% v/v). GITC als ein denaturierendes Reagenz inaktiviert RNAsen und BME denaturiert Proteine durch Aufbrechen der Schwefeldisulfidbrücken. Es wurden jeweils 600 μ l Volumen auf die Proben gegeben und im Fall von Gewebe mit einem elektronischen Pistill homogenisiert. Das Lysat wurde von zellulärem Debris durch Zentrifugation getrennt, der Überstand mit 600 μ l EtOH versetzt und sorgfältig resuspendiert. 700 μ l des Gemischs wurden direkt auf die Membran der Säule appliziert und für 2 min bei 6000 x g zentrifugiert. Zur Entfernung störender Salze wurden 700 μ l AW1 Puffer auf die Membran gegeben und anschließend für 2 min bei 6000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß transferiert und es folgten 2 Waschrinne mit jeweils 500 μ l RPE-Puffer und anschließender Zentrifugation bei 6000 x g. Die Elution der RNA erfolgte mit 30 μ l Reinstwasser bei 13000 x g Beschleunigung für 2 min. Eine Übersicht der Extraktion findet sich in Tabelle 14.

Tabelle 14: Kurzprotokoll RNA Isolierung

Menge [μ l]	Reagenz	Dauer [min]	Schritt
600	Lysis-Puffer	/	Lyse/Homogenisierung
		5	Zentrifugation (6000 x g)
600	EtOH		
700	Probengemisch		Bindung an Silikamembran
		2	Zentrifugation (6000 x g)
700	RW1		Entsalzung
		2	Zentrifugation (6000 x g)
500	RPE-Puffer		
		2	Zentrifugation (6000 x g)
500	RPE-Puffer		
		2	Zentrifugation (6000 x g)
30	Reinstwasser		Elution
		2	Zentrifugation (13000 x g)

2.7.2. Nukleinsäurequantifizierung- und Qualitätskontrolle

Isolierte DNA und RNA wurde mit einem NanoDrop 2000 UV-Spektrophotometer quantifiziert (Thermo Scientific). Auf Basis des Lambert-Beerschen-Gesetzes wurde die Absorption der Flüssigkeit bei 260 und 280 nm detektiert. Der Quotient von 260 nm und 280 nm gibt Aufschluss über die Kontamination der Probe mit Proteinen, während die Absorptionswerte bei 260 nm eine Berechnung der Nukleinsäurekonzentration zulassen.

2.7.2.1. RNA-Integritätsbestimmung mit dem Agilent Bioanalyser

RNA die für Transkriptom-Analysen verwendet werden sollte wurde vorher auf ihre Integrität und eventuelle Degradation mittels eines Agilent Bioanalyzers untersucht. Es wurde hierfür das RNA 6000 Nano Kit verwendet. Das System basiert auf einer Mikrofluidik-Kammer die mit einem Polyacrylamidgel gefüllt ist, in der die RNA Proben entsprechend ihrer molekularen Größe durch Anlegen einer Spannung aufgetrennt werden. Eine Visualisierung der wandernden RNA-Moleküle wird durch Zugabe eines laserinduzierbaren Fluoreszenzfarbstoffes ermöglicht und die Bestimmung der Molekülgröße erfolgt zeitlich aufgelöst unter Einbeziehung eines Standards definierter Größe. Die RNA Integritätsnummer (RIN) wird mittels eines Softwarealgorithmus (Schroeder et al. 2006) errechnet, der verschiedene Faktoren des Elektropherogramms miteinbezieht. Unter den Hauptfaktoren die Einfluss auf die

Berechnung der RIN haben sind die Flächen der 28S und 18S Bereiche im Vergleich zu der Gesamtfläche des Elektropherogramms, die Höhe des 28S Peaks und des Markers sowie der Quotient der Fläche der *fast region* verglichen mit der Gesamtfläche (Schroeder et al. 2006).

2.7.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) für Genotypisierung

Mittels PCR wurden Zielsequenzen aus DNA spezifisch amplifiziert, die entstehenden Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend visualisiert. Für die Amplifikation wurde ein Master-Mix hergestellt (siehe Tabelle 15) und zu der *template* DNA (für gewöhnlich 3 µl) geben. Die Amplifikation erfolgte in einem finalen Volumen von 50 µl in einem Thermocycler. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt verwendet: Bambi Wt und KO (94°C, 1 min.; 59°C 1 min.; 72°C 1,5 min.; 39 Wiederholungen). Die Sequenzen der Oligonukleotide sind Appendix X zu entnehmen.

Tabelle 15: Master-Mix PCR für 1 Reaktion

Reagenz	Konzentration [µM]	Menge [µl]
Forward Primer	0,8	2
Reverse Primer	0,8	2
10x PCR RXN Buffer	1	5
50 mM MgCl ₂	20	2
10 mM dNTPs	200	1
Taq DNA Polymerase	0,03	0,3
Aq. Dest		4,7

2.7.4. Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel entsprechend ihrer molekularen Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Herstellung des Gels wurde Agarose (2,4 % w/v) mit 1x TAE Puffer (50x: 2 M Tris; 50 mM EDTA; 1M Essigsäure) versetzt und zum Sieden gebracht. Zur Visualisierung der DNA wurde den Gelen Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) zugegeben. Jeweils 10 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl 1x Xylencyanol-Ladepuffer (10x: 4,6 mM Xylencyanol; 3,3% Glycerol) versetzt, resuspendiert und in die Geltasche appliziert. Die Auftrennung erfolgte bei 80-90 V und 10 mA. Die Banden des Gels wurden auf einem UV-Transilluminationstisch sichtbar gemacht und mit einer Kamera dokumentiert. Die Größenbestimmung erfolgte mittels des Molekulargewichtsmarkers pBR322 *MspI*.

2.7.5. Epigenetische Untersuchungen

Die epigenetischen Untersuchungen zum Methylom wurden in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik des UKSH Campus Kiel (Herr Prof. Dr. Reiner Siebert; Herr Prof. Dr. Ole Ammerpohl) durchgeführt. In Kiel erfolgte sowohl die Prozessierung der isolierten DNA als auch die technische Durchführung der Hybridisierung mittels Illumina Bead Arrays. Die Auswertung und Analyse der Daten geschah in engem Kontakt mit Herrn Prof. Dr. Ole Ammerpohl.

2.7.6. cDNA-Synthese

Für die Genexpressionsanalyse mittels PCR wurde RNA in *complementary* DNA (cDNA) revers transkribiert um dann als *template* in der nachfolgenden Analyse zu dienen. Zur Entfernung unerwünschter genomischer DNA (gDNA) wurde in einem Volumen von maximal 8 µl die RNA mit 1 µl DNase 10x Puffer und 1 µl DNase I versetzt. Bei 37°C für 10 min im Thermocycler erfolgte der Abbau restlicher gDNA um eine falsch-positive Amplifikation von gDNA anstatt cDNA zu vermeiden. Da die Aktivität der DNase I von zweiwertigen Ionen (Mg^{2+}) abhängig ist, wurde jeweils 1 µl EDTA hinzugegeben und für 10 min bei 65°C inkubiert. EDTA wirkt als Chelatbildner und entzieht der Nuklease die essenziellen Ionen, was das Enzym inaktiviert. Die restliche RNA wurde revers mittels *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MuLV RT) transkribiert. Bei dieser Art von Enzym handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die eine Umschreibung von RNA in DNA bewirkt. Generell wurde in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial 120 ng bis 1 µg an Gesamt-RNA für die Reaktionen eingesetzt. Für die Transkriptions-Reaktionen wurde das Maxima First Strand cDNA Synthese Kit von Thermo Scientific eingesetzt. Die vorgefertigten Reagenzien enthalten das Enzym, RNase Inhibitor, dNTPs, Reaktionspuffer sowie Oligo (dT)₁₈ und *random hexamer primer*. Die gleichzeitige Verwendung von zufälligen Oligonukleotidhexameren gemeinsam mit 18-zähligen Desoxythymidintriphosphaten (oligo dT-18) ermöglicht eine Transkription in einer sehr kurzen Zeit, indem die Primer sich sowohl an den poly-A-Schwanz der mRNA als auch zufällig an das gesamte Transkript anlagern. Statistisch entstehen so mehrere Transkriptionsstartpunkte und es wird mehr *template* in einer kürzeren Zeit umgeschrieben als bei alleiniger Verwendung von oligo dT-18. Dies ist für die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) von Vorteil. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. 11 µl der mit DNase I sowie mit EDTA inkubierten RNA wurde mit 3 µl nukleasefreiem Wasser versetzt und mit 4 µl 5x

Reaktionspuffer sowie 2 µl Maxima Enzym auf 20 µl aufgefüllt. Bei 25°C für 10 min erfolgte das *annealing* der Primer, gefolgt von der Elongationsreaktion für 15 min bei 50°C. Die Reaktion wurde anschließend für 5 min bei 85°C terminiert und die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Tabelle 16 zeigt die cDNA-Synthese als Kurzprotokoll.

Tabelle 16: Kurzprotokoll cDNA Synthese für 1 Reaktion

Reagenz	Menge/Dauer/Temp.	Beschreibung
RNA	120 - 1000 ng	DNA-Verdau
Nukleasefreies Wasser	add 8µl	
DNase 10x Puffer	1 µl	
DNase I	1 µl	
10 min 37°C		
EDTA	1 µl	Inaktivierung DNase I
10 min 65°C		
5x Reaktionspuffer	4 µl	Ansatz Reverse Transkription
Nukleasefreies Wasser	3 µl	
Maxima Enzym	2 µl	
10 min 25°C		
15 min 50°C		Reverse Transkription
5 min 85°C		Termination Transkription

2.7.7. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Im Gegensatz zur klassischen PCR die eine Endpunktanalyse darstellt, handelt es sich bei der Real-Time PCR um eine Analyse mit Datenerhebung in Echtzeit. Anstatt am Ende der Amplifikation die DNA elektrophoretisch aufzutrennen und mittels interkalierender Farbstoffe zu visualisieren, erfolgte hierbei die Analyse während der PCR-Reaktion. Verwendet wurden Hydrolysesonden (Roche Universal Probe Library), die spezifisch für die jeweiligen Primer sind. Die Sonden sind 8-9 Nukleotide lange DNA-Fragmente die am 5'-Ende mit Fluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit einem *quencher* konjugiert sind. Solange FAM und der *quencher* in einer definierten räumlichen Nähe sind, kann keine Signaldetektion erfolgen. Während der Annealingphase der PCR-Reaktion lagern sich die Hydrolysesonden in den Bereich zwischen den Primern an. In der Elongationsphase werden die Sonden dann durch die Polymerase und ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität abgespalten. Durch das Hydrolysieren der Sonden werden FAM und *quencher* voneinander getrennt und die

Signal detektion kann erfolgen. Dies hat zur Folge, dass für jeden PCR-Zyklus separat Fluoreszenzsignale detektiert werden. Mit Zunahme der PCR-Produkte binden vermehrt Sonden und es werden stärkere Fluoreszenzen gemessen. Ab einem bestimmten Zeitpunkt, individuell abhängig von der Ausgangstranskriptmenge, hebt sich das Fluoreszenzsignal der Probe als signifikant unterschiedlich zum Hintergrundsignal ab. Dieser Zeitpunkt wird als *crossing point* (Cp) bezeichnet und für die Berechnung der Genexpression verwendet. Die qRT-PCR wurde mit dem LightCycler 480 II System der Firma Roche Applied Sciences durchgeführt und soweit nicht anders beschrieben, *Advanced Relative Quantification* als Analysemethode ausgewählt. Bei dieser Form der relativen Quantifizierung der Genexpression wird der Verhältniswert des *target* zu dem *reference gene* gebildet. Das Ergebnis der Expressionsanalyse wird dann als *target/reference ratio* bezeichnet. Um die Unterschiede zwischen Experimenten zu nivellieren, wurden für jedes Experiment aus den zu untersuchenden cDNAs gepoolte Standardreihen für jedes Gen erstellt, um die Effizienz der PCR-Reaktion miteinzubeziehen und damit inter-experimentelle Schwankungen zu vermeiden. Im Falle von stimulierten Proben bzw. um Unterschiede zwischen krank und gesund zu quantifizieren, wurde für die Ziel-Gene der *Fold Change* (FC) berechnet.

2.7.8. Transkriptom-Analyse

Transkriptomweite Genexpressionsanalysen wurden mit Agilent 4x44k Arrays und dem Agilent Low Input Quick Labeling Kit durchgeführt. Hierbei wird isolierte RNA mittels Reverser Transkriptase zunächst in cDNA umgeschrieben. Die cDNA dient dann als *template* für die Amplifikation und gleichzeitige Fluoreszenzmarkierung (*Labeling*) mittels Cyanine-3 (Cy3) durch T7 RNA-Polymerasen. Die fluoreszenzmarkierte cRNA wird dann isoliert, ihre spezifische Aktivität bestimmt und mit den Arrays für 17 Stunden hybridisiert.

2.7.8.1. Spike-In Mix, Reverse Transkription und Labeling

Die Agilent Arrays enthalten interne Positivkontrollen in Form von Oligonukleotid-Sonden anhand derer die Effizienz der durchgeführten Reaktionen kontrolliert und eine Normalisierung der Expressionsdaten zwischen einzelnen Arrays möglich wird. Hierfür wurde der Proben-RNA jeweils eine definierte Menge verdünnten Spike-In Mix zugefügt. Die jeweilige Verdünnung des verwendeten Spike-In Mix ist abhängig von der Menge an Input-RNA und aus Tabelle 17 ersichtlich. Vor Verwendung bzw.

Anlegen der Verdünnungsreihe wurde der Spike-In Mix bei 37°C für 5 min inkubiert, resuspendiert und anschließend zentrifugiert um eine Durchmischung der Reagenzien zu garantieren und etwaige Tropfen von der Innenwand des Reaktionsgefäßes zu entfernen. Zum Anlegen der Verdünnungen wurde das Gemisch nach jedem Pipettierschritt resuspendiert und zentrifugiert.

Tabelle 17: Spike-In Mix

Input-Menge RNA [ng]	Serielle Verdünnungen				Menge Spike-In Mix je Reaktion [µl]
	1.	2.	3.	4.	
25	1/20	1/25	1/20	1/4	2
200	1/20	1/25	1/10		2

Für jede Reaktion wurde der Probe und dem Spike-In Mix jeweils 0,8 µl T7-Primer und 1 µl nukleasefreies Wasser zugesetzt und für 10 min bei 65°C denaturiert, um eine Linearisierung der RNA zu gewährleisten. Um zu verhindern, dass die RNA erneut Sekundärstrukturen ausbildet, wurde das Gemisch nach Denaturierung für 10 min auf Eis inkubiert. Bevor den Proben der Master-Mix für die Reverse Transkription zugegeben werden konnte, wurde der 5x First Strand Buffer für 3-4 min bei 80°C erhitzt, um eine adäquate Resuspension zu gewährleisten. Der Puffer wurde nach der Inkubation resuspendiert und zentrifugiert. Direkt vor Gebrauch wurde der Master-Mix wie folgt angesetzt:

Tabelle 18: Master-Mix cDNA Synthese für 1 Reaktion

Reagenz	Konzentration	Menge [µl]
5x First Strand Buffer	1	2
0,1 M DTT	20 mM	1
10 mM dNTP	1 mM	0,5
Affinity Script Rnase Block Mix	/	1,2
Summe	/	4,7

4,7 µl cDNA Master-Mix wurden zu jeder Probe zugefügt, resuspendiert und bei 40°C für 2 h inkubiert. Die Reaktion wurde bei 70°C für 15 min terminiert und anschließend für 5 min auf Eis gekühlt. Der Amplifikations- und *Labeling* Master-Mix wurde direkt vor Gebrauch, wie in Tab. 19 ersichtlich, angesetzt. 6 µl Master-Mix wurden zu jeder Probe hinzugegeben und resuspendiert. Die Amplifikations- und Labeling-Reaktion

wurde für 2 h bei 40°C durchgeführt. Bei Bedarf wurde nach diesem Schritt das Zwischenprodukt bei -80°C zwischengelagert.

Tabelle 19: Master Mix Amplifikation und Labeling für 1 Reaktion

Reagenz	Konzentration	Menge [µl]
Nukleasefreies Wasser	/	0,8
5x Transcription Buffer	1	3,2
0,1 M DTT	20 mM	0,6
NTP Mix	/	1
T7 RNA Polymerase	/	0,2
Cyanin 3-CTP	/	0,2
Summe	/	6

2.7.8.2. Aufreinigung und Aktivitätsbestimmung der gelabelten RNA

Die fluoreszenzmarkierte cRNA wurde mit jeweils 84 µl nukleasefreiem Wasser aufgefüllt, um ein Endvolumen von 100 µl zu erreichen. Für die folgende Aufreinigung wurde der RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Zu jeder Probe wurden 350 µl RLT-Puffer gegeben und sorgfältig resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl EtOH wurden 700 µl auf je eine Qiagen Mini Spin Säule gegeben und bei 4°C für 30 s bei 13000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 500 µl RPE-Puffer bei 4°C und Zentrifugation bei 13000 x g für zuerst 30s und danach 60s. Der Durchlauf wurde jedes Mal verworfen und nach dem zweiten Waschschriff die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt. Sollte sich noch RPE-Puffer am Rand des Reaktionsgefäßes oder der Säule befunden haben, wurde erneut für 30s bei 13000 x g zentrifugiert, um eine Trocknung der Membran zu gewährleisten. Zur Elution der cRNA wurde ein neues Reaktionsgefäß verwendet und jeweils 30 µl nukleasefreies Wasser appliziert. Das Wasser wurde für 1 min auf der Membran inkubiert und anschließend für 30 s bei 13000 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde auf Eis bis zu weiteren Verwendung gehalten. Die gelabelte cRNA wurde mit einem NanoDrop UV-VIS Spektrophotometer quantifiziert. Hierfür wurde die Funktion „Microarray“ im Menü ausgewählt und „RNA-40“ als Probenotyp angegeben. Vor der Messung wurde ein Leerwert mit dem Elutionsmedium gemessen und anschließend von jeder Probe folgende Daten aufgezeichnet: Cyanine 3 Farbstoffkonzentration (pmol/µl), RNA Absorptionsverhältnis (260nm/280nm) und die cRNA-Konzentration

(ng/μl). Der Gesamtertrag an fluoreszenzmarkierter cRNA (μg) wurde nach folgender Formel berechnet: (Konzentration cRNA) x 30μl (Elutionsvolumen)/1000. Anhand der Konzentrationen von cRNA (ng/μl) und Cyanine 3 (pmol/μl) wurde die spezifische Aktivität errechnet: (Konzentration Cy3/Konzentration cRNA) x1000= pmol Cy3/ μg cRNA. Für Mikroarrays im 4er-Format (4 Arrays pro Objektträger) wurde ein Ertrag von 1,65 μg cRNA und eine spezifische Aktivität von 6 pmol/μg benötigt.

2.7.8.3. Hybridisierung der cRNA mit 4x44k Whole Genome Arrays

Bevor die fluoreszenzmarkierte cRNA auf die Arrays hybridisiert werden konnte, ist die cRNA fragmentiert worden, um eine gleichmäßige Bindung an die 60 nt Sonden auf den Arrays zu ermöglichen. Um unspezifische Signale zu verhindern, wurde den Reagenzien eine Blockierungslösung beigefügt. Das lyophilisierte Gene Expression Blocking Agent wurde mit 500 μl nukleasefreien Wassers versetzt, sorgfältig resuspendiert und für 4-5 min bei 37°C inkubiert. Etwaige Flüssigkeitsreste am Reaktionsgefäßrand wurden durch Zentrifugation für 5-10 s entfernt. Der rekonstituierte Blockierungspuffer wurde aliquotiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. 1650 ng jeder Probe wurden nach folgendem Schema mit den weiteren Reagenzien versetzt:

Tabelle 20: Ansatz Fragmentierung für 1 Reaktion

Reagenz	Menge [μl]
Cy3-markierte cRNA	1650 ng
10x Gene Expression Blocking Agent	11
Nukleasefreies Wasser	add 52,8
25x Fragmentation Buffer	2,2
Summe	55

Die Fragmentierung erfolgte für 30 min bei 60°C und wurde durch Zugabe von je 55 μl 2x HI-RPM Hybridization Buffer und Inkubation auf Eis für 1 min terminiert. Das Gemisch wurde sorgfältig und unter Vermeidung von Luftblasen resuspendiert und für 1 min bei 13000 x g zentrifugiert, um etwaige Luftblasen zu entfernen. Von den 110 μl der Probe wurden 100 μl unter stetigen Drucks auf den Gasket Slide aufgetragen. Der Microarray wurde mit der aktiven Seite nach unten auf den Gasket Slide gelegt und die Hybridisierungskammer verschlossen. Jede Kammer wurde vor Beginn der Hybridisierung vorsichtig um die Längsachse rotiert und anschließend in

den vorgeheizten Hybridisierungsöfen verbracht. Die Hybridisierung erfolgte für 17 h bei 65°C unter ständiger Rotation.

Die am Folgetag nötigen Gene Expression Wash Buffer 1+2 wurden mit 10% Triton X-102 (0,005%) versetzt und durch Invertieren sorgfältig durchmischt. Der Gene Expression Wash Buffer 2 wurde vor Benutzung bei 37°C über Nacht temperiert. Alle Waschschriffe wurden in einzig für diese Funktion ausgewiesenen Glasküvetten und –Schlitten durchgeführt. Die Küvetten für die Waschschriffe mit Gene Expression Wash Buffer 1+2 wurden auf einen Magnetrührer gestellt und ein kleiner Rührfisch verwendet, um eine stetige Durchmischung während des Waschens zu gewährleisten. Die Demontage der Arrays von den Gasket Slides erfolgte in Gene Expression Wash Buffer 1 bei RT. Nach Demontage aller Arrays wurde der Glasschlitten in eine neue Küvette mit Gene Expression Wash Buffer 1 transferiert und für 1 min bei RT unter Durchmischung mittels eines Rührfisches gewaschen. Während dieser Zeit wurde der vorgewärmte Gene Expression Wash Buffer 2 aus dem Wasserbad entnommen und in die entsprechende Küvette gefüllt. Der Glasschlitten wurde in den vorgewärmten Gene Expression Wash Buffer 2 überführt und für 1 min inkubiert. Nach dem letzten Waschschriff wurde der Glasschlitten vorsichtig aus der Küvette entnommen um Tropfenbildung auf den Arrays zu vermeiden. Bevor die Arrays in die Halterungen eingesetzt wurden, erfolgte eine kurze Trocknung bei RT und ein Abtupfen von Flüssigkeitsresten von der Objektträgerunterseite auf einem Papiertuch.

2.7.8.4. Scannen der Arrays und Extraktion der Rohdaten

Die Arrays wurden nach kurzer Trocknung augenblicklich in die entsprechenden Slide Holder montiert und in den Scanner eingeführt. Das Scannen der Arrays erfolgte nach dem 4x44k V2 Protokoll Stand 2012 und mit der Scan Control Software bei einer Auflösung von 5 µm. Aus den erhaltenen Tiff-Bildern wurden mittels der Feature Extraction Software Version 11.5. die Rohdaten in Form von Tab-Stop formatierten .txt-Dateien extrahiert.

2.7.8.5. Microarray-Auswertung

Eine Auswertung der Microarray-Daten erfolgte sowohl mit GeneSpring GX 12.6 (Agilent), als auch mittels DirectArray Software 1.6 (Oaklabs). Beim Importieren der Array-Rohdaten erfolgte in GeneSpring eine Quantilnormalisierung sowie eine *baseline transformation* zum Median aller Proben. Hierarchische Cluster-Analysen

wurden mittels *squared euclidian* Distanzmatrix berechnet und die Verknüpfung der Cluster erfolgte mittels *Ward's linkage rule*. ANOVA, gepaarter T-Test als auch *Gene Ontology* (GO) Analysen wurden mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,5$ berechnet. Die Input-Listen für die supervidierten Analysen sind in Appendix VII und VIII zu finden. Rohdaten der Microarrays sind in der Klin. & Exp. Pathologie zentral archiviert.

2.7.9. Transiente Transfektion von A549-Zellen mit Expressionsplasmiden

Zur Transfektion von humanen Zellen mit DNA (Expressionsplasmide etc.) wurde TurboFect (Fermentas) Transfektionsreagenz verwendet. Diese Form der Einbringung von Fremd-DNA in Zielzellen basiert auf der Interaktion von kationischen Lipiden mit Nukleinsäuren. Es wird vermutet dass die kationischen Lipide, die aus einem hydrophoben Anker, einer Verbindung und einer polaren Kopfgruppe bestehen die zu transferierende DNA umhüllen und über Interaktion mit der Zellmembran den Transport in das Zellinnere erleichtern (Chesnoy & Huang 2000). Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen entsprechend Tabelle 21 ausgesät. Die DNA wurde in serum-freien Kulturmedium (OPTI-MEM) verdünnt, mit TurboFect vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit, wurde das Kulturmedium gewechselt und das in Tabelle 21 angegebene Endvolumen eingestellt. Die Inkubation der Zellen mit dem DNA/Lipid-Gemisch erfolgte für 6 Stunden im Inkubator. Nach Transfektion der Zellen wurde erneut das Medium gewechselt und am Folgetag 600 $\mu\text{g/ml}$ des Antibiotikums Geneticin/G418 zur Selektion. Die Analyse der Zellen erfolgte 48 h nach Transfektion.

Tabelle 21: Transfektionsansatz für jeweils 1 Reaktion

Well-Platte	Zellen/Well	DNA [$\mu\text{g/Well}$]	Serum-freies Med [μl]	TurboFect [μl]	Vol [ml]
24	$1,5 \times 10^5$	1	add 100	2	1
6	5×10^5	4	add 400	6	4

Für die Transfektion wurde ein Expressionsplasmid mit einem konstitutiv aktiven Promotor (CMV) gewählt der das Protein (BAMBI) mit einem C-terminalen turbo *Green Fluorescent Protein* (GFP)-Tag codiert. Erfolgreich transfizierte Zellen sind über eine auf dem Plasmid codierte Resistenz für Neomycin/G418 selektiert worden.

2.7.10. Retrovirale Transfektion

Die retrovirale Transfektion von NSCLC-Zelllinien erfolgte am DKFZ Heidelberg in der AG Systembiologie der Signaltransduktion (Frau Prof. Dr. Ursula Klingmüller). Ebenso erfolgten dort die Experimente mit den retroviral-transfizierten Zellen. Die Planung der Versuche und Datenanalyse erfolgte gemeinsam mit Dr. Sofia Depner.

2.8. Proteinbiochemische Techniken

2.8.1. Quantifizierung intrazellulären Kollagens mittels Sirius-Red

Kollagen als Bestandteil der ECM ist ein Produkt sowohl normaler als auch gestörter Gewebekomöostase. Im Falle fehlregulierter Wundheilungsprozesse können Kollagene übermäßig synthetisiert und sekretiert werden. Im Prozess dieser Fibrosierung verdickt sich die ECM und kann zu physiologischen Einschränkungen führen. Eine einfache Methode um den Kollagenanteil im Gewebe und die – Produktion von Zellen zu bestimmen ist der kolorimetrische Nachweis mittels spezifischer Farbstoffe. Die Farbstoffe Sirius Red F3BA und Fast Green FCF binden spezifisch Kollagen I, III, IV sowie nichtkollagenes Bindegewebe. Sirius Rot und Fast Green weisen unterschiedliche Absorptionsmaxima auf und können so nach Elution mit NaOH/Methanol (1:1) mittels UV-Spektroskopie detektiert werden. Die angewandten Methoden zur Quantifizierung intra- und extrazellulären Kollagens basieren auf der Arbeit von (López-De León & Rojkind 1985) und die Reagenzien wurden als gebrauchsfertige Lösung (Chondrex Assay, Hoelzel Biotech) bezogen.

2.8.2. MTT-Assay

Die Vitalität bzw. Stoffwechselaktivität von Zellen wurde durch einen kolorimetrischen Nachweis bestimmt. Hierbei wird der gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch NADH und NADPH sowie den Succinat-Dehydrogenasen in blauviolett, wasserunlösliches Formazan reduziert. Die Reaktion ist abhängig von der Glykolyserate der Zellen und gibt damit Aufschluss über die Stoffwechselaktivität die auch einen Anhaltspunkt für Zellproliferation darstellt. Die Versuche wurden in 96-Well-Platten mit 10.000-100.000 Zellen/Well in einem Volumen von 100 µl durchgeführt. 10 µl MTT-Reagenz (5 mg/ml in PBS) wurden zu 100 µl Zellkulturmedium gegeben und die Zellen für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Überstand wurde entnommen und der Farbstoff durch Zugabe von 100 µl MTT-Lyse-Puffer (0,5% Essigsäure und 10% SDS in 99,4 ml DMSO) freigesetzt. Die Analyse erfolgte in einem Plattenlesegerät bei 550 nm Wellenlänge.

2.9. Zellkultur

2.9.1. Dauerzellkultur immortalisierter Zelllinien

Für Zellkultur-Experimente wurden verschiedene humane NSCLC Zelllinien verwendet (Tabelle 22). Zunächst wurden die Zellkultur-Experimente am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) Campus Lübeck in der Laborgruppe von Prof. Dr. Jan Rupp am Institut für Hygiene und Mikrobiologie durchgeführt. Ab Mitte 2012 wurde eine Zellkultur in eigenen Räumlichkeiten am Forschungszentrum Borstel etabliert und für die späteren Experimente verwendet. Die Routine-Pflege der Zellkultur wurde von Frau Bettina Baron-Lühr durchgeführt. Alle immortalisierten Zelllinien wurden in DMEM *high Glucose* Medium mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 1% Natriumpyruvat und 1% *Non Essential Amino Acids* (NEAA) in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Tabelle 22: verwendete Zelllinien

Benennung	Tumor-Entität	Geschlecht	Alter	EGFR-Status [Exon]
A549	Adenokarzinom	männlich	58	Wt
H838	Adenokarzinom	männlich	59	Wt
H1650	Adenokarzinom	männlich	27	19 (E746-A750)
H1975	Adenokarzinom	weiblich	unbekannt	20 (T790M), 21 (L858R)

Die Zelllinien H838, H1650, H1975 waren eine Gabe von Frau Prof. Dr. Ursula Klingmüller (DKFZ) und die A549-Zellen wurden von Prof. Dr Jan Rupp (UKSH Lübeck) bezogen.

2.9.2. Isolierung und Kultivierung Alveolärer Epithelzellen Typ II (AECII)

Zur Isolierung von primären, humanen Alveolären Epithelzellen Typ II (AECII) wurden frische Lungengewebe aus der LungenClinic Großhansdorf verwendet. Es handelte sich um Restmaterial aus Pneu- bzw. Lobektomien von Patienten mit Lungenkrebs oder radiologisch auffälligen Vorbefunden. Makroskopisch tumorfreies Gewebe wurde zunächst mit PBS von außen gespült und anschließend mittels Kanüle über die Bronchien perfundiert um überschüssiges Blut, Mukus und Immunzellen zu entfernen. Im Falle einer Aufarbeitung am Folgetag wurde das Gewebe in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 4°C gelagert. Um eine große Oberfläche zu schaffen, wurde das Lungengewebe mit chirurgischen Rasierklingen in ca. 0,8 cm x 0,3 cm große Stücke geschnitten und mit PII Puffer (1,9

mM Calciumchlorid-di-Hydrat; 1,3 mM Magnesiumsulfat-hepta-Hydrat; 136 mM Natriumchlorid; 6,1 mM Kaliumchlorid; 3,2 mM Di-Natriumhydrogenphosphat; 6,1 mM Glucose; 9,9 mM HEPES) über einem Sieb gespült. Die zerkleinerten Gewebestückchen wurden anschließend für 60 min bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator in PII-Puffer mit 2,5 mg/ml Dispase II unter ständigem Rühren inkubiert. Anschließend wurden die Gewebestückchen mit einer Pinzette manuell zerkleinert und mittels Aufziehen durch serologische Pipetten (10 ml) durch die auftretenden Scherkräfte homogenisiert. Die Flüssigkeit wurde über Gaze abnehmender Maschenweite (100 µm, 50 µm und 20 µm) filtriert und die losgelösten Zellen mittels Zentrifugation bei 478 x g für 15 min bei RT pelletiert. Nach Beseitigung der groben Gewebereste durch Filtration wurden die Zellen in 50 ml PII-Puffer (mit 0,001% Accutase (v/v) und 20 µg/ml DNase I) resuspendiert und je 10 ml Suspension vorsichtig über 10 ml Bicolll-Gradienten-Lösung geschichtet. Mittels des entstehenden Dichtegradienten wurden die Einzelzellen von Detritus und Erythrozyten bei 478 x g für 25 min. bei RT separiert. Die entstehende Interphase wurde abgenommen und mit 478 x g für 15 min. bei 4°C zentrifugiert. Um restliche Zelltrümmer und Erythrozyten zu entfernen, erfolgten Zentrifugationsschritte in PII-Puffer bis keine Trübung des Überstandes mehr auftrat. Bis zu diesem Schritt bestand die Zellsuspension noch aus einem Gemisch von Alveolarmakrophagen, Bronchialepithelzellen, AECII und anderen Immunzellen. Da AECII auf Kunststoffuntergrund nur langsam adhären, wurden jeweils 5×10^7 Zellen pro Petrischale aufgetragen und bei 37°C für 20 min. inkubiert um adhären Zellen zu entfernen. Bei Bedarf wurde die Adhärenz 1-2x wiederholt.

Die Depletion restlicher Immunzellen aus der Suspension erfolgte mittels antikörperkonjugierter (anti-CD45), paramagnetischer Kügelchen (*micro beads*, Miltenyi). Hierfür wurden je 1×10^7 Zellen in einem Volumen von 80 µl MACS-Puffer (PBS pH 7,2 mit 0,5% BSA und 2 mM EDTA) resuspendiert, mit 20 µl CD45-*micro beads* versetzt und bei 4°C und vorsichtiger Rotation vermischt. Es folgte ein Waschschriff mit 2 ml MACS-Puffer und eine anschließende Zentrifugation bei 306 x g für 7 min. bei 4°C trennte die Bead-Zell-Komplexe von nichtgebundenen Beads im Überstand. Die pelletierten Bead-Zell-Komplexe wurden in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert und die so markierten Zellen wurden auf die LD-Säule (Miltenyi) geladen. Die Säule wurde in einem Magneten platziert, mit 500 µl MACS-Puffer gespült und das Eluat aufgefangen. In diesem Fall handelte es sich um eine negative

Selektion bei der die nichterwünschten Zellen in der Säule zurückgehalten wurden und das Eluat die aufgereinigten AECII enthielt. Von jeder Isolation wurden Zytozentrifugations-Präparationen angefertigt, Hope-fixiert und auf die Expression von AECII-spezifischen sowie die Abwesenheit von Immunzellmarkern analysiert.

2.9.3. Zytozentrifugationspräparation

Isolierte und abgelöste Zellen wurden zur weiteren Färbung (Immunzytochemie oder Immunfluoreszenz) auf Objektträgern mittels Zentrifugation appliziert. Hierfür wurden 1×10^6 Zellen in 1ml 1% (w/v) BSA/PBS resuspendiert und jeweils 80 μ l (ca. 8×10^4 Zellen) der Suspension pro SuperFrost plus Objektträger in die Cytospin®-Trichter (Thermo Fisher) gegeben. Die Zellen wurden dann für 4 min bei 600 U/min und mittlerer Beschleunigung abzentrifugiert. Nach Auslaufen der Zentrifuge wurden die Objektträger entnommen und mittels HOPE-Standard-Protokoll fixiert.

2.10. Statistische Auswertung und Datendarstellung

Diagramme wurden mit GraphPad Prism Version 5 erstellt und die Daten sind, so nicht anders erwähnt, als Mittelwert +/- Standardfehler angezeigt. Die jeweilige statistische Auswertung ist der Abbildungslegende zu entnehmen. Sofern kein signifikantes Ergebnis vorlag, wurde dies nicht explizit in der Darstellung angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. BAMBI und der TGF β -Signalweg bei nichtneoplastischen Lungenerkrankungen

3.1.1. Histologische Darstellung des TGF β -Signalwegs

Der Einfluss des TGF β -Signalwegs bei nichtneoplastischen Lungenerkrankungen ist komplex; gerade im Bezug auf Fibrosierung und Emphysembildung (Bonniaud et al. 2004; Gauldie et al. 2006; Königshoff et al. 2009). Eine Darstellung des Normalzustandes der Expression und Lokalisierung der TGF β -Signalwegsmediatoren im humanen Gewebe nicht unproblematisch, da gesunde Patienten selten operiert werden und Transplantationslungen in der Regel nicht für die Forschung freigegeben werden. Im vorliegenden Fall wurden daher die Gewebe von 9 Patienten ohne eine zugrunde liegende, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung untersucht und mit Geweben von Patienten mit nichtneoplastischen Lungenerkrankungen verglichen. Hierfür wurde Patientenmaterial von Emphysemen (N=24) und IPF (N=10) verwendet, um in Abhängigkeit vom Zelltyp und Expressionsstärke die Lokalisierung der TGF β -Signalwegsmediatoren zu analysieren.

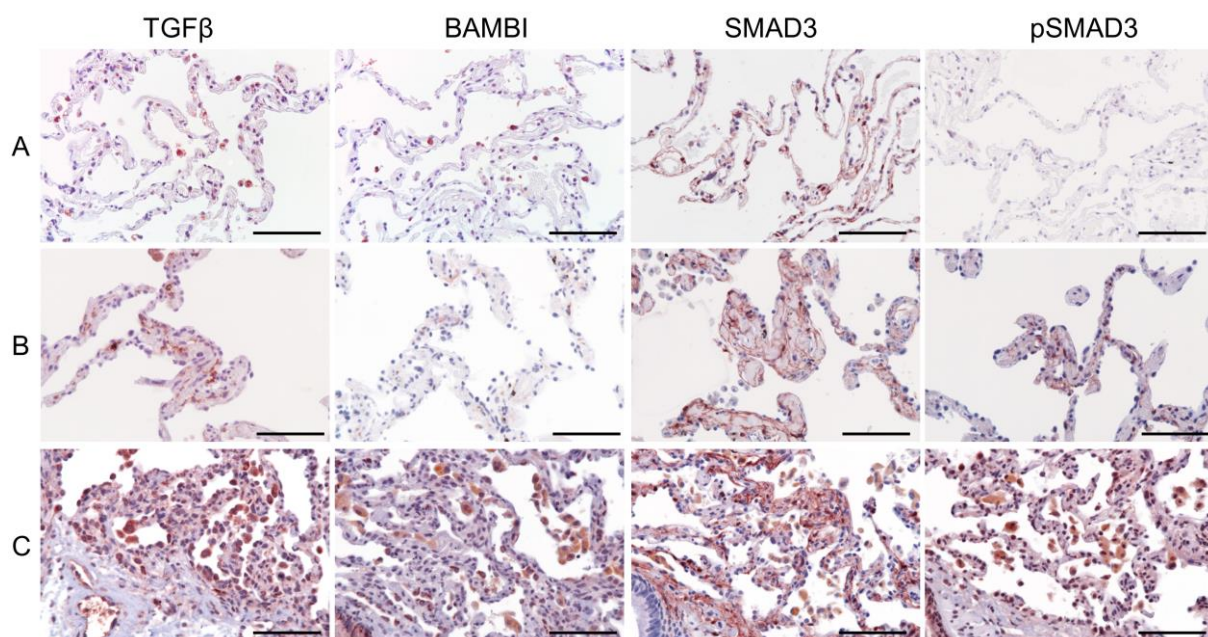


Abbildung 4: Die Expression der TGF β -Signalwegsmediatoren im tumorfremem Lungengewebe. Hope-fixierte (A+B) sowie formalinfixierte (C), paraffineingebettete Gewebe von COPD-freier Lunge (A), Emphysem (B) und IPF (C) wurden auf die Expression von TGF β , BAMBI, SMAD3 und pSMAD3 mittels Immunhistochemie untersucht. Alle Aufnahmen bei 400x Vergrößerung und mit Maßstabsbalken =100 μ m.

Abbildung 4 zeigt ein exemplarisches Bild von jeweils einem Emphysem und einer IPF, verglichen mit dem Gewebe eines Patienten ohne COPD.

BAMBI, TGF β und pSMAD3 in AM und AECII; SMAD3 hauptsächlich in AECI

Allgemein ist das Signal von TGF β in der tumorfreien Lunge granulär und hauptsächlich in den AM und AECII anzutreffen. Die Granularität der AECII verstärkt sich im IPF-Gewebe und ist eines der dominierenden Merkmale im Präparat. (Abbildung 4A). Ein vergleichbares Bild bietet sich für BAMBI. SMAD3 hingegen wird hauptsächlich in den Bindegewebszellen und den AECI exprimiert. Besonders in der COPD-freien Lunge ist SMAD3 das dominierende Signal und kleidet die Alveoli entlang der AECI aus. Eine Phosphorylierung von SMAD3 lässt sich nur in der IPF beobachten und ist dort in den AECII anzutreffen, die entlang der fibrotisch-verdickten Septen sitzen (Abbildung 4C).

Emphysem und IPF unterscheiden sich in der Expression der TGF β -Mediatoren

Die Verteilung der Marker (Tabelle 23) hinsichtlich ihrer Expressionsstärke sowie einer rein qualitativen Aussage (Expression/keine Expression, Abbildung 5) zeigt eindeutige Unterschiede zwischen COPD-freier Lunge, Emphysem und IPF. Es ist zu beobachten, dass die Expressionsstärke von TGF β in AM im Emphysem ansteigt und ihren Höhepunkt bei der IPF findet. Ein ähnliches Muster zeigt sich für BAMBI. Bei einer statistischen Überprüfung der rein qualitativen Aussage (Abbildung 5) zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Krankheiten für TGF β in AM. Gleiches gilt für BAMBI und SMAD3. Die phosphorylierte Form von SMAD3 zeigt sich als signifikant unterschiedlich in ihrer Expression zwischen COPD-freier Lunge und IPF sowie zwischen Emphysem und IPF. Eine Expression von SMAD3 wurde einzig in AECI beobachtet mit ihrem stärksten Phänotyp in der COPD-freien Lunge. Alle untersuchten Gewebe zeigten hierbei eine dominierende Expression (100% Score 3). Eine detaillierte Aufstellung von Patientendaten (Alter, Geschlecht etc.) ist Appendix 1 zu entnehmen.

Tabelle 23: Übersicht der Expression von TGF β -Signalwegsmediatoren in verschiedenen Zelltypen [%]

Gewebe	COPD-freie Lunge															
	TGF β				Bambi				Smad3				pSmad3			
Marker	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
AM	22,2	11,1	55,6	11,1	0,0	88,9	11,1	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
AECI	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0
AECII	22,2	44,4	33,3	0,0	33,3	55,6	11,1	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
BEP	0,0	37,5	62,5	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	50,0	37,5	12,5	0,0
BGW	22,2	33,3	44,4	0,0	22,2	66,7	11,1	0,0	0,0	0,0	11,1	88,9	11,1	88,9	0,0	0,0
Gewebe	Emphysem															
	TGF β				Bambi				Smad3				pSmad3			
Marker	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
AM	0,0	12,5	41,7	45,8	20,8	41,7	25,0	12,5	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
AECI	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	8,3	91,7	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
AECII	91,7	8,3	0,0	0,0	87,5	12,5	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	95,8	4,2	0,0	0,0
BEP	94,1	5,9	0,0	0,0	62,5	31,3	6,3	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	31,6	63,2	5,3	0,0
BGW	12,5	79,2	8,3	0,0	37,5	62,5	0,0	0,0	8,3	8,3	50,0	33,3	45,8	50,0	4,2	0,0
Gewebe	IPF															
	TGF β				Bambi				Smad3				pSmad3			
Marker	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
AM	0,0	0,0	10,0	90,0	0,0	20,0	80,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	40,0	50,0
AECI	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	30,0	30,0	100,0	0,0	0,0	0,0
AECII	0,0	0,0	10,0	90,0	0,0	10,0	60,0	30,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	30,0	70,0
BEP	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	14,3	42,9	42,9	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,5	87,5
BGW	0,0	0,0	60,0	40,0	0,0	20,0	70,0	10,0	0,0	10,0	40,0	50,0	0,0	10,0	50,0	40,0

AM (Alveolarmakrophage), AECI (Alveoläre Epithelzelle Typ I), AECII (Alveoläre Epithelzelle Typ II), BEP (Bronchialepithel), BGW (Bindegewebe)

Die Expressionsstärke nahm in der IPF ab; die Gesamtexpression jedoch war nicht statistisch signifikant. Als signifikant unterschiedlich stellten sich die Vergleiche von COPD-freier Lunge und Emphysem sowie von IPF und Emphysem heraus.

Der TGF β -Signalweg in AECII ist bei IPF aktiviert und beim Emphysem deaktiviert

Die AECII erwiesen sich als die Zellen, bei denen die meisten Unterschiede in der Expression des TGF β -Signalwegs zwischen den Krankheiten zu beobachten waren. In den COPD-freien Lungen war die Expression von TGF β eher gleichmäßig auf die Scores verteilt. Im Kontrast hierzu war kaum TGF β -Signal in den Emphysemen detektierbar, während die IPFs eine Überexpression aufwiesen. Der Unterschied in der Gesamtexpression zeigte sich als signifikant für den Vergleich Lunge und Emphysem sowie IPF und Emphysem. Ein ähnliches Muster war für BAMBI zu beobachten: Eine stetige, jedoch nicht ausgeprägt starke Expression in den COPD-

freien Lungen die nahezu zurück geht im Fall der Emphyseme und sich verstärkt ausprägt bei der IPF. Im Bezug auf die Gesamtpositivität für BAMBI war eine signifikant vermehrte Expression bei IPF und COPD-freier Lunge im Vergleich zum Emphysem festzustellen.

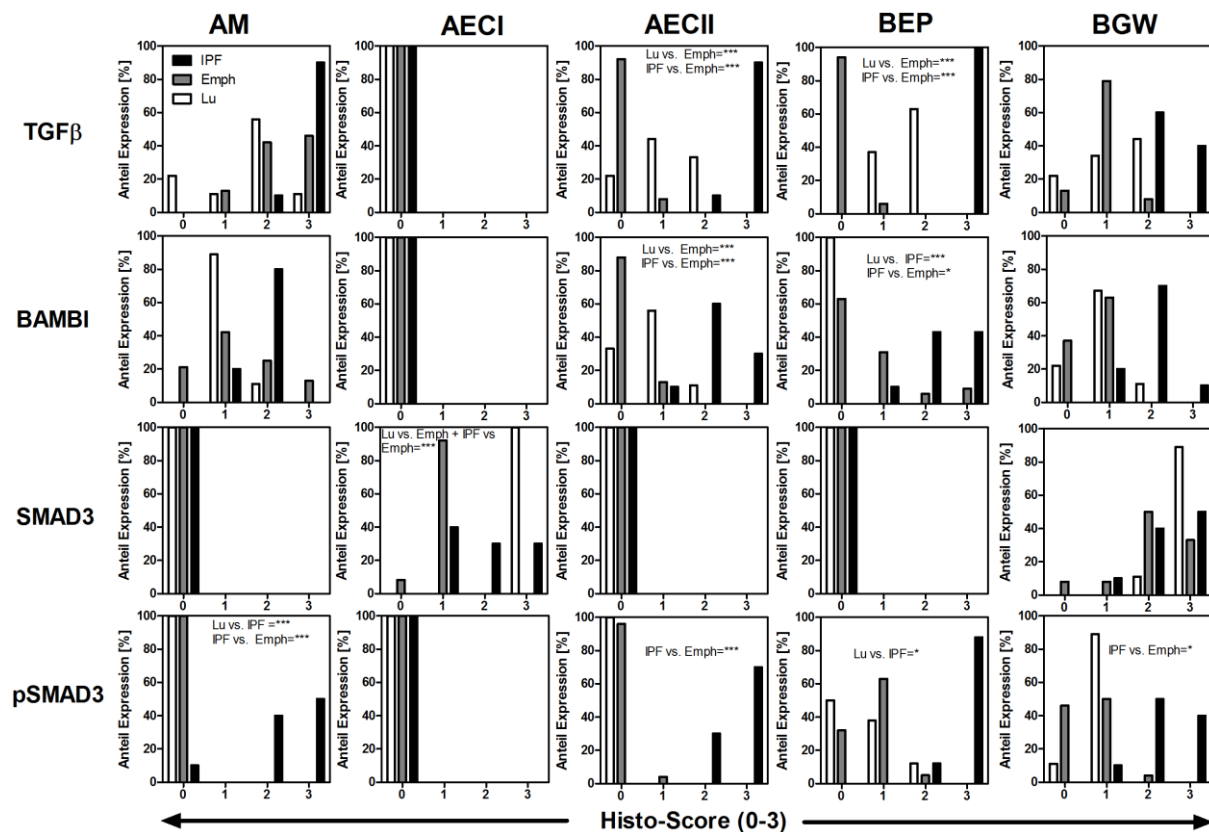


Abbildung 5: Verteilung der Expressionsmuster des TGF β -Signalwegs in Abhängigkeit von Zelltyp und Erkrankung. Die Expression von TGF β , BAMBI, SMAD3 und pSMAD3 wurde mittels Immunhistochemie in den Geweben von COPD-freier Lunge (Lu), Emphysem (Emph) und Idiopathischer Pulmonaler Fibrose (IPF) in Alveolarmakrophagen (AM), Alveolären Epithelzellen Typ I (AECI), Alveolären Epithelzellen Typ II (AECII), Bronchialepithelzellen (BEP) und Bindegewebszellen (BGW) untersucht. Hierbei wurde die Expression jedes Markers in den unterschiedlichen Zelltypen mit einem Score von 0-3 versehen: Keine beobachtete Expression im gesamten Schnittpräparat =0; schwache und fokale Expression =1; deutliche Expression von regelmäßiger Häufigkeit =2 und das Präparat dominierende Expression =3. Die Ergebnisse sind als Anteil der beobachteten positiven Fälle in % je Score und für jeden Zelltyp und Marker dargestellt. Um zu vergleichen ob die Expression der einzelnen Marker für jeden Zelltyp insgesamt sich qualitativ statistisch unterscheidet, wurden diese mit dem Exakten Fisher-Test (Anzahl positive und negativer Fälle der Marker je Krankheit) verglichen bei Annahme eines Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,005$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

In keinem der untersuchten Gewebe wurde eine Expression von SMAD3 in AECII beobachtet und seine phosphorylierte Form war eines der dominierenden Merkmale in den IPF-Präparaten. Der Großteil dieser Gewebe wies eine besonders starke Expression von pSMAD3 auf und zeigte sich insgesamt in seiner Expression als signifikant unterschiedlich zu Emphysem und COPD-freier Lunge. Die Verteilung der Marker im Bronchialepithel (BEP) der untersuchten Gewebe ergab eine stetige Expression von TGF β in den COPD-Lungen, die sich im Fall der Emphyseme signifikant reduzierte und im Gegensatz hierzu bei allen IPF-Patienten in starker

Ausprägung vorgefunden wurde. Auch hier erwies sich der Unterschied zwischen Emphysem und IPF als signifikant. BAMBI wurde in keiner der COPD-freien Lungen im Bronchialepithel exprimiert. Der Pseudorezeptor fand sich nur in geringem Maße in den Emphysemen exprimiert, dafür aber oft in den Fibrosen mit signifikanten Unterschieden zwischen COPD-freien Lungen und IPF sowie IPF und Emphysem. Phosphoryliertes SMAD3 kam im BEP aller Gewebe vor, war jedoch dominant in den IPF-Patienten mit einem signifikanten Unterschied zu den COPD-freien Lungen. In allen Gewebetypen fand sich eine ständige Expression aller Marker in den Fibroblasten des Bindegewebes. Ein signifikanter Unterschied wurde nur zwischen Emphysem und IPF hinsichtlich der Expression von pSMAD3 beobachtet, die in diesem Fall verstärkt auftrat.

3.1.2. Der Einfluss von BAMBI auf Fibrosierung

3.1.2.1. In-vivo-Experimente: Bleomycin-Modell der Lungenfibrose

Der Einfluss des TGF β -Pseudorezeptors BAMBI auf die Fibrosierung wurde im Bleomycin-Modell der Lungenfibrose untersucht (Moeller et al. 2008; Mouratis & Aidinis 2011). Hierfür wurde das Standardprotokoll mit einmaliger Gabe und 14 Tage Dauer zunächst vor Ort etabliert. 14 Tage *post* Applikation gilt in der Literatur als ein günstiger Zeitpunkt um die Fibrosierung zu untersuchen, da keine deutliche Zunahme der Kollagendeposition bis Tag 21 beobachtet wird und noch keine Rückbildung des Kollagens stattfindet (Izbicki et al. 2002).

3.1.2.2. Gewichtsveränderung

WT und BamBI^{-/-}-Mäuse zeigen keinen Unterschied im Gewichtsverlust

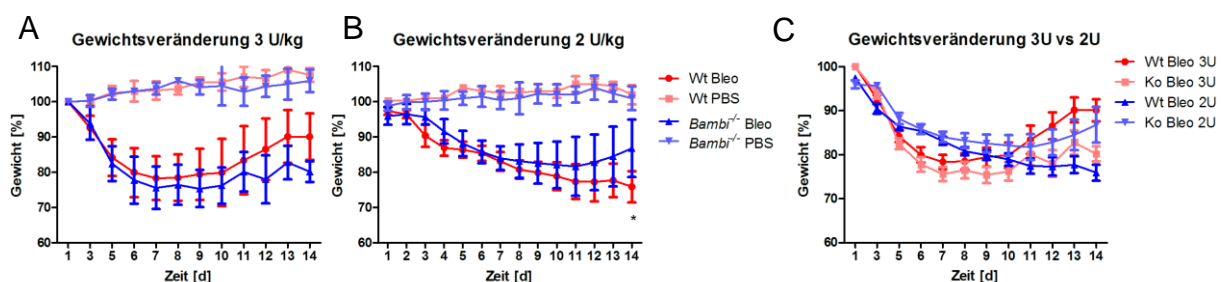


Abbildung 6: Kein signifikanter Unterschied in der Gewichtsabnahme der *BamBI^{-/-}*-Tiere verglichen mit *Wt*-Tieren im Verlauf des Bleomycin-Versuches. (A+B) Die Gewichtsveränderung über die Zeit wurde für beide Versuche von jedem Tier individuell jeden Tag erfasst und in % vom Ausgangsgewicht am Tag 0 berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tiere jeder Gruppe für jeden Tag des Versuches. (C) Vergleich der Gewichtsveränderung der Bleomycin-Protokolle mit 3 U/kg bzw. 2 U/kg Applikationsmenge für den jeweiligen Genotyp. Eine statistische Überprüfung wurde mittels Two-way ANOVA durchgeführt bei Annahme eines Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ (*). Die jeweilige Tieranzahl der Versuche ist dem Material & Methoden-Teil zu entnehmen.

Ein deutlicher Gewichtsverlust in beiden Bleomycingruppen trat bereits nach wenigen Tagen beim 3 U/kg Applikationsprotokoll Tagen auf (Abbildung 6). Die KO-Tiere schienen mehr Gewicht zu verlieren als die Wt-Tiere, die ab Tag 10 wieder eine Gewichtszunahme zeigten. Statistisch ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Bei Durchführung des 3 U/kg Applikationsprotokoll wurden viele Tiere vorzeitig mit einer schweren Fibrosierung aus dem Versuch genommen. Daher wurde in einem zweiten Versuch das Protokoll abgeändert. Es wurden ältere Tiere genommen und 30 % weniger Bleomycin verabreicht (2 U/kg). Bei der Wiederholung des Versuches mit insgesamt 24 Tieren zeigte sich eine weniger starke Gewichtsabnahme der KO-Tiere. Die Wt-Tiere verloren im Durchschnitt mehr Gewicht was aber nur für den letzten Versuchstag signifikant war. Im Vergleich der beiden Applikationsprotokolle miteinander wurde weder bei 3 U/kg noch bei 2 U/kg Bleomycin ein statistisch signifikanter Unterschied der Genotypen beobachtet.

3.1.2.3. Histologische Untersuchung

Die histomorphologische Aufarbeitung der entnommenen Lungen erfolgte durch HE- und MG-Färbung (Abbildung 7). In beiden PBS-Gruppen war die Struktur der Alveolarsepten stets fein und ohne nennenswertes inflammatorisches Infiltrat im Interstitium. Der Alveolarbereich war gekennzeichnet durch die dünne Verästelung der Septen und dem ausgeprägten Luftraum der Alveolen. Die Septen der PBS-Tiere zeigten keine Verdickungen des Bindegewebes, wie die zarte, grünliche Struktur in der MG-Färbung verdeutlicht. Innerhalb der PBS-Gruppen war kein Unterschied aufgrund des KOs von *Bambi* zu beobachten.

Das histomorphologische Bild der IPF von WT und $Bambi^{-/-}$ ist gleich

In den Bleomycin-Gruppen erfolgte eine deutliche Fibrosierung des Lungengewebes, wie anhand der Verdickungen der Septen zu erkennen ist. Inflammatorisches Infiltrat war nach 14 Tagen noch vereinzelt zu beobachten, der Großteil der Entzündungsreaktion jedoch schon abgeklungen. Anhand des grünlichen Signals für Kollagen in der MG-Färbung ist deutlich zu erkennen, dass die Verdickung der Alveolarsepten aus kollagenem Bindegewebe besteht und nicht aus ödematösem Flüssigkeitseinstrom. Ein weiteres histologisches Merkmal der Bleomycin-Gruppen war das Auftreten der sogenannten Bienenwabenstruktur in den fibrotischen Läsionen. Hierbei handelt es sich um eine fast komplette Obliteration des Alveolarraums durch ECM-Ablagerung mit nur noch vereinzelter Auftreten von

Lufträumen (Araya & Nishimura 2010; Fernandez & Eickelberg 2012). Auf histomorphologischer Ebene ist hier kein Unterschied in der Qualität der Fibrosierung zwischen *Wt* und *Bambi*^{-/-}-Tieren beobachtet worden.

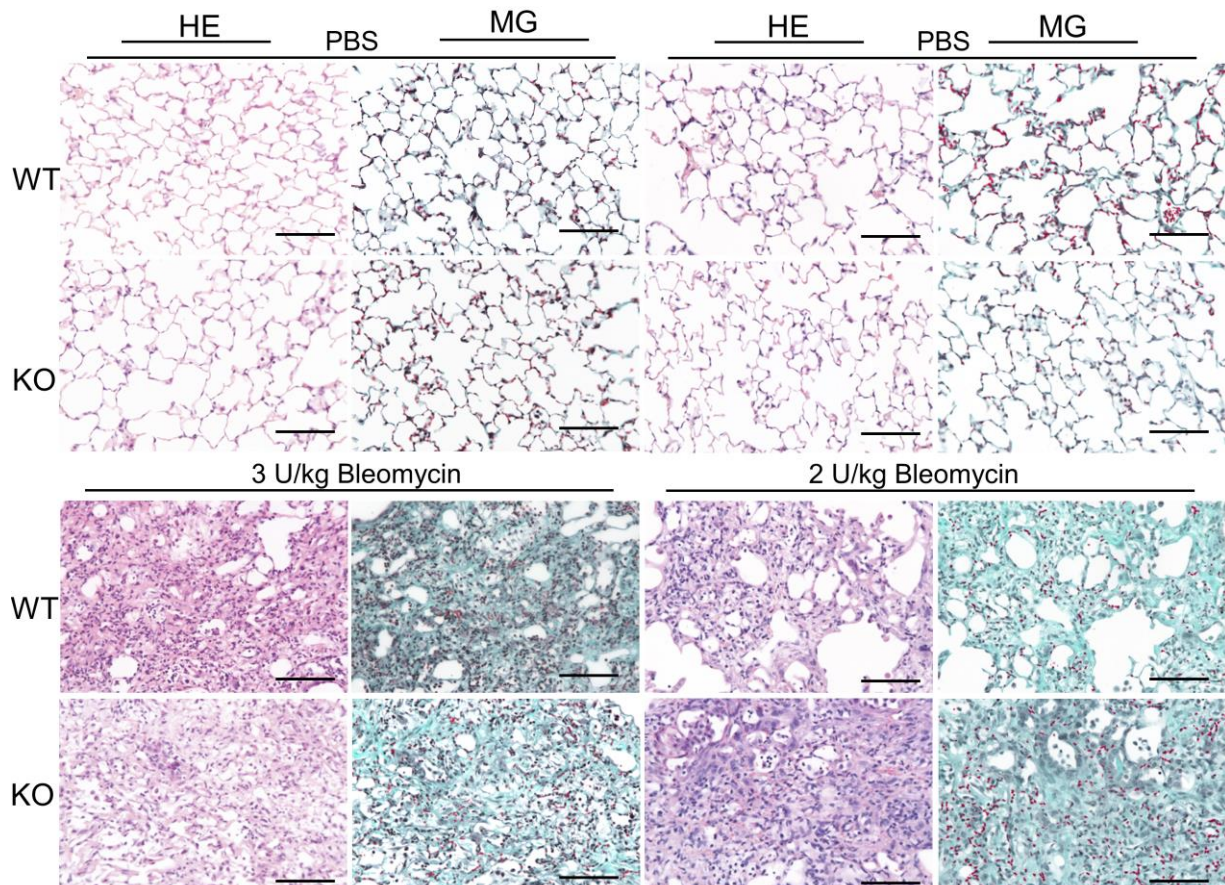


Abbildung 7: Der Knockout von *Bambi* zeigt keinen Unterschied im Bleomycin-Modell der Lungenfibrose auf histomorphologischer Ebene. Wildtyp (*Wt*) und *Bambi*^{-/-}-Mäusen (*KO*) wurde oropharyngeal zur Induktion von Lungenfibrose 3 U/kg oder 2 U/kg Bleomycin-Sulfat bzw. 50 µl PBS appliziert. 14 Tage nach Applikation wurde der Versuch beendet und den Tieren zwecks Aufarbeitung die Lungen entnommen. Zur histologischen Untersuchung der Fibrosierung wurden von den formalinfixierten, paraffineingebetteten Geweben Schnittpräparate angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) sowie der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung (MG) angefärbt. Kollagenes Bindegewebe wird im Falle der MG-Färbung in grün dargestellt. Alle Aufnahmen bei 400x Vergrößerung mit einem Maßstabsbalken von 100 µm Länge.

3.1.2.3. Überleben und Schwere der Fibrosierung

Die Entzündungsreaktion die durch Bleomycin-Gabe hervorgerufen wird, führte generell zu einer Verschlechterung des Gesundheitszustands der Versuchstiere. Wie bereits anhand des Gewichtsverlusts verdeutlicht wurde, zeigte sich nach ca. 5-7 Tagen die stärkste Gewichtsreduktion (Abbildung 6).

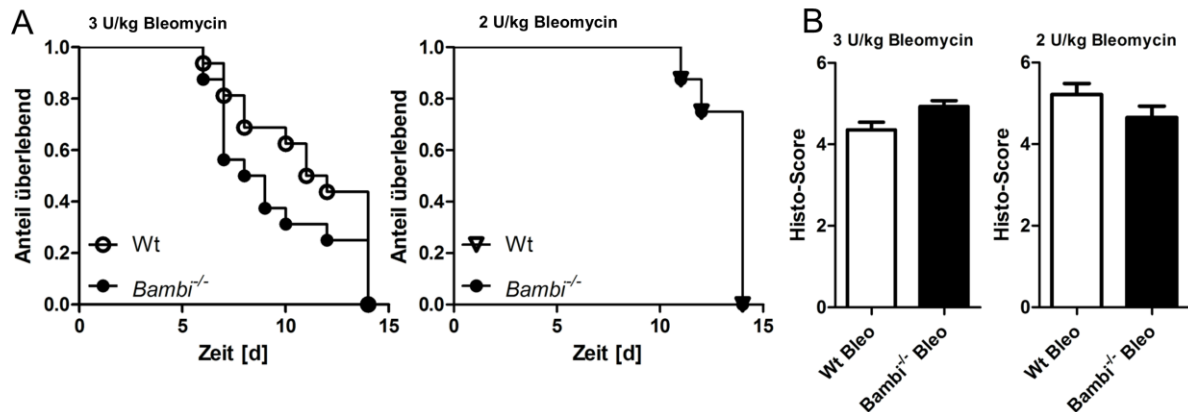


Abbildung 8: Einfluss der Bleomycin-Applikationsmenge auf die Mortalität sowie die Schwere der Fibrosierung. (A) Vergleich der Mortalität zwischen den Applikations-Protokollen für die Wt- und *Bambi*^{-/-}-Tiere als Kaplan-Meier-Kurven. Darstellung als Anteil (0 = 0%, 1.0 = 100%) der überlebenden Individuen einer Versuchsgruppe je Zeitpunkt. (B) Vergleich der Schwere der Fibrosierung in Abhängigkeit des Applikationsprotokolls sowie des Genotyps nach 14 Tagen Versuchsdauer. Dargestellt ist der Mittelwert der beobachteten Histo-Scores. Für die histologische Untersuchung des 3 U/kg Bleomycin-Versuchs konnten 7 Wt und 4 *Bambi*^{-/-} gemeinsam analysiert werden. Im 2 U/kg Versuch erreichten jeweils 6 Wt und *Bambi*^{-/-}-Tiere das Versuchsende.

*Höhere Mortalität der *Bambi*^{-/-}-Tiere im 3 U/kg Applikationsprotokoll*

Bei Verlust von mehr als $\geq 30\%$ vom Ausgangsgewicht wurden die Tiere aus dem Versuch genommen und euthanasiert. Es war eine größere Mortalität im 3 U/kg Applikationsprotokoll als im 2 U/kg Applikationsprotokoll zu beobachten, bei dem jeweils nur 2 von 8 Tieren vorzeitig den Versuch beendeten (Abbildung 8A). Im 3 U/kg Applikationsprotokoll verließen schon nach 5 Tagen erste Tiere den Versuch mit einer höheren Mortalität in der *Bambi*^{-/-}-Gruppe. Als statistisch signifikant stellte sich dieser Unterschied bei der geringen Gruppengröße jedoch nicht heraus. Die Schwere der Fibrosierung wurde anhand von randomisierten und verblindeten Schnittpräparaten mit Hilfe der modifizierten Ashcroft-Skala (Hübner et al. 2008) erfasst. In der Analyse wurde hierbei jeder Lungenlappen individuell untersucht und mit einem Score versehen. Der Gesamtscore jedes Tieres setzte sich aus dem Mittelwert der Einzelscores zusammen (Abbildung 8B). Zeigte sich in dem ersten Versuch noch eine Tendenz, dass die *Bambi*^{-/-}-Mäuse eine schwerere Fibrosierung aufwiesen, so war im zweiten Versuch diese eher umgekehrt. Generell war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Wt und KO in der Schwere der Erkrankung zu beobachten. Ebenso gab es keinen Unterschied zwischen den Applikationsprotokollen im Hinblick auf die Schwere der Fibrosierung.

3.1.2.4. Aufarbeitung der BAL

Die Aufarbeitung der Bronchoalveolären Lavage (BAL) zeigte in beiden Applikationsprotokollen einen Anstieg der Gesamtzellzahl in der BAL für die Bleomycin-Gruppen (Abbildung 9) im Vergleich zu den PBS-Gruppen.

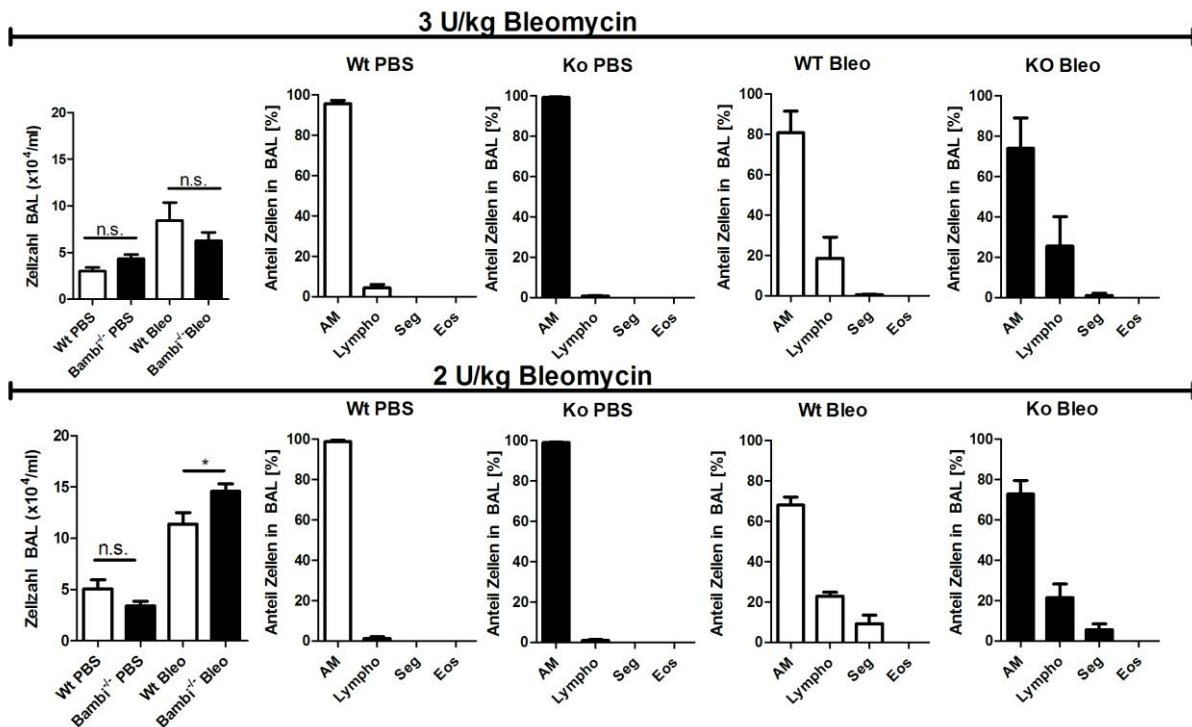


Abbildung 9: Der Knockout von *Bambi* zeigt keinen Unterschied in dem zellulären Anteil der BAL im Bleomycin-Modell der Lungenfibrose unabhängig von dem Applikationsprotokoll. Luftgetrocknete Cytozentrifugationspräparationen der BAL von den Versuchstieren wurden mittels Quick-Diff-Färbung zur differentiellen Zellzahlbestimmung angefärbt. Angegeben sind die Mittelwerte für die beobachteten Anteile der Alveolarmakrophagen (AM), Lymphozyten (Lympho), Segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (Seg) sowie der Eosinophilen Granulozyten (Eos) in Prozent. Eine statistische Auswertung erfolgte mit dem T-Test bei Annahme Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ (*).

Gleiche zelluläre Verteilung in der BAL bei WT und Bambi^{-/-}

Der Unterschied zwischen den Genotypen war im 3 U/kg Applikationsprotokoll nicht signifikant und nur zwischen den Bleomycin-Gruppen im 2 U/kg Applikationsprotokoll signifikant. Anhand der differentiellen Zellbestimmung war zu sehen, dass eine Verschiebung der Häufigkeiten durch Bleomycingabe stattfand. In den PBS-Tieren waren die meisten Zellen in der BAL Alveolarmakrophagen und nur ein geringer Anteil Lymphozyten oder Granulozyten. In den Bleomycin-Gruppen reduzierte sich der Anteil der AM zu Gunsten der Lymphozyten und Granulozyten die hier verstärkt aufgefunden wurden. Unabhängig vom Applikationsprotokoll wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Wt- und KO-Tieren beobachtet.

Vergleichbare Lungenvolumen und TGF β -Spiegel bei WT und *Bambi*^{-/-}

Das Lungenvolumen der Tiere wurde durch Volumenverdrängung unter Wasser bestimmt und auf das Endgewicht der jeweiligen Tiere normalisiert.

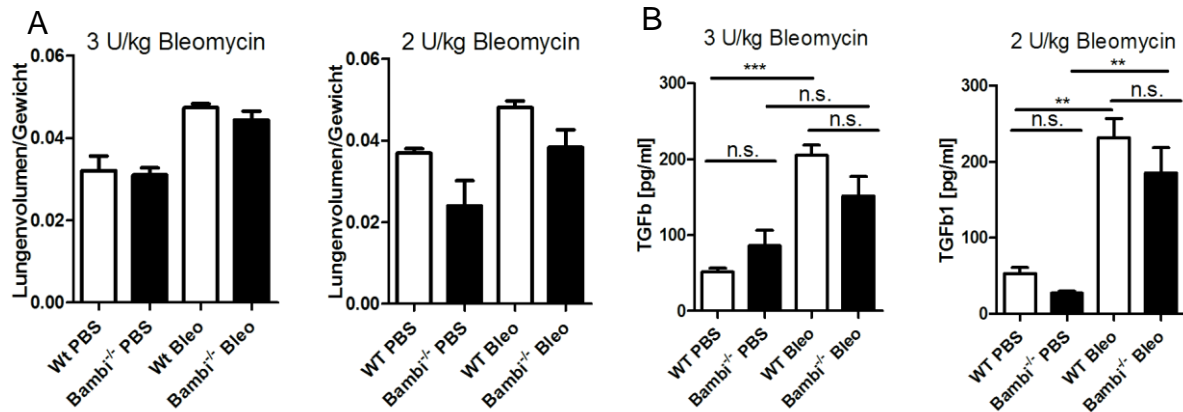


Abbildung 10: Der Knockout von *Bambi* bedingt keinen signifikanten Unterschied bei Lungenvolumen und TGF β 1 in der BALF unabhängig vom Applikationsprotokoll. (A) Die Volumenverdrängung der Lungen unter Wasser wurde auf das Endgewicht normalisiert und als Mittelwert der Tiere angegeben, die den Versuch zeitgleich beendeten. (B) Die TGF β -Konzentration in der Bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) wurde mittels ELISA quantifiziert und ist dargestellt als Mittelwert der Tiere eines gemeinsamen Versuchsendes (je N=6). Die statistische Überprüfung des Lungenvolumens erfolgte mittels T-Test und im Falle der ELISAs mittels One-way ANOVA und einem Bonferroni *post hoc* Test bei Annahme Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,005$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

Es zeigte sich bei allen Tieren der Bleomycin-Gruppen ein Anstieg des Volumens im Vergleich zu den PBS-Gruppen (Abbildung 10). Das Volumen zwischen den Applikationsprotokollen mit 3 oder 2 U/kg war vergleichbar und es gab keinen signifikanten Unterschied durch den Genotyp. Neben dem Lungenvolumen wurde weiterhin die Menge an TGF β in der BALF der Tiere bestimmt. Dies gilt als ein verlässlicher Marker für fibrotische Reaktionen in der Lunge (Khalil et al. 2001; Moeller et al. 2008). In den Bleomycin-Gruppen wurde in beiden Versuchen ein signifikanter Anstieg der TGF β -Konzentration in der BALF nachgewiesen, der sich jedoch nicht signifikant zwischen *Bambi*^{-/-} und Wt-Tieren unterschied.

3.1.2.5. Ex-vivo-Stimulation von Lungengeweben

Die Geneexpression von ECM-Molekülen wie Fibronectin 1 (FN1) und Kollagen 1A1 (COL1A1) spielt eine Rolle bei fibrotischen Prozessen (Strieter & Mehrad 2009; Câmara & Jarai 2010) und wird als Marker für deren Präsenz verwendet. Um die Induktion von profibrotischen Prozessen im Fokus des TGF β -Signalwegs zu betrachten, wurden mittels Ex-vivo-Kultur, Gewebe von Wt und KO-Tieren mit 5 ng/ml TGF β sowie mit 10 μ M des TGF β RI-Inhibitors SB431542 stimuliert. Der Effekt

auf die Transkription von *Col1A1* sowie von *Fn1* wurde durch qRT-PCR bestimmt (Abbildung 11).

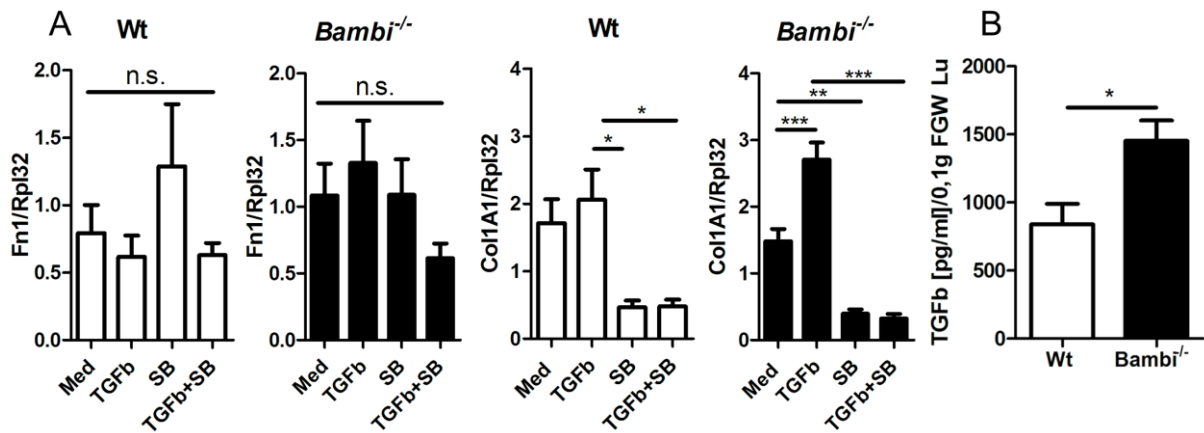


Abbildung 11: Die TGFβ1-induzierte Expression von Kollagen 1A1 ist signifikant erhöht in den Lungen von *Bambi*^{-/-}-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. (A) qRT-PCR-Analyse der Expression von Fibronectin 1 (*Fn1*) und Kollagen 1A1 (*Col1A1*) im Lungengewebe von *Bambi*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen nach 48 h Ex-vivo-Stimulation mit 5 ng/ml TGFβ1 sowie 10 μM SB431542. Aus den *ex vivo* stimulierten Lungengeweben wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR die Expression von *Fn1* und *Col1A1* untersucht. Die Expression der Zielgene wurde auf das Referenzgen *Rpl32* normalisiert. Für die Genexpressionsanalyse wurde jeweils die RNA von 8 KO und 7 Wt Tieren verwendet. (B) Die Quantifizierung von TGFβ im Ex-vivo-Kulturüberstand nach 48 h wurde mit ELISA bei 6 Wt und 10 KO Tieren durchgeführt. Die Menge an TGFβ wurde hierbei auf das Feuchtgewicht des eingesetzten Lungengewebes normalisiert. Die statistische Überprüfung erfolgte in (A) mittels One-way ANOVA und einem Bonferroni *post hoc* Test sowie in (B) mittels T-Test bei Annahme Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,005$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

Verstärkte Expression von Kollagen 1A1 durch TGFβ in *Bambi*^{-/-}-Mäusen

Die Expression von *Fn1* in den Lungen von Wt-Mäusen verändert sich nicht signifikant. Es ist jedoch eine Tendenz zu erkennen, die eher eine Reduktion der Expression andeutet (Abbildung 11A). Fibronectin 1 wird in *Bambi*^{-/-}-Mäusen gering induziert im Vergleich zur Mediumkontrolle, erwies sich aber als nicht signifikant. *Col1A1* zeigt keine signifikante Veränderung in der Genexpression durch TGFβ1 bei Wt-Mäusen, dafür aber eine signifikante Verringerung durch SB431542. Der deutlichste Effekt durch TGFβ1-Stimulation und Inhibition wurde bei den *Bambi*^{-/-}-Tieren beobachtet. Die Genexpression von *Col1A1* wird signifikant durch 5 ng/ml TGFβ reguliert. Dieser Effekt wird ebenso wieder durch Zugabe von SB431542 aufgehoben.

Da der TGFβ-Pseudorezeptor BAMBI in der Lage ist TGFβ zu binden (Onichtchouk et al. 1999) würde man erwarten, dass bei Fehlen des Rezeptors mehr ungebundenes TGFβ aufgefunden wird. Um diese Frage zu untersuchen, wurde Gewebekulturüberstand nach 48 h Ex-vivo-Inkubation auf die freie Menge an TGFβ mittels ELISA untersucht (Abbildung 11B). Im Vergleich von Wt und *Bambi*^{-/-}-Tieren

zeigt sich eine signifikant erhöhte Menge von TGF β im Kulturüberstand der KO-Tiere.

3.1.2. Versuch zur Etablierung einer stabil-transfizierten Zelllinie

Um den Einfluss der Überexpression von BAMBI im Hinblick auf den TGF β -Signalweg sowie Fibrosierung und EMT zu untersuchen, wurde versucht eine stabile Zelllinie zu etablieren. Hierfür wurden A549-Zellen mit *BAMBI*-Expressionsplasmiden (pCMV-*BAMBI*) sowie Kontroll-Plasmiden (pCMV-*GFP*) transient transfiziert.

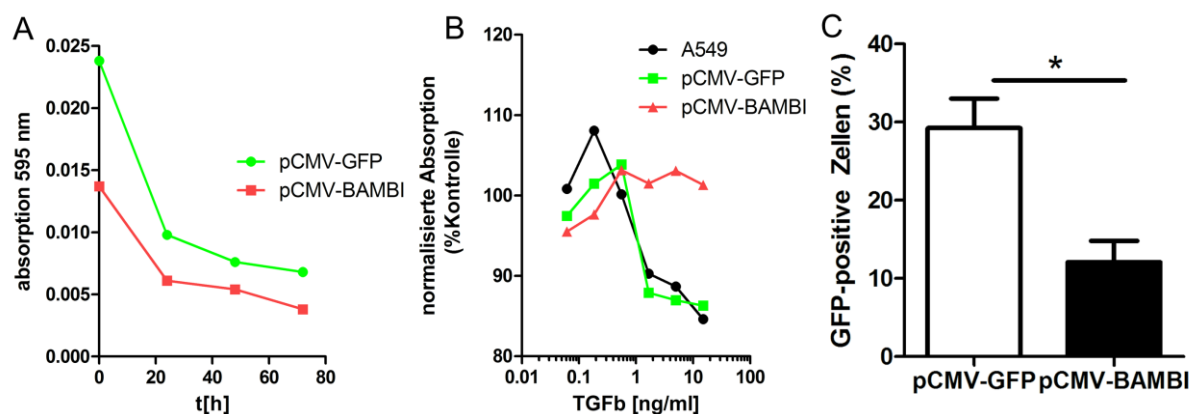


Abbildung 12: Die transiente Überexpression von BAMBI in A549-Zellen bedingt eine geringere Vitalität sowie eine Resistenz gegen den antiproliferativen Effekt von TGF β . (A) pCMV-*GFP* und pCMV-*BAMBI* transfizierte A549-Zellen wurden per FACS nach GFP-Expression sortiert und anschließend mittels MTT die Stoffwechselaktivität über 72 h bestimmt. (B) Transient transfizierte A549-Zellen (pCMV-*GFP* und pCMV-*Bam*bi) sowie nichttransfizierte A549-Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät und mit einer ansteigenden Konzentration von TGF β 1 für 48 h stimuliert. Mittels MTT-Assay wurde der Einfluss von TGF β 1 auf die Proliferation bzw. die Stoffwechselaktivität bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert von 2 biologischen Replikaten. (C) Transient transfizierte A549-Zellen wurden per FACS nach GFP-Expression sortiert und anschließend für 7 Tage unter 800 μ g/ml G418 expandiert. Nach 7 Tagen Expansion erfolgte eine Re-Analyse am FACS und Quantifizierung der verbliebenden GFP-positiven Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 biologischen Replikaten. Eine statistische Überprüfung in (C) erfolgte mit dem einseitigen T-Test bei Annahme eines Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ (*).

BAMBI inhibiert antiproliferativen Effekt von TGF β und beeinträchtigt die Vitalität

Die Vitalität bzw. Stoffwechselaktivität der transfizierten Zellen wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Hierbei stellte sich heraus, dass die BAMBI-exprimierenden Zellen eine geringere Vitalität aufweisen und diese über den Zeitraum der Kultur weiter abnimmt (Abbildung 12A). Bei Aussaat gleicher Zellzahlen nach Transfektion und anschließender Stimulation mit einer ansteigenden Konzentration von TGF β , zeigte sich das die *BAMBI*-transfizierte A549-Zellen resistenter gegen den antiproliferativen Effekt von TGF β waren. Dies zeigt der MTT-Assay durch einen geringeren Umsatz des Farbstoffes (Abb. 12B).

A549-Zellen verlieren BAMBI-Expressionsplasmide über die Kulturdauer

Zwischen den eingesetzten Plasmiden erwies sich die Transfektionseffizienz als heterogen und es hatte den Anschein, dass die pCMV-*BAMBI* transfizierten A549-Zellen die Expression von BAMBI weniger gut vertragen konnten als die pCMV-*GFP* Zellen. Es war nicht möglich, die BAMBI-transfizierten Zellen über längere Zeiträume erfolgreich in der Kultur zu expandieren. Eine per FACS sortierte, homogene Kultur der beiden Transfektionen wurde für 72 h auf ihre Stoffwechselaktivität mittels MTT-Assay untersucht. Es zeigte sich, dass bereits bei gleicher Zellzahl weniger MTT-Farbstoff von den BAMBI-Zellen umgewandelt wurde als in den pCMV-*GFP* Kontrollzellen (Abb. 12A). Es schien, dass pCMV-*BAMBI* transfizierte Zellen trotz G418-Gabe ihre Plasmide wieder verlieren. Um dieses zu überprüfen, wurden die Zellen nach Transfektion am FACS auf eine homogene Kultur sortiert und für 7 Tage bei 800 µg/ml G418 expandiert. Nach einer Woche Kultur erfolgte eine erneute Analyse am FACS unter gleichen Gerätebedingungen (Abbildung 12C). Während noch knapp 30% der GFP-transfizierten Zellen das Konstrukt aufwiesen, waren in der pCMV-*BAMBI* Kultur nur noch 12% der Zellen positiv. Es zeigte sich also eine signifikante Reduktion der Konstruktpositivität nach 7 Tagen Expansion.

3.1.3. Der Einfluß von TGFβ auf EMT und Fibrosierung in AECII

In 3.1.1. wurde beobachtet, dass AECII von IPF-Patienten eine signifikant verstärkte Expression von TGFβ und pSMAD3 im Vergleich zu AECII in Emphysemen aufweisen. Der Signalweg ist in diesen Zellen aktiviert, was Raum für Hypothesen hinsichtlich einer möglichen Transdifferenzierung dieser Zellen im Rahmen der IPF-Pathogenese bietet. Um zu untersuchen, ob humane AECII in der Lage sind in einer TGFβ-abhängigen Weise EMT zu vollziehen, sowie Kollagen zu produzieren, wurde vor Ort eine Primärzellkultur aus Patientengewebe etabliert. Die isolierten AECII wurden stimuliert und auf morphologischer, Protein- und Genexpressionsebene auf Anzeichen von EMT untersucht.

3.1.3.1. TGFβ-abhängige Umorganisation des Zytoskeletts

Eine der Eigenschaften von Zellen die EMT vollziehen ist ein *Remodelling* des Aktin-Zytoskeletts (Kim et al. 2007; Thiery et al. 2009; Mendez et al. 2010), bei dem sich die Polarisation der Zellen verändert.

Aktin-Zytoskelett-Remodelling als Indiz für EMT in AECII

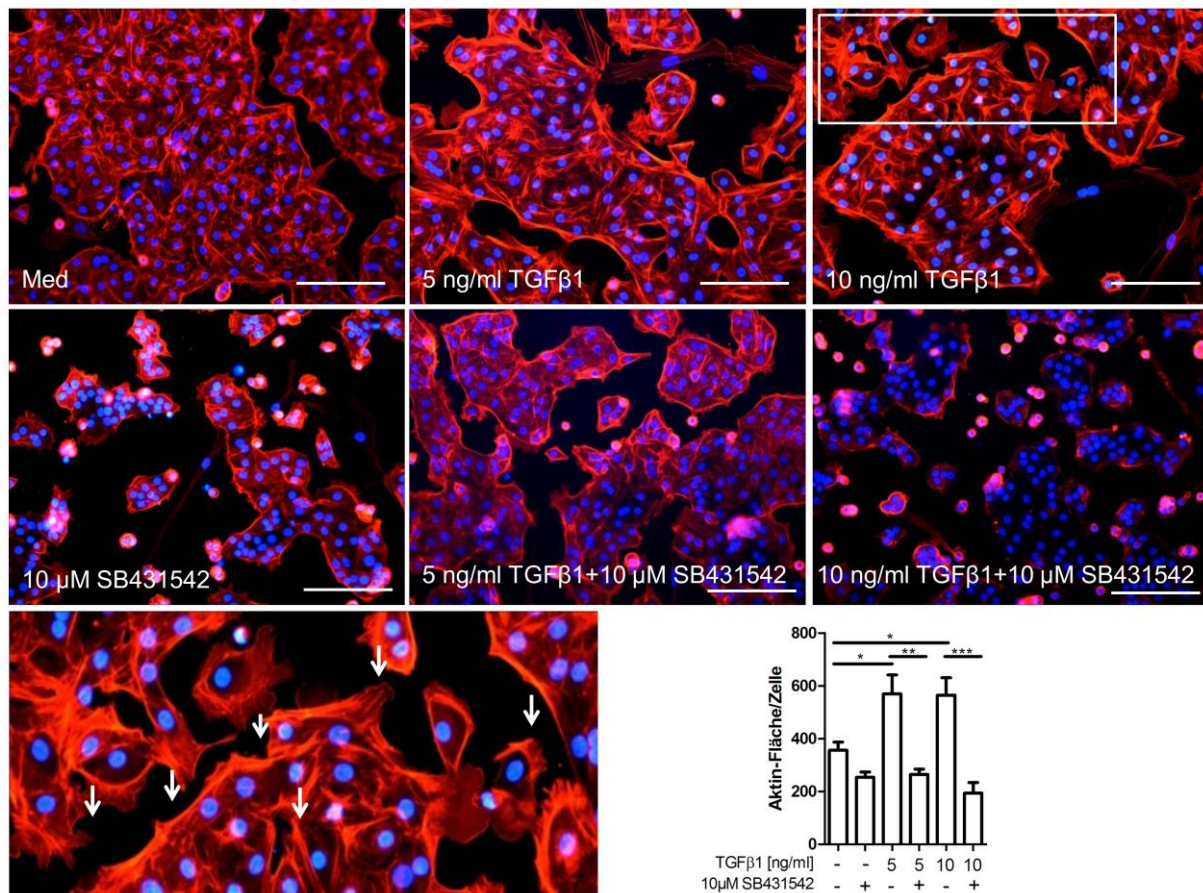


Abbildung 13: Der TGFβ-Signalweg moduliert das Aktin-Zytoskelett-Remodelling in humanen, primären AECII. Primäre, humane AECII wurden auf Deckgläsern ausgesät und für 48 h mit TGFβ1 (5 bzw. 10 ng/ml) stimuliert. Die Spezifität der Stimulation wurde durch Zugabe von 10 μM des TGFβRI-Inhibitors SB431542 überprüft. Die Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts wurde mittels Rhodamin-konjugierten Phalloidin visualisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und alle Bilder bei 200x Vergrößerung aufgenommen. Die Fläche des Aktins wurde mit ImageJ bestimmt und auf die Anzahl der Zellen anhand der Zellkerne normalisiert. Eine statistische Überprüfung wurde mit der One-way ANOVA und einem Bonferroni *post hoc* Test durchgeführt bei Annahme Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,005$ (**) und $p \leq 0,001$ (***). Dargestellt ist ein exemplarisches Bild von 5 biologischen Replikaten. Alle Aufnahmen bei 200x Vergrößerung mit Maßstabsbalken = 100 μm. Zellfortsätze sind mittels Pfeilen gekennzeichnet im vergrößerten Bildausschnitt von der 10 ng/ml TGFβ1-Stimulation.

Ein verstärktes Aktin-Zytoskelett-Remodelling wurde bereits als ein TGFβ-abhängiger Prozess in A549-Zellen gezeigt (Kim et al. 2007). Um den Einfluss von TGFβ im Kontext von EMT und Fibrosierung im alveolären Kompartiment zu untersuchen, wurden humane AECII auf Deckgläsern ausgesät und für 48 h mit TGFβ1 stimuliert. Die Spezifität der Stimulation wurde durch Zugabe des TGFβRI-Inhibitors SB431542 überprüft, der den Effekt durch TGFβ1 blockiert. Bereits ohne jegliche TGFβ1-Zugabe ist in der Mediumkontrolle ein starkes Aktin-Signal zu erkennen (Abbildung 13), welches sich mit dem TGFβRI-Inhibitor reduzieren lässt.

TGF β kontrolliert in humanen AECII das Zytoskelett-Remodelling

Nach 48 h Inkubation mit TGF β wiesen die Zellen ein verstärktes Aktin-Signal, die Ausbildung von Podozyten/Zellfortsätzen, sowie eine deutliche filamentäre Struktur des Zytoskeletts auf. Dieser Effekt wird durch SB431542 nahezu komplett verhindert: Das zytoplasmatische, filamentäre Färbemuster wird fast vollständig nivelliert. Wenn man mittels Bildanalytik die Fläche des Aktins, bzw. in diesem Fall, das rote Signal vom Rhodamin quantifiziert und auf die Zellzahl normalisiert, erhält man einen Quotienten des Aktin-Signals je Zelle (siehe Abb.13 unten). Bei einem statistischen Vergleich von 5 biologischen Replikaten, d.h. von 5 unabhängigen Experimenten mit den Zellen individueller Patienten, der Stimulationen mittels ANOVA zeigt sich eine signifikante Induktion des Aktin-Zytoskeletts durch 5 und 10 ng/ml TGF β 1. Dieser Effekt wird zusätzlich noch signifikant durch den TGF β RI-Inhibitor SB431542 reduziert.

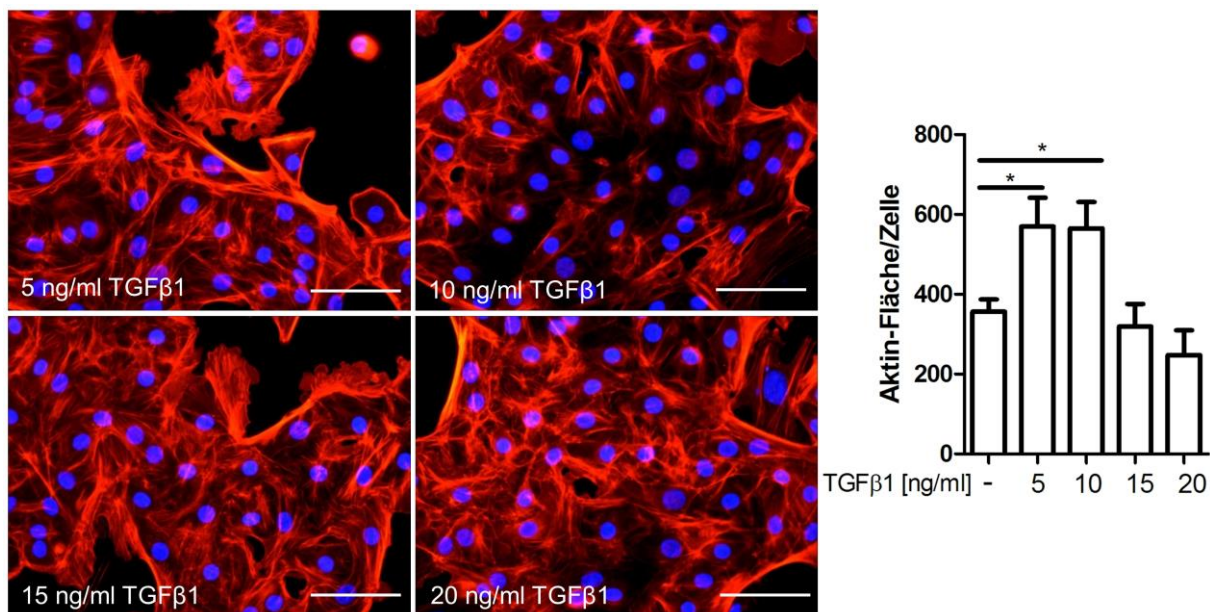


Abbildung 14: Einfluss ansteigender Konzentration von TGF β auf das Zytoskelett-Remodelling von AECII. Primäre, humane AECII wurden auf Deckgläsern ausgesät und für 48 h mit TGF β 1 (5-20 ng/ml) stimuliert. Die Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts wurde mittels Rhodamin-konjugierten Phalloidin visualisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und alle Bilder bei 200x Vergrößerung aufgenommen. Die Fläche des Aktins wurde mit ImageJ bestimmt und auf die Anzahl der Zellen anhand der Zellkerne normalisiert. Eine statistische Überprüfung von 3 biologischen Replikaten wurde mit der One-way ANOVA und einem Bonferroni *post hoc* Test durchgeführt bei Annahme eines Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ (*). Alle Aufnahmen bei 200x Vergrößerung mit Maßstabsbalken = 100 μ m.

Um den Einfluss ansteigender Konzentrationen auf das Zytoskelett-Remodelling zu untersuchen, wurden AECII mit 5-20 ng/ml TGF β für 48 h stimuliert (Abbildung 14). Die Aktin-Färbung mittels Rhodamin-konjugierten Phalloidins zeigte ein vergleichbares Bild über die TGF β -Konzentrationen hinweg. Es war eine deutliche,

filamentäre Struktur des Aktins ebenso zu beobachten wie auch die Ausbildung von Fokalen Adhäsionen sowie von Zellfortsätzen. Eine bildanalytische Auswertung des Aktin-Signals pro Zelle zeigte eine signifikante Steigerung für 5 und 10 ng/ml TGF β 1, nicht jedoch für 15 und 20 ng/ml.

3.1.3.2. TGF β -abhängige Expression von epithelialen und mesenchymalen Markern in AECII

Neben dem Remodelling des Aktin-Zytoskeletts ist der Verlust von epithelialen Markern ein weiteres Merkmal der EMT ebenso wie die vermehrte Expression von mesenchymalen Markern (Kalluri & Weinberg 2009). Es gibt Vermutungen, das EMT bei der Fibrosierung in der Lunge eine entscheidende Rolle spielt (Wynn 2008), da epitheliale Zellen mit mesenchymalen Markern in fibrotischen Läsionen beobachtet wurden (Lomas et al. 2012). Bisher konnte ein Zusammenhang von TGF β -induzierter EMT nur in immortalisierten Zelllinien wie A549 Zellen gezeigt werden (Kasai et al. 2005; Kim et al. 2007). Um im humanen System mit primären AECII den Einfluss von TGF β 1 auf die Differenzierung der Zellen zu untersuchen, wurden diese für 48 h mit dem Wachstumsfaktor stimuliert und die Spezifität mit dem TGF β RI-Inhibitor SB431542 überprüft.

Humane AECII exprimieren EMT-Marker in einer TGF β -abhängigen Weise

Bereits ohne jegliche Stimulation zeigte sich eine gemischte Population von Zellen, die sowohl den epithelialen Marker E-Cadherin exprimierten, als auch das mesenchymale Intermediärfilament Vimentin. Zusätzlich hierzu sieht man einzelne AECII-Zellen, die positiv für Kollagen I sind (Abbildung 15). Durch Zugabe von 10 ng/ml TGF β 1 zeigt sich keine große Abnahme von E-Cadherin, dafür aber eine drastische Verstärkung von Vimentin und der kollagenproduzierenden Zellen. Durch Co-Stimulation der AECII mit 10 ng/ml TGF β 1 und 10 μ M SB431542 erkennt man keine besondere Veränderung des E-Cadherin-Signals. Dafür geht die Expression von Vimentin zurück und es gibt keine Kollagen I-produzierenden Zellen mehr.

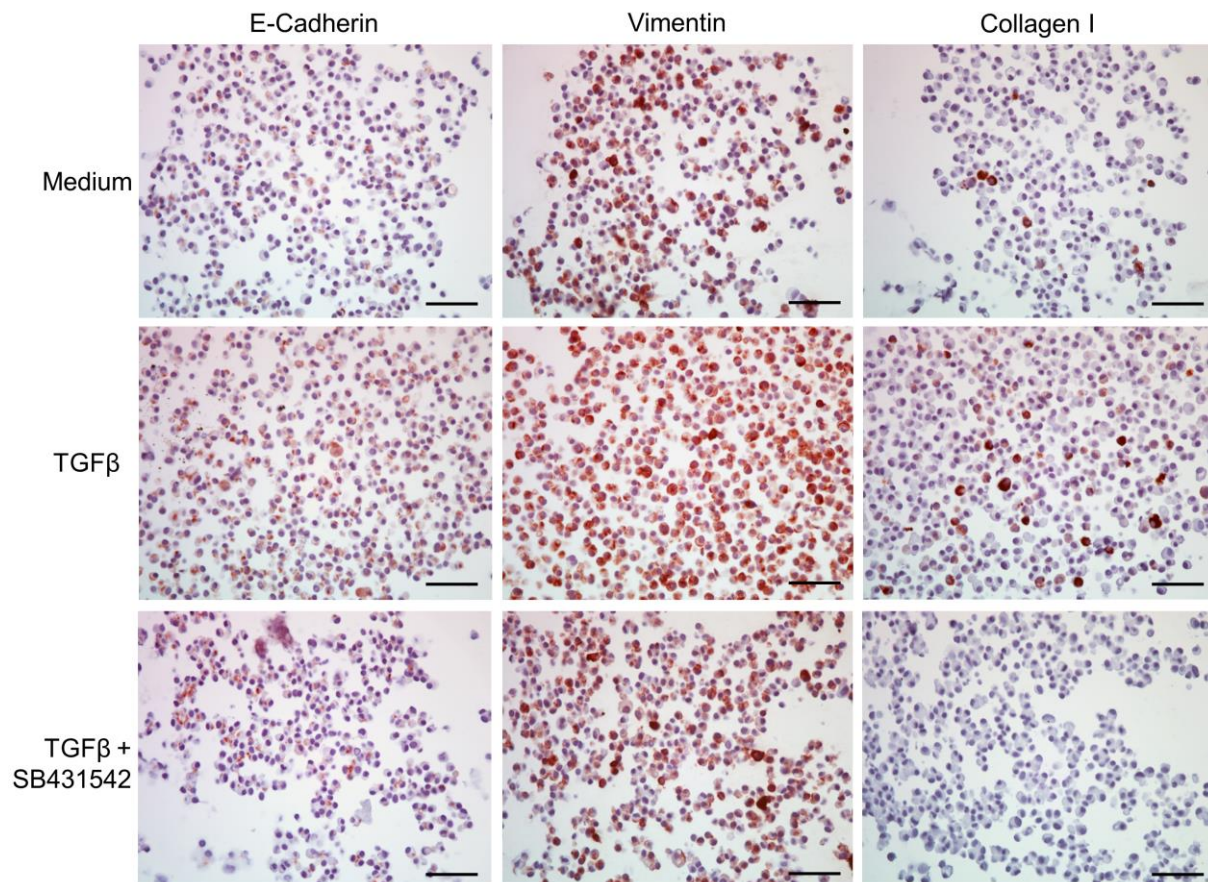


Abbildung 15: Der TGF β -Signalweg kontrolliert die Expression epithelialer und mesenchymaler Marker von primären humanen Alveolären Epithelzellen Typ II. Primäre AECII wurden mit 10 ng/ml TGF β 1 sowie mit 10 μ M des TGFBR1-Inhibitors SB431542 für 48 h stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen von den Kulturgefäßen abgelöst, mit HOPE-fixiert und paraffineingebettet. Die Detektion von E-Cadherin, Vimentin und Kollagen I erfolgte immunzytochemisch. Alle Aufnahmen bei 400x und Maßstabsbalken = 100 μ m. Die exemplarische Abbildung zeigt Ergebnisse von 2 biologischen Replikaten.

TGF β induziert die Kollagensynthese auf RNA-Ebene in humanen AECII

Zur Validierung der immunzytochemischen Ergebnisse wurde RNA von stimulierten und unstimulierten AECII isoliert und in cDNA revers transkribiert. Die Expression von Kollagen 1A1 in Abhängigkeit von der Stimulation ist in Abbildung 16 ersichtlich. TGF β ist in der Lage die Genexpression von Kollagen 1A1 zu induzieren wie anhand des *Fold Change* zu sehen ist. Ebenso ist diese Induktion durch Zugabe von SB431542 reversibel und die Genexpression wird deutlich reduziert.

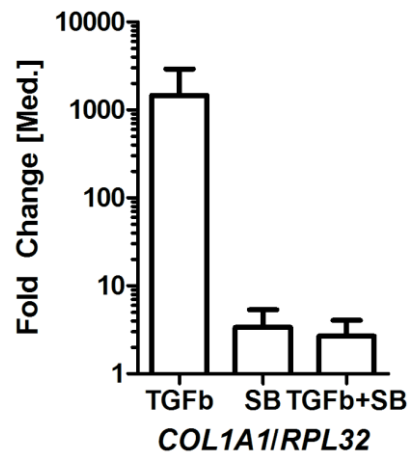


Abbildung 16: Die Kollagen 1A1-Expression von humanen AECII ist TGF β abhängig. Primäre AECII wurden für 48 h mit 5 ng/ml TGF β 1 sowie 10 μ M SB431542 stimuliert. Die Expression von Kollagen 1A1 (*COL1A1*) wurde mittels qRT-PCR analysiert, die Reaktionseffizienz auf Basis des Referenzgens *RPL32* normalisiert und die Ergebnisse als *Fold Change* im Vergleich zur Mediumkontrolle dargestellt (N= 4-5).

TGF β induziert die Kollagensynthese auf Proteinebene in humanen AECII

Eine simultane Visualisierung von AECII-spezifischen Markern und mesenchymalen Markern ist mittels Immunzytochemie nur begrenzt möglich. Dies ist jedoch notwendig um zu beweisen, dass AECII in der Lage sind Kollagen zu synthetisieren. Um dieses zu untersuchen, wurden AECII auf Deckgläsern ausgesät, mit TGF β 1 sowie SB431542 stimuliert und anschließend mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Zum Beweis der AECII-Spezifität wurde TTF-1, der Transkriptionsfaktor der Surfactant-Moleküle (Kolla et al. 2007; Boggaram 2009), mit TRITC-konjugierten Sekundär-Antikörpern detektiert. Zum Nachweis der Induktion der Kollagendeposition und -Synthese wurde HSP47 als Marker gewählt. Es wurde bereits gezeigt, dass HSP47 ein Kollagenchaperon ist (Yagi-Utsumi et al. 2012), mit den Kollagenhelizes interagiert (Ono et al. 2012b), an der ECM-Ablagerung direkt beteiligt ist (Xiao et al. 2012) sowie erhöht im Serum von Patienten mit exazerbierender IPF vorkommt (Kakugawa et al. 2013).

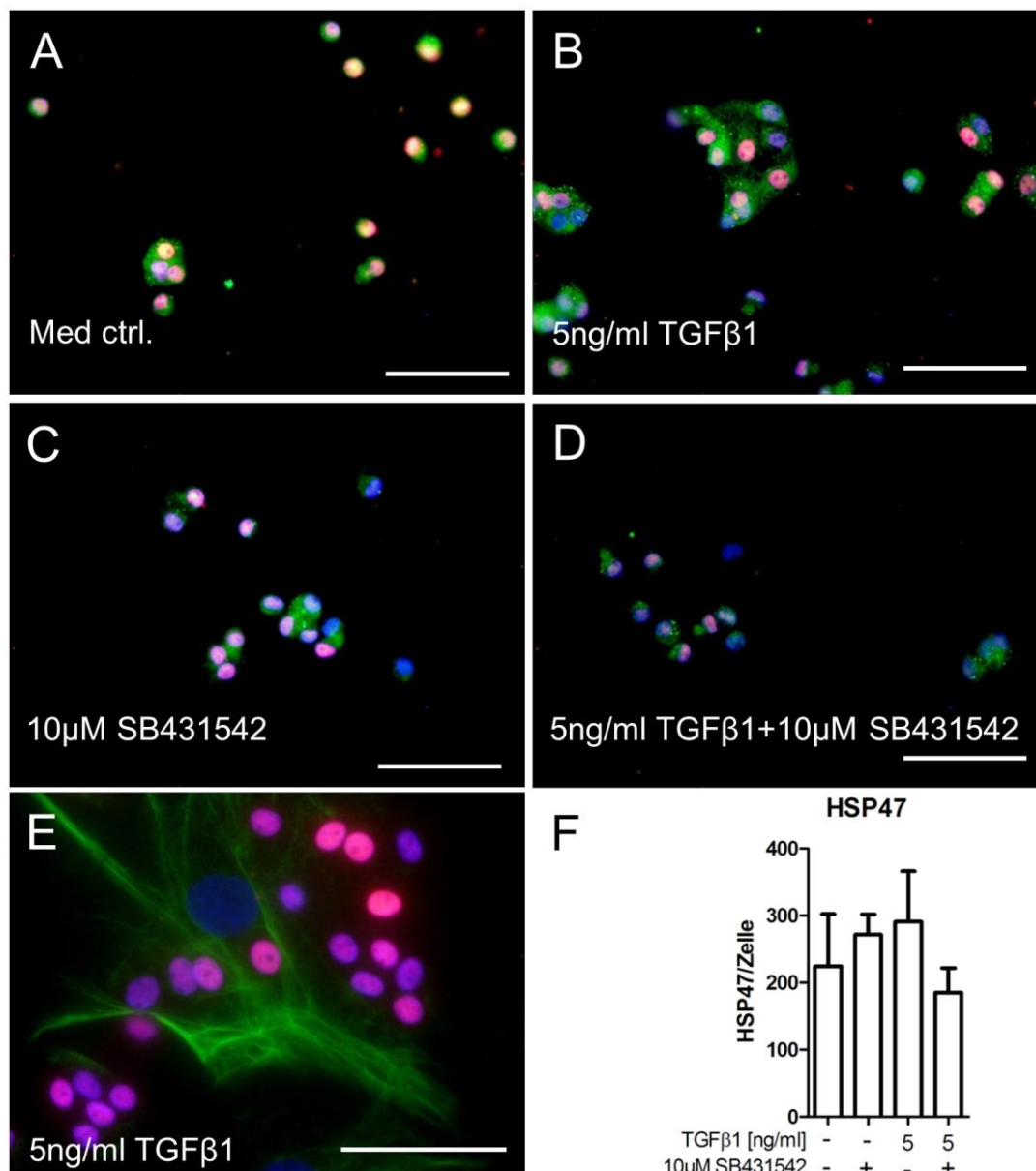


Abbildung 17: TGFβ1 beeinflusst die Kollagensynthese und Vimentinexpression in primären AECII. Auf Deckgläsern ausgesäte AECII wurden für 48 h mit 5 ng/ml TGFβ1 sowie 10 μM SB431542 stimuliert. Dargestellt sind Immunfluoreszenzfärbungen von HSP47 als Kollagenchaperon sowie TTF-1 als AECII-Marker (A-D) und von Vimentin als Intermediärfilament (E). Die Detektion von HSP47 und Vimentin erfolgte mit Alexa488-konjugierten Sekundärantikörpern sowie mit TRITC-konjugierten Sekundärantikörpern im Fall von TTF-1. Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt. Die Expression von HSP47 wurde mit ImageJ gemessen und auf die Anzahl der vorhandenen Zellen normalisiert (F). Eine statistische Überprüfung wurde mit der One-way ANOVA und einem Bonferroni *post hoc* Test durchgeführt bei Annahme eines Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$. Die Abbildung zeigt exemplarische Bilder von 3 biologischen Replikaten. (A-D) bei 400x und (E) bei 630x Vergrößerung mit einem Maßstabsbalken = 50 μm.

In nichtstimulierten alveolären Epithelzellen zeigt sich bereits eine basale Expression von HSP47 (Abbildung 17A) bei gleichzeitiger Positivität für TTF-1, wie man anhand des gelben Signals im Zellkern erkennen kann. Somit kann man davon ausgehen, dass es sich um AECII handelt bzw. die isolierten Primärzellen noch diese Eigenschaften besitzen. Darüber hinaus lässt sich die Expression von HSP47 durch Zugabe von TGFβ1 verstärken (Abbildung 17B) und diese Induktion wieder durch

SB431542 (Abbildung 17D) nivellieren. Zusätzlich zu der Induktion von HSP47 ist in TGF β 1-stimulierten AECII eine deutliche Expression des Intermediärfilaments Vimentin zu beobachten (Abbildung 17E). Eine bildanalytische Auswertung des HSP47-Signals je Zelle kam zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Stimulationen bei 3 biologischen Replikaten.

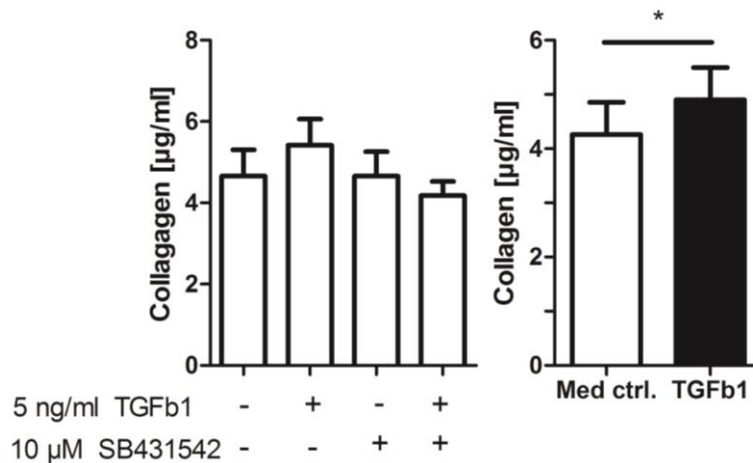


Abbildung 18: Induktion der Kollagensynthese durch TGF β 1. Um die *de novo* Synthese von Kollagen auf Proteinebene zu erfassen wurden je 1×10^6 Well in einer 24-Well-Platte ausgesät und mit TGF β 1 sowie SB431542 für 48 h stimuliert. Die Detektion des Kollagens erfolgte mittels Sirius Red/Fast Green Färbung und anschließender Quantifizierung im UV-Spektrophotometer. Dargestellt ist die statistische Auswertung mittels One-way ANOVA und einem Bonferroni *post hoc* Test für alle Parameter (N=7) sowie nur für die Parameter Medium und 5 ng/ml TGF β 1 als T-Test für gepaarte Beobachtungen (N=10). Das Signifikanzniveau betrug bei den Auswertungen $p \leq 0,05$.

Die Analyse der De-novo-Synthese und -Sekretion von Kollagenen wurde mit den Farbstoffen Sirius Red und Fast Green FCF durchgeführt. Sirius Red ist ein Farbstoff der stark an Kollagen I und III, schwach an Kollagen IV und Laminin, nicht aber andere ECM-Bestandteile wie Fibronectin, Chondroitinsulfat oder Dermatansulfat bindet (Tullberg-Reinert & Jundt 1999). Zur Differenzierung nichtkollagener Proteine wurde Fast Green verwendet (Jimenez et al. 1985) und entsprechend der von Tullberg-Reinert und Jundt publizierten Gleichung eingesetzt. Im Fall der AECII ist allgemein zu erkennen, dass bereits in den unstimulierten Zellen eine Kollagensynthese stattfindet (Abbildung 18). Dieser Effekt lässt sich leicht durch Zugabe von TGF β 1 steigern und durch Addition von SB431542 hemmen. Eine statistische Auswertung durch ANOVA zeigte keine signifikanten Unterschiede. Aufgrund von Limitierungen bei der Isolation von AECII war es nicht immer möglich in allen Versuchen jeden Parameter zu erheben und eine ANOVA für gepaarte Beobachtungen durchzuführen. Betrachtet man nur die Parameter bei denen aus allen Versuchen Daten erhoben werden konnten, so zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Kollagensynthese durch 5 ng/ml TGF β 1 nach 48 h Kultur.

3.1.3.3. Der Einfluss von TGF β auf die Genexpression von AECII: EMT und Fibrosierung

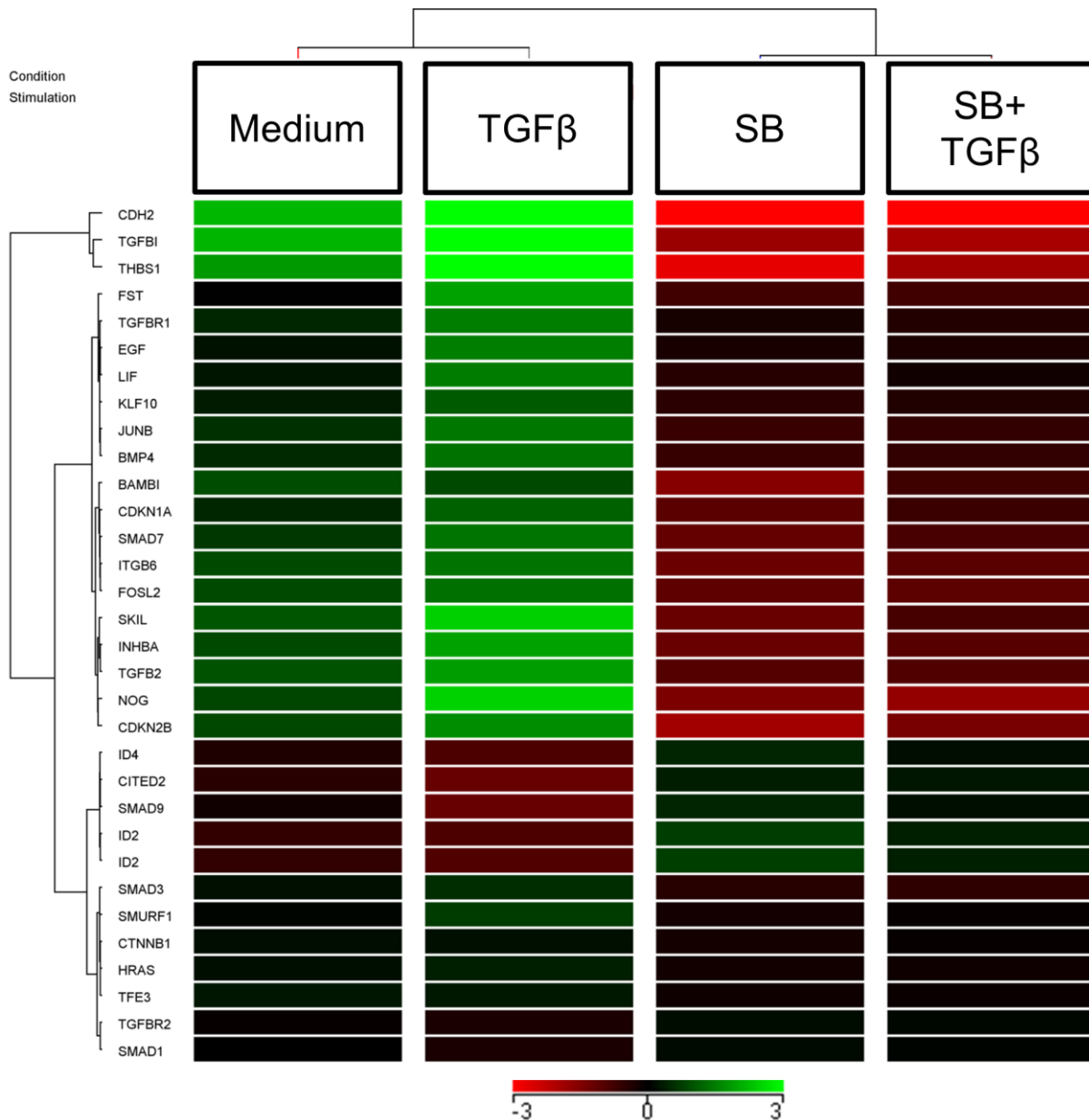


Abbildung 19: Signifikant differenziell regulierte Gene des TGF β -Signalwegs in AECII durch TGF β und SB431542 Stimulation nach 48 h. Primäre AECII wurden mit 5 ng/ml TGF β sowie 10 μ M SB431542 stimuliert und die RNA der Zellen isoliert um eine transkriptomweite Genexpressionsanalyse mittels Microarrays durchzuführen. Eine a priori erstellte Gen-Liste von TGF β -Signalwegsmediatoren und -Genen wurde auf signifikant differenzielle Regulation mittels ANOVA und einem Benjamini-Hochberg *post hoc* Test (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$) analysiert. Die Ergebnisse der ANOVA wurden hierarchisch geclustert und als *Heat-Map* mit der gemittelten relativen Expression von -3 bis 3 aus 3 unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt.

Der TGF β -Signalweg spielt eine zentrale Rolle im Kontext von Fibrosierung und Wundheilungsreaktionen (Crosby & Waters 2010). Um zu untersuchen, wie sich der Signalweg in AECII bei Stimulation durch TGF β verhält, wurden transkriptomweite Genexpressionsanalysen mittels Microarrays durchgeführt. 24 Gene wurden

signifikant durch TGF β auf- und 8 Gene signifikant herunterreguliert (Abbildung 19). Unter den am stärksten aufregulierten Genen fanden sich *CDH2N*-Cadherin, *TGFBI*, *THBS1*, *FST1*, *TGFBRI*, *SKIL*, *INHBA*, *NOG* und *TGFB2*. Signifikant herunterreguliert wurden *TGFBR2*, *SMAD1*, *ID2*, *ID4* sowie *CITED2* und *SMAD9*.

TGF β bewirkt eine Häufung von Differenzierungs- und ECM-GO-Terms in AECII

Nachdem gezeigt wurde, dass der TGF β -Signalweg differenziell bei AECII durch TGF β reguliert wird, wurden die funktionellen Konsequenzen auf genregulatorischer Ebene untersucht. Hierfür wurde eine *Gene Ontology* (GO)-Analyse durchgeführt. Bei dieser Form der bioinformatischen Auswertung wird üblicherweise eine Liste signifikant regulierter Gene auf die Zuordnung bestimmter *GO-Terms* untersucht. Hierbei ist jedes Gen gleichwertig in den Kategorien „*Molecular Function*“, „*Biological Process*“ und „*Cellular Component*“ enthalten. Diesen Kategorien sind sich hierarchisch weiter spezifizierende Begriffe zugeordnet, zu denen Gene annotiert werden (Ashburner et al. 2000) In diesem Fall wurden für die GO-Analyse eine Liste von Genen verwendet, die signifikant durch TGF β mit einem *Fold Change* $\geq +2$ reguliert wurden.

In Appendix VI sind die *GO-Terms* aufgeführt, die signifikant gehäuft durch TGF β -Stimulation vorgefunden wurden. Begriffe die entweder dem Kontext ECM/Fibrosierung sowie Differenzierung bzw. Adhäsion/Zytoskelett zugeordnet werden können, sind entsprechend farblich gekennzeichnet. 211 *Terms* wurden als signifikant vorkommend in den durch TGF β aufregulierten Genen entdeckt. 30,5 % (77/211) fallen in die Kategorie „Differenzierung“, 9% (19/211) können Adhäsion/Zytoskelett zugeordnet werden sowie 5,2% (11/211) der Kategorie ECM/Fibrosierung. Unter den signifikant gehäuft vorkommenden Begriffen finden sich unter anderem: „*actin cytoskeleton*“, „*basement membrane*“, „*cell adhesion*“, „*cell differentiation*“, „*cell morphogenesis involved in differentiation*“, „*connective tissue development*“, „*embryo development*“, „*epithelium development*“, „*extracellular matrix*“, „*wound healing*“ oder „*lung development*“.

TGF β kontrolliert die Expression von EMT-Markern in humanen AECII

Im Gegensatz zur GO-Analyse, die eine ungerichtete Auswertung darstellt, wurde im Weiteren der Einfluss der Stimulation von AECII mit TGF β auf eine *a priori* erstellte Liste von ECM/EMT-relevanten Genen analysiert. Mit diesem gerichteten Ansatz

sollte überprüft werden, ob die Stimulation von AECII mit TGF β EMT auslösen oder zu einem profibrotischen Prozess führen kann. Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der ANOVA als eine hierarchisch-geclusterte *Heat-Map* mit der relativen, gemittelten Expression von 3 biologischen Replikaten.

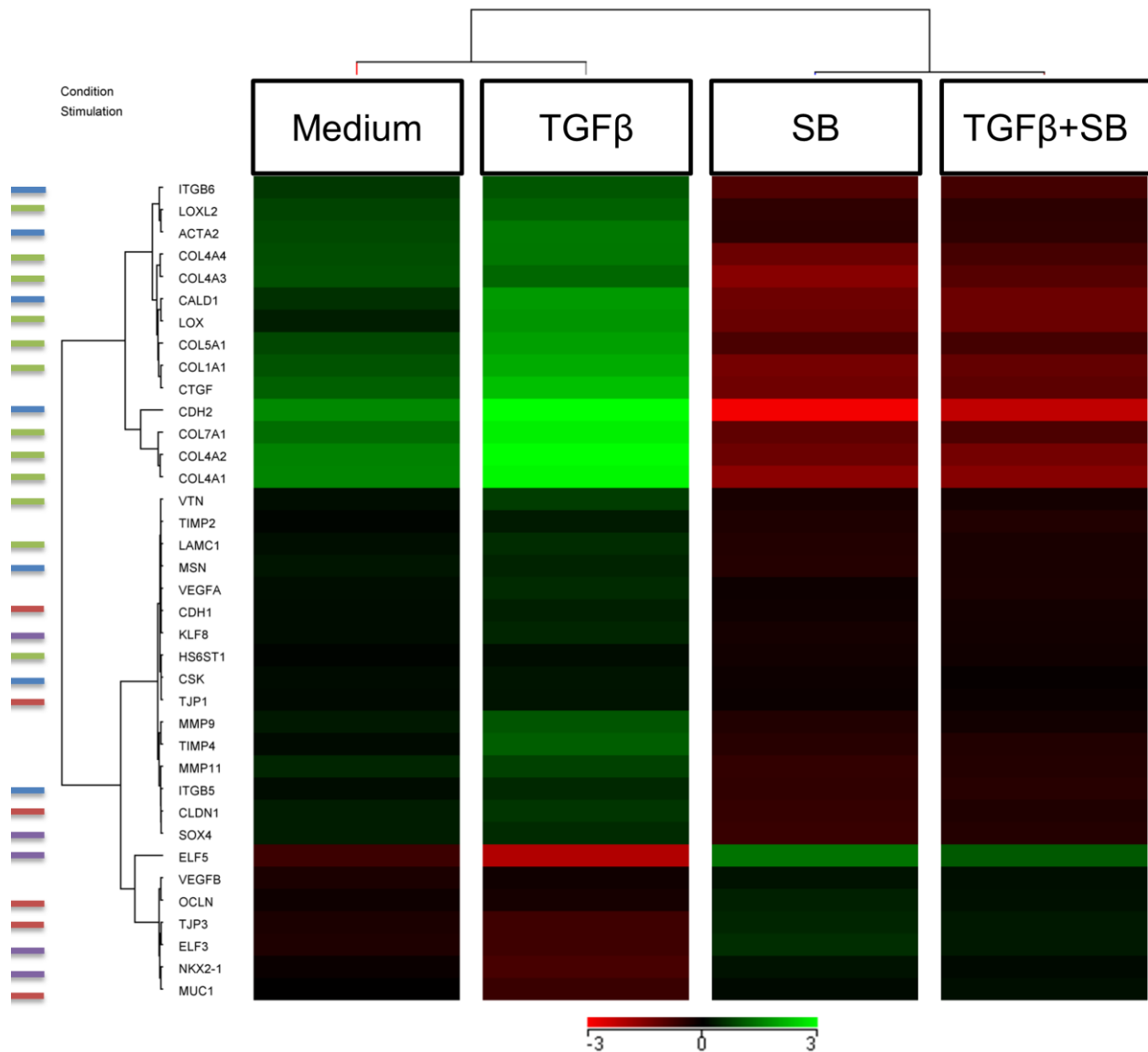


Abbildung 20: Der TGF β -Signalweg reguliert epitheliale und mesenchmale Marker sowie Kollagene in AECII. Primäre AECII wurden mit 5 ng/ml TGF β sowie 10 μ M SB431542 stimuliert und die RNA der Zellen isoliert um eine transkriptomweite Genexpressionsanalyse mittels Microarrays durchzuführen. Eine *a priori* erstellte Genliste von EMT- sowie ECM-relevanten Genen (siehe Appendix VIII) wurde auf signifikant differenzielle Regulation mittels ANOVA und einem Benjamini-Hochberg *post hoc* Test (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$) analysiert. Die Ergebnisse der ANOVA wurden hierarchisch geclustert und als *Heat-Map* mit der gemittelten relativen Expression von -3 bis 3 aus 3 unabhängigen, biologischen Replikaten dargestellt. Am linken Rand ist eine farbliche Codierung zu sehen die **Zytoskelett** und **Zell-Zell-Kontakt** assoziierte Gene in **blau** darstellt. Gene die in der **ECM-Synthese** und **-Deposition** eine Rolle spielen sind **grün** hinterlegt. **Epitheliale Marker** sind in **rot** dargestellt sowie an der **EMT** beteiligte **Transkriptionsfaktoren** in **lila**

Unter den durch TGF β aufregulierten Genen fanden sich hauptsächlich Kollagene (1, 4, 5, 7) sowie andere ECM-Komponenten wie Vitronectin (VTN) und Laminin C1

(*LAMC1*) und die an dem ECM-Stoffwechsel beteiligten Enzyme Lysyl-Oxidase (*LOX*) und Heparan-Sulfat-Transferase (*HS6T1*). Darüber hinaus wurden Zell-Zell-Kontakt- (*N-Cadherin/CDH2*) oder Zell-ECM-Kontakt-assoziierte Gene wie Integrin B5+6 (*ITGB5, -6*), Claudin 1 (*CLDN1*) oder Tight-Junction Protein 1 (*TJP1*) positiv in ihrer Expression durch TGF β beeinflusst. Ebenso wurden Effekte auf zytoskelettassoziierte Gene wie *smooth muscle actin (ACTA2)* und Moesin (*MSN*) bzw. Caldesmon 1 (*CALD1*) beobachtet. Auf Transkriptionsfaktorebene wurden *SOX4* und *KLF8* positiv in ihrer Expression durch TGF β beeinflusst, sowie *ELF5* und *NKX2-1* signifikant herunter reguliert. Spiegelbildlich wird der Effekt durch TGF β wieder komplett durch Zugabe von SB431542 inhibiert bzw. rückgängig gemacht.

3.1.3.4. AECII als Zellkultur-Modell: Ausblick

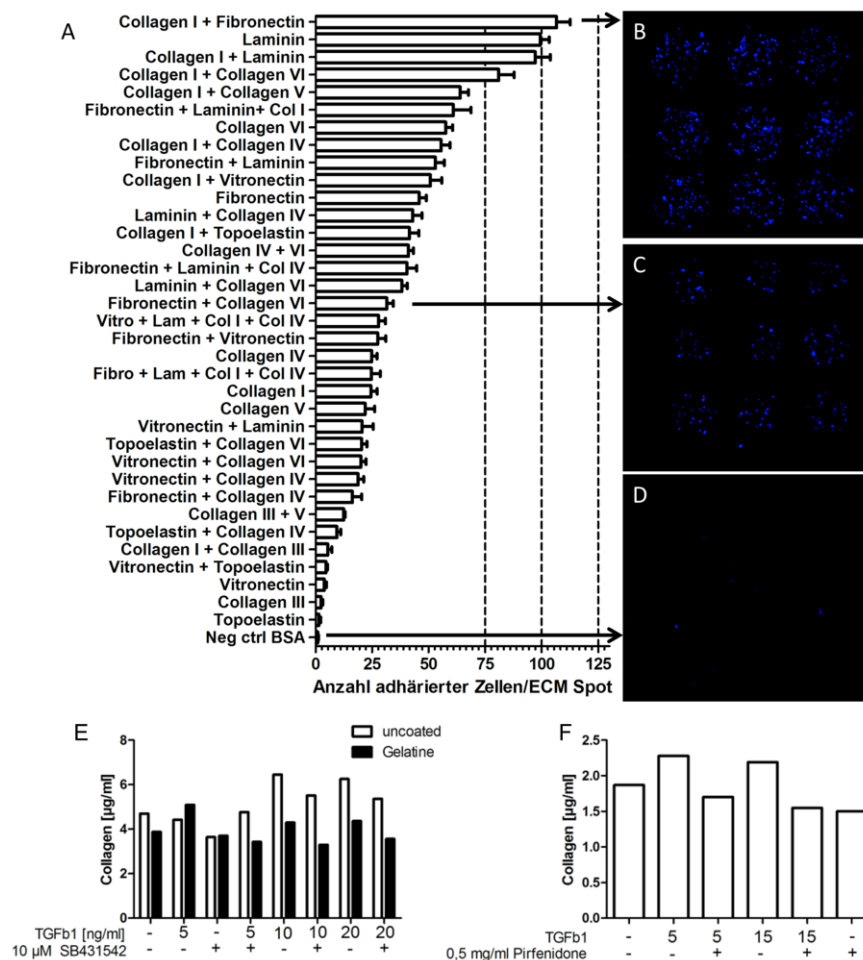


Abbildung 21: Modulationsmöglichkeiten in der AECII-Kultur. Einfluss verschiedener ECM-Proteinkombinationen auf die Adhäsion von AECII (A-D) sowie auf die Kollagensynthese (E). Modulation der Kollagensynthese durch antifibrotisches Therapeutikum (F). Um die Substratpräferenz von AECII zu untersuchen wurden diese auf ECM-Arrays ausgesät und für 24 h adhären gelassen mit anschließender Fixierung und Kernfärbung mit DAPI. Eine Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei 100x Vergrößerung und die Anzahl der adhärrierter Zellen je ECM-Kombination wurde erfasst. Dargestellt in (A) sind die Mittelwerte der 9 Spot-Replikate jeder ECM-Kombination mit den Zellen von einem Patienten. Der Einfluss von Gelatinebeschichtung (2% w/v) auf die Kollagensynthese ist in (E) gezeigt sowie die Modulation der Kollagensynthese durch Pirfenidone in (F).

Um für weitere Experimente die Kulturbedingungen zu optimieren, wurde mittels eines ECM-Arrays die Adhäsionspräferenz der AECII untersucht. Man kann deutliche Unterschiede in der Anzahl an nach 24 h adhären AECII je Untergrund erkennen (Abbildung 21A). Die meisten Zellen haben sich auf einer Kombination von Kollagen und Fibronectin angesiedelt. Fast genauso viele Zellen adhären auf Laminin alleine oder auf Kollagen I und Laminin. Darüber hinaus besteht die Tendenz einer verringerten Kollagensynthese in nichtstimulierten AECII wenn man sie auf gelatinbeschichteten Zellkulturuntergrund aussät (Abbildung 21E). Es scheint, dass der Effekt durch TGF β auf die Kollagensynthese durch die Beschichtung deutlicher hervor tritt. Um in weiteren Studien in den AECII die Wirkung anti-fibrotischer Medikamente zu untersuchen, wurden die Primärzellen mit TGF β und Pirfenidone, einem Medikament in der IPF-Behandlung (Hisatomi et al. 2012), stimuliert und die Kollagensynthese untersucht (Abbildung 21F). Pirfenidone allein bewirkt eine leichte Reduzierung der Kollagensynthese und inhibiert im Weiteren die TGF β -induzierte Kollagensynthese.

3.2. BAMBI und der TGF β -Signalweg bei Lungenkrebs

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wird der TGF β -Signalweg bei Lungenkrebs untersucht unter Berücksichtigung von BAMBI als einem neuen inhibierenden Signalwegsmediator. Ausgehend von seiner durchgängigen Expression bei nichtneoplastischen Erkrankungen, sowie der Signalwegsaktivierung bei IPF, wurden die Expression der Signalwegsmoleküle in humanen Geweben und in immortalisierten Zelllinien auf Protein- und Genexpressionsebene analysiert.

3.2.1. Lokalisierung der Signalwegsmediatoren auf Proteinebene

Eine Darstellung des TGF β -Signalwegs bei Lungenkrebs erfolgte in einem Kollektiv von 157 Patienten mit verschiedenen histologischen Tumorentitäten (siehe Appendix II). Es wurden der TGF β -Pseudorezeptor BAMBI, das Zytokin TGF β , die Signalwegsmediatoren SMAD2, -3, -4, -7 und SNON sowie die phosphorylierten Formen von SMAD2 und SMAD3 (pSMAD2, pSMAD3) mittels Immunhistochemie detektiert (Abbildung 22).

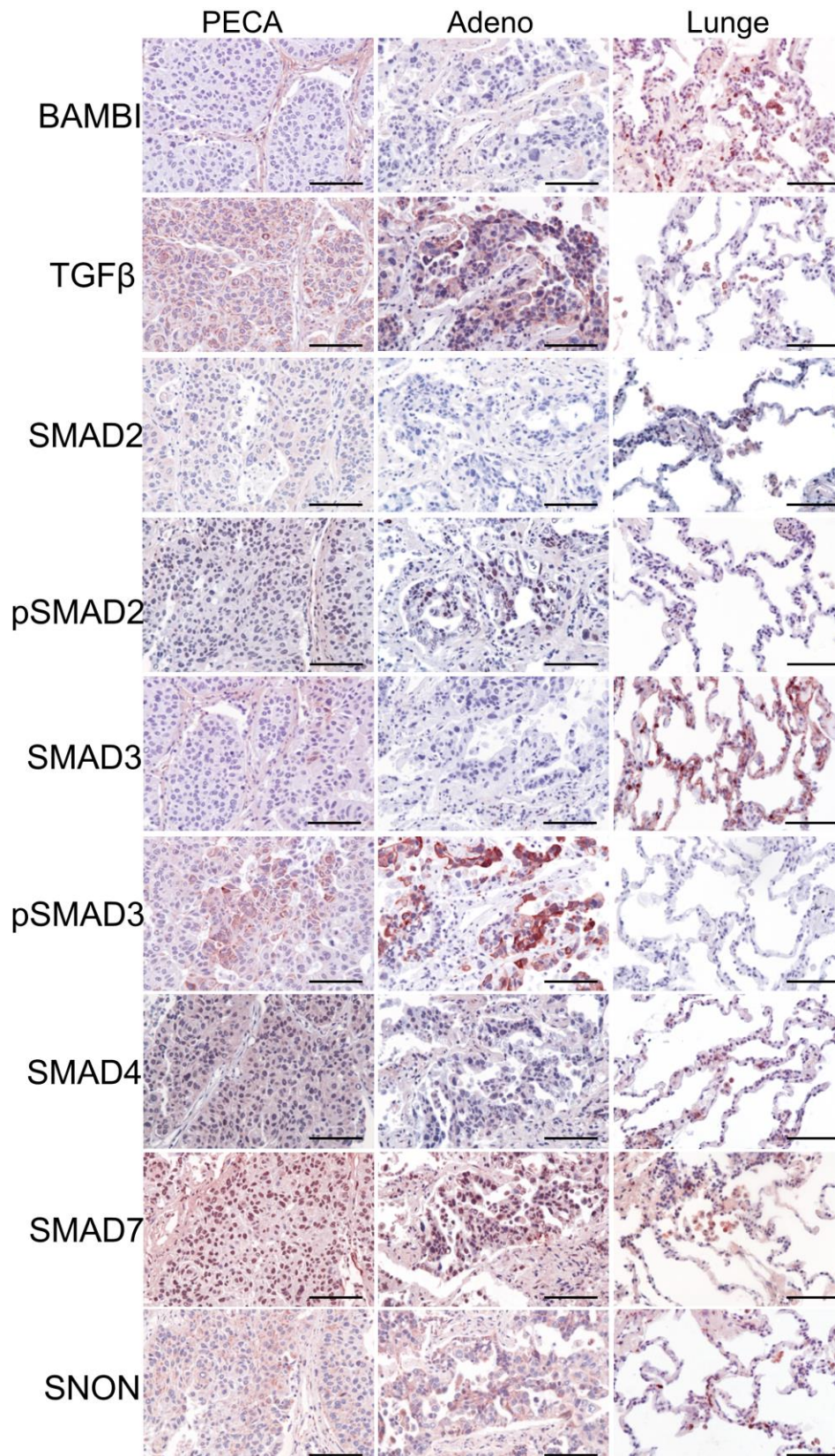


Abbildung 22: Exemplarische Darstellung der TGFβ-Signalwegsmoleküle in humanem Gewebe. Hope-fixierte, paraffineingebettete Gewebeproben von je einem Plattenepithelkarzinom (PECA), einem Adenokarzinom (Adeno) im Vergleich zu tumorfreier Lunge (Lunge). In den Geweben wurden mittels Immunhistochemie der TGFβ- Pseudorezeptor BAMBI, TGFβ, die Signalwegsmediatoren SMAD2, SMAD3, SMAD4 sowie die Antagonisten SMAD7 und SNON als auch der Phosphorylierungsstatus von SMAD2 und -3 angefärbt. Alle Aufnahmen bei 400x Vergrößerung und mit Maßstabsbalken = 100 µm.

In keinem der beiden Tumorgewebe wurde eine Expression von BAMBI beobachtet. Im Fall der tumorfreien Lunge wurde eine Expression in AM und AECII (Abbildung 22) vorgefunden. Beide Tumore sind positiv für TGF β was in der tumorfreien Lunge nur in den Alveolarmakrophagen der Fall war. Unphosphoryliertes SMAD2 wird nicht vom Adenokarzinom exprimiert und ist nur schwach im Plattenepithelkarzinom nachzuweisen. Im tumorfreien Kontrollgewebe wurde pSMAD2 nur im Zytoplasma der Alveolarmakrophagen vorgefunden. Bei beiden Karzinomen wurde pSMAD2 im Zellkern detektiert und nicht in der tumorfreien Lunge. Die Expression von SMAD3 in den AECI dominierte das Bild in den tumorfreien Geweben, während bei den Karzinomen nur das Plattenepithelkarzinom eine schwache, fokale Anfärbung zeigte. Spiegelbildlich hierzu wiesen beide Tumore eine starke Expression von pSMAD3 auf, welches hingegen in der tumorfreien Lunge nicht detektierbar war. SMAD4 und SMAD7 waren in allen drei Geweben nachzuweisen und wurden in tumorfreien Geweben hauptsächlich in den Alveolarmakrophagen exprimiert. Beide Karzinome zeigten starke Signale für SMAD7 in den Zellkernen der malignen Läsionen. Sowohl Epithelzellen als auch Makrophagen waren positiv für SNON im Fall der tumorfreien Lunge und beide Karzinome zeigten eine deutliche Expression.

BAMBI und SMAD3 werden nicht im Tumorgewebe exprimiert

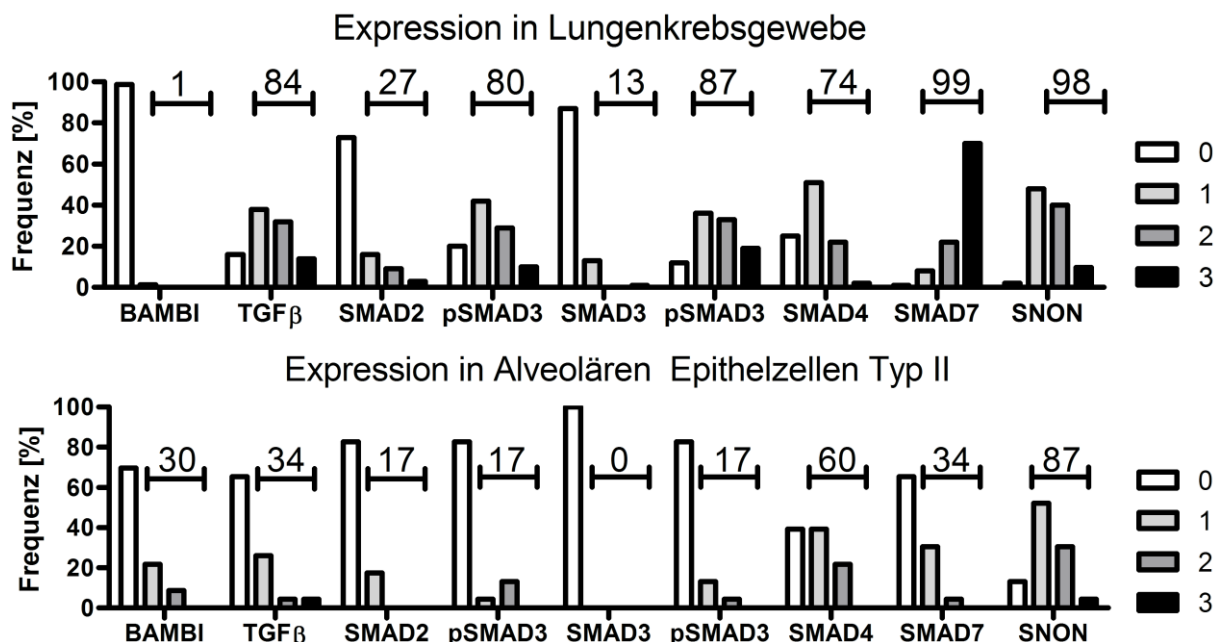


Abbildung 23: Zusammenfassende Balkengrafik der beobachteten Expression im untersuchten Kollektiv von 157 Lungenkrebsgeweben und 23 tumorfreien Lungen in Abhängigkeit des Färbe-Scores. Bei den tumorfreien Lungengeweben wurde sich für diese Auswertung auf die Analyse der Marker in den AECII beschränkt. Die Summe positiver Expression (Frequenz [%]) im Verhältnis zu den untersuchten Patientengeweben ist oberhalb des kleinen Balkens für jeden Signalwegsmediator angegeben.

Um die Expression der Signalwegsmoleküle zwischen Lungenkrebs und tumorfreiem Gewebe besser zusammenfassend vergleichen zu können, wurde im Falle des nichtneoplastischen Gewebes für eine zusammenfassende Darstellung nur auf die AECII (Abbildung 23) fokussiert. Es wird vermutet, dass AECII die Ausgangszellen für Adenokarzinome darstellen könnten (Lin et al. 2012).

Insgesamt war nur in 2/157 (1,2%) der untersuchten Karzinome eine Expression von BAMBI mittels Immunhistochemie zu detektieren, während die Expression in 7/23 (30,4%) der analysierten AECII als regelmäßig einzustufen ist. Einer dieser Tumore wies einen positiven EGFR-Mutations-Status auf. Im Gegensatz hierzu fand sich in 132/157 (84%) der Tumoren und in 8/23 AECII (34%) eine Färbung von TGF β . Der Unterschied zwischen der Expression von SMAD2 in den AECII (4/23; 17,3%) und im Tumor (43/157; 27,3%) war nicht so groß wie der zwischen der phosphorylierten Form von SMAD2 mit 4/23 (17,4%) in AECII und 126/157 (80,3%) im Lungenkrebs. SMAD3 wurde nicht in AECII exprimiert gefunden und nur in geringem Maß in den untersuchten Lungentumoren (21/157; 13%). Dafür war die aktivierte Form des Signaltransmitters im Großteil aller Tumore vorhanden (138/157; 88%), während die meisten AECII (4/23; 17,3%) keine Expression von pSMAD3 aufwiesen. SMAD4 war sowohl in den AECII (13/23; 60,8%) als auch in den Lungentumoren (117/157; 74,6%) häufig vertreten, während SMAD7 als Signalwegsantagonist häufiger in den Tumoren zu finden war (8/23; 34,8% AECII vs. 156/157; 99,4% Lungentumor). Allerdings war das SMAD7 Signal der Tumore auf die Zellkerne beschränkt anstatt zytoplasmatisch detektiert zu werden. Der Großteil der untersuchten AECII (20/23; 87%) ebenso wie die Tumorgewebe (154/157; 98,1%) waren positiv für SNON. Mit Hinblick auf die Expressionstärke lässt sich feststellen, dass keine deutlichen Unterschiede der Signalwegsmediatoren zwischen AECII und den Lungentumoren zu finden waren. Einzig SMAD7 wies eine starke Überexpression im Lungenkrebs auf (70% Score 3), während in den Epithelzellen eher eine schwache (30,4 % Score 1) Expression vorgefunden wurde (Abbildung 23).

Abwesenheit von BAMBI geht einher mit einer Signalwegsaktivierung

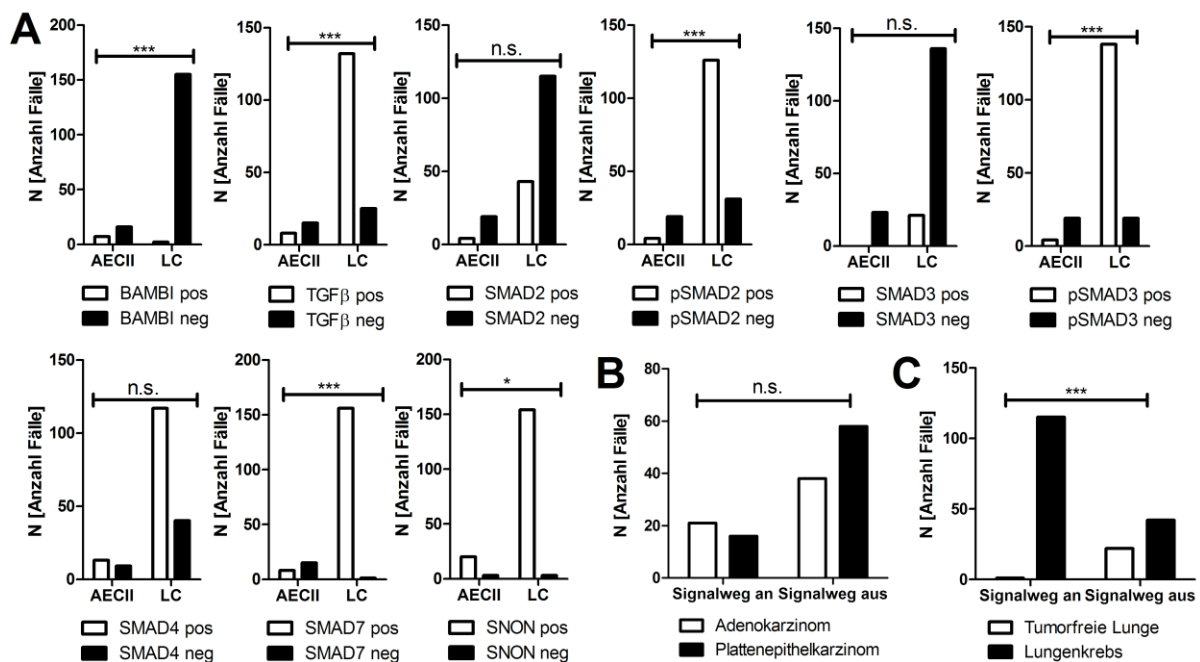


Abbildung 24: Unterschiedliche Expression der Signalwegsmoleküle zwischen Lungenkrebs und AECII. Statistischer Vergleich der Expression von BAMBI, TGFβ, SMAD2, pSMAD2, SMAD3, pSMAD3, SMAD4, SMAD7 und SNON im untersuchten Kollektiv (A) sowie der Signalwegsaktivität (Doppelpositivität von pSmad2 und pSmad3) zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinom (B) als auch allgemein zwischen tumorfreier Lunge und Lungenkrebs (C). Mittels des Exakten Fisher-Tests (zweiseitig) wurden in einer Vierfelder-Tafel die jeweilige Expression der Signalwegsmoleküle zwischen Alveolären Epithelzellen Typ II (AECII) und Lungenkrebs (LC) untersucht bei Annahme eines Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,005$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

Bei einem statistischen Vergleich der beobachteten Expressionen, mittels des Exakten Fisher-Tests (Abbildung 24), ergaben sich signifikante ($p \leq 0,001$) Unterschiede zwischen AECII und Lungenkrebs für BAMBI, TGFβ, pSMAD2, pSMAD3, SMAD7 und ein signifikanter ($p \leq 0,05$) Unterschied für SNON. Kein signifikanter Unterschied wurde beim Vergleich der Expressionen von SMAD2 und SMAD3 zwischen Lungentumoren und den AECII festgestellt. Bei Annahme dass sowohl SMAD2 als auch SMAD3 in phosphorylierter Form vorliegen müssen, damit die Signalwegskaskade aktiviert ist, wurden die pSMAD2⁺/pSMAD3⁺ doppelpositiven Fälle gezählt. Ein Vergleich der beiden häufigsten Tumorentitäten Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom im Hinblick auf die Signalwegsaktivität ergab keine signifikanten Unterschiede. Bei Betrachtung zwischen normalen AECII und Lungentumorzellen zeigt sich jedoch ein signifikanter Unterschied in der Signalwegsaktivität: in den Lungentumoren war eine häufigere Signalwegsaktivität vorzufinden als in den AECII.

3.2.2. Darstellung des TGF β -Signalwegs und BAMBI in Tumorzelllinien

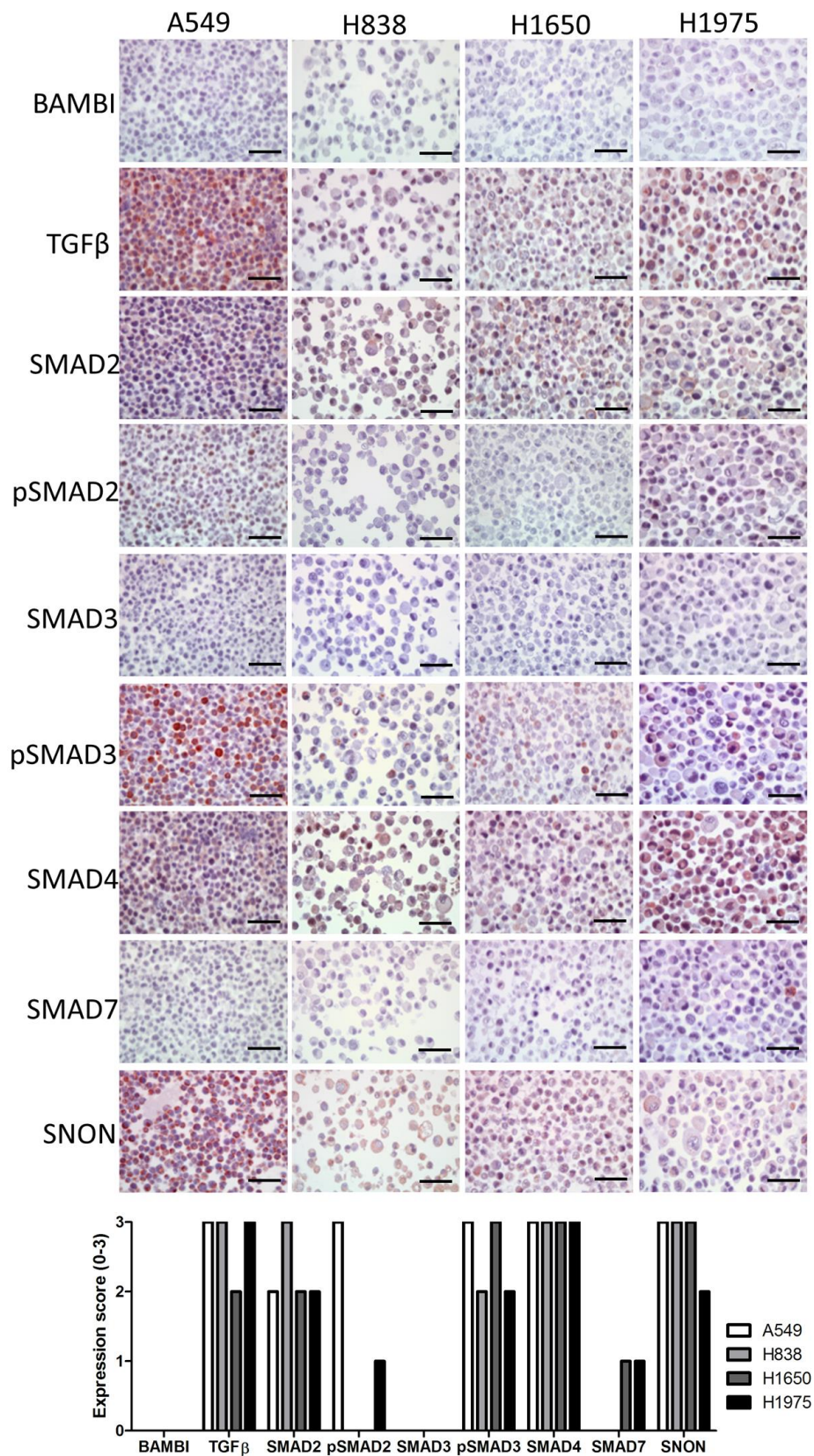


Abbildung 25: Darstellung des TGF β -Signalwegs in immortalisierten Lungenkrebszelllinien. Hope-fixierte, paraffineingebettete Pellets der Zelllinien A549, H838, H1650 und H1975 wurden mittels Immunocytochemie auf die Expression von BAMBI, TGF β , SMAD2, -3, -4, -7, SNON sowie pSMAD2 und pSMAD3 untersucht. Alle Aufnahmen bei 400x Vergrößerung und mit einem Maßstabsbalken = 50 μ m.

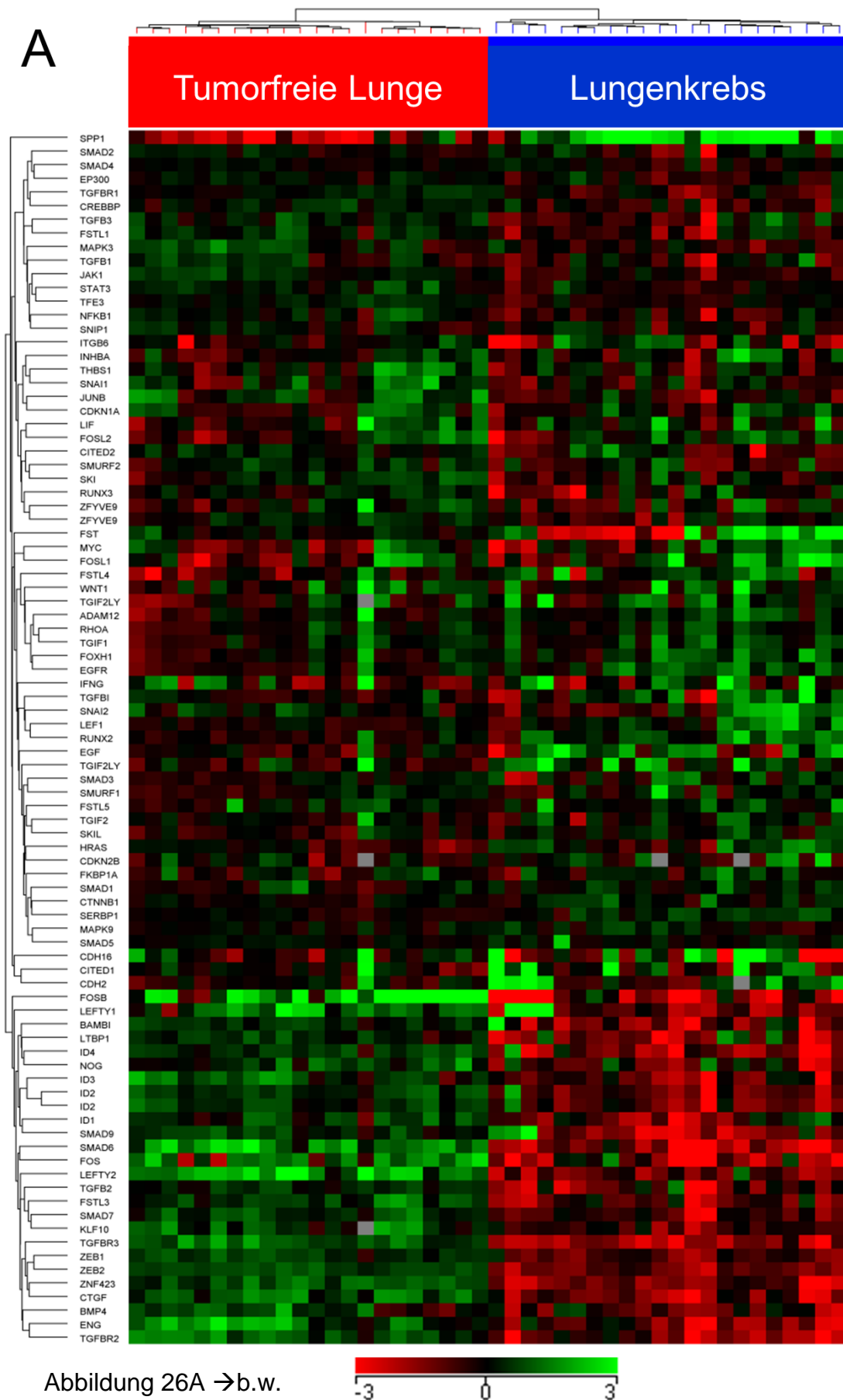
Expression des Signalwegs in den Zelllinien vergleichbar zum Tumorgewebe

Die immortalisierten Adenokarzinomzelllinien A549, H838, H1650 und H1975 sind gängige Zellsysteme in der pneumologischen Forschung und wurden im Rahmen dieses Projekts für funktionelle Untersuchungen verwendet. Um die Ergebnisse der humanen Gewebe auf Proteinebene mit denen der Zellsysteme zu komplementieren, wurden HOPE-fixierte, paraffineingebettete Zellen auf die Expression der TGF β -Signalwegsmediatoren mittels Immunzytochemie untersucht (Abbildung 25). Keine der verwendeten Zelllinien zeigte eine Expression von BAMBI auf Proteinebene, während allesamt stark (A549, H838 und H1975, Score 3) bzw. deutlich (H1650, Score 2) positiv für TGF β waren. Im Gegensatz zu den Geweben, die nur selten SMAD2 exprimierten, fand sich in allen Zelllinien eine durchgängige Färbung für SMAD2. Eine Aktivierung von SMAD2 durch Phosphorylierung ließ sich nur in A549 und H1975 Zellen beobachten und keine der untersuchten Zelllinien war positiv für Smad3. Jede der Zelllinien zeigte eine durchgängige Phosphorylierung sowohl von SMAD3 als auch eine starke Expression von SMAD4. Nur in den EGFR-mutierten H1650 und H1975 Zelllinien ließ sich SMAD7 detektieren, während alle positiv für SNON waren. Unter Annahme der Doppelpositivität von pSMAD2 und pSMAD3 als Voraussetzung für einen aktivierten Signalweg, liegt dieser bei A549 und H1975 Zelllinien vor.

3.2.3. Die Genexpression des TGF β -Signalwegs im Patientengewebe

Es ist bekannt, dass der TGF β -Signalweg bei Tumoren unterschiedlich auf Genexpressionsebene reguliert wird (Massagué 2008; Jeon & Jen 2010). Daher wurde von 22 zufällig ausgewählten Tumoren und dazugehörigen tumorfreien Geweben RNA isoliert um die Genexpression transkriptomweit zu untersuchen. Die RNA wurde in cRNA umgeschrieben, fluoreszenzmarkiert und auf Agilent 4x44K V2 Whole Genome Arrays hybridisiert. Eine Liste bekannter TGF β -Signalwegsmediatoren (siehe Appendix VI) wurde als Input für die Untersuchungen verwendet.

Der TGFβ-Signalweg ist differenziell im Lungenkrebsgewebe exprimiert



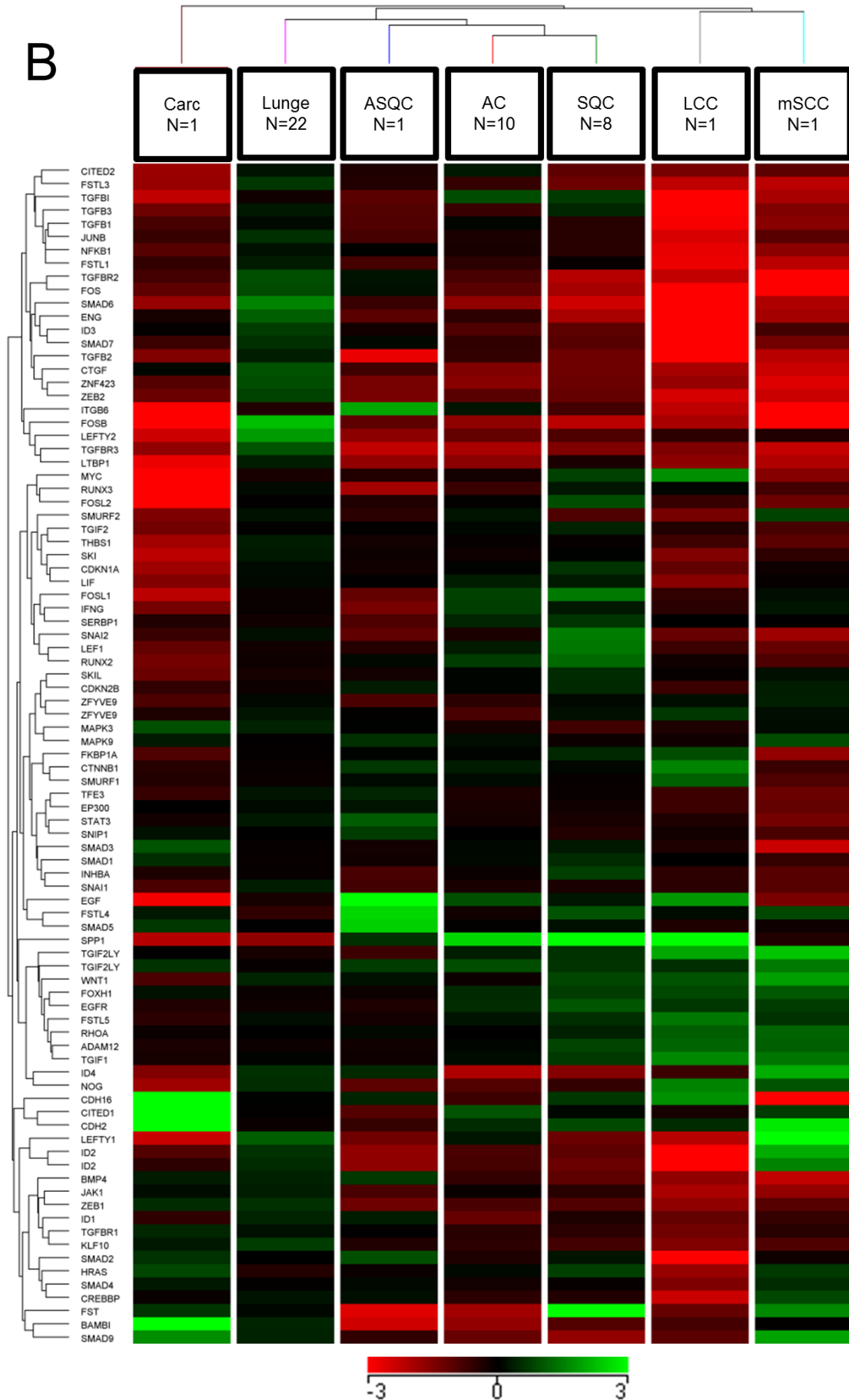


Abbildung 26B →b.w.

Abbildung 26: Differenzielle Genexpression des TGF β -Signalwegs bei Lungenkrebs und tumorfreier Lunge. 22 Paare von Hope-fixierten, paraffineingebetteten Lungenkrebsgeweben sowie dazugehörigem, tumorfreiem Kontrollgewebe (Tumorfreie Lunge) derselben Patienten wurden mittels Microarray auf die Expression von TGF β -Signalwegsteilnehmern untersucht. Im Fall der Lungentumore wurden die Gewebe vorher mikrodissiziert um den Anteil der Tumorzellen zu erhöhen und Stromazellen zu vermeiden. Die Analyse erfolgte mittels Agilent 4x44K V2 Whole Genome Arrays und eine Liste direkter und indirekter TGF β -Signalwegsmediatoren wurde auf die Expression zwischen Lungengewebe und Lungentumor untersucht und entsprechend ihrer histologischen Entität sowie ihrer Expression hierarchisch geclustert. Die Darstellung erfolgt als *Heat-Map* mit einer relativen Expression von -3 bis 3 als farbliche Kodierung. Die individuelle Expression der Einzelhybridisierungen ist in (A) dargestellt, während (B) die gemittelte, relative Expression in Abhängigkeit von der histologischen Tumorentität zeigt. Die Tumorentitäten sind wie folgt abgekürzt: Carc = Karzinoid; ASQC = Adenosquamöses Karzinom; AC = Adenokarzinom, SQC = Plattenepithelkarzinom, LCC = Großzelliges Karzinom und mSCC = gemischtes, Kleinzelliges Karzinom. Die jeweilige Anzahl (N) der unterschiedlichen Entitäten für die gemittelten Werte ist in der Beschriftung ersichtlich.

Die Einzelhybridisierungen der relativen Genexpression zeigen deutliche Unterschiede zwischen den Lungentumoren und den tumorfreien Geweben (Abbildung 26A) sowie eine Homogenität innerhalb der Gewebe. Da die untersuchten Tumore eine Mischung verschiedener histologischer Entitäten enthalten und davon auszugehen ist, dass sich diese in ihrer Genexpression unterscheiden, wurde eine hierarchische Cluster-Analyse auf Grundlage der Histologie durchgeführt (Abbildung 26B). Es ist deutlich ersichtlich, dass Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom sowie deren Mischform (Adenosquamöses Karzinom) sich in der Expression der TGF β -Signalwegsmediatoren zueinander ähnlicher verhalten, als die anderen Subtypen. Die tumorfreien Lungengewebe sind hierbei überraschenderweise den NSCLC-Subtypen ähnlicher als den nicht-NSCLC Tumoren und dem Großzelliges Karzinom. Diese clustern deshalb weiter entfernt, wobei sich jeweils das Großzellige Karzinom und das gemischte, Kleinzellige Karzinom ähnlicher sind als das Karzinoid. Interessanterweise zeigte sich bei dem Karzinoid eine sehr starke Expression von *BAMBI* welche in allen anderen Tumoren im Vergleich zu den tumorfreien Lungen vermindert war.

Adeno- und Plattenepithelkarzinom unterscheiden sich in der Genexpression

Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom als die häufigsten Vertreter der Lungentumore mit genügend vorliegenden Datensätzen, wurden im Vergleich zu den tumorfreien Geweben auf signifikant differenziell exprimierte Gene des TGF β -Signalwegs untersucht. Eine One-way ANOVA mit einem Benjamini-Hochberg *post hoc* Test für multiple Vergleiche separierte die Karzinome untereinander von den Kontrollgeweben (Abbildung 27). *SPP1* fand sich signifikant aufreguliert in den Tumoren im Vergleich zu den tumorfreien Lungen ebenso wie *FOSL1*, *CDH2* und *RUNX2*. Die Überexpression von *LEF1*, *SNAI2* sowie *FST* und *TGIF1* trennte die Plattenepithelkarzinome von den Adenokarzinomen und der tumorfreien Lunge. Als

charakteristisch für Adenokarzinome erwies sich die verstärkte Expression von *EGF*, *TGFB1* sowie die verminderte Expression von *ID1* und *LTBP1*. Die Lungengewebe zeigten eine verstärkte Expression von *JUNB*, *TGFβRII*, *FOS*, *LEFTY1* und *-2*, *ENG*, *KLF10*, *SMAD7*, *ID2*, *-3* und *-4*, *ZEB1*, *ZNF423*, sowie *FOSB* und *SMAD6*.

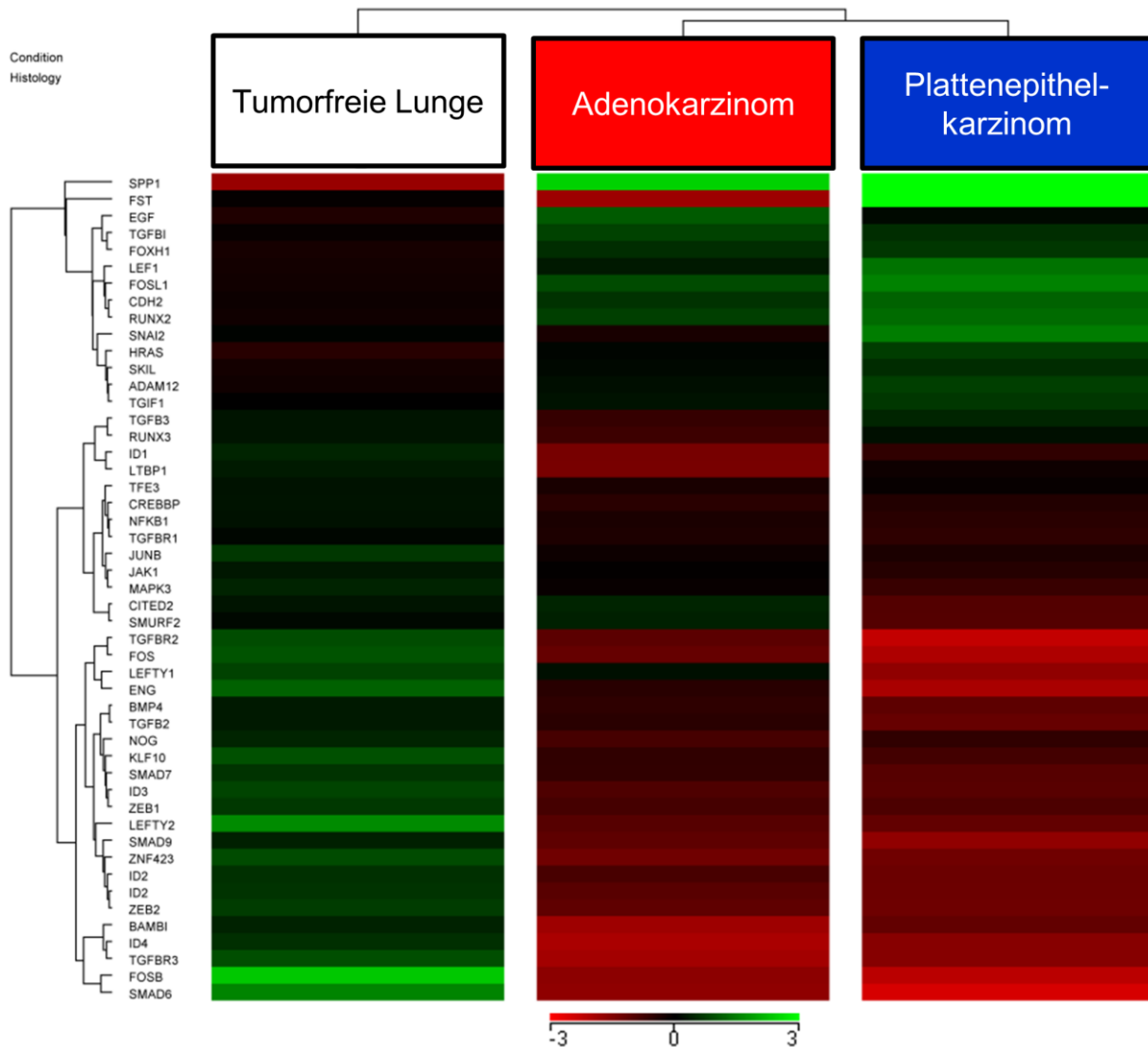


Abbildung 27: Signifikant differenziell exprimierte Gene des TGFβ-Signalwegs zwischen Tumor-freier Lunge, Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom. Die häufigsten histologischen Entitäten der untersuchten Lungentumore, Adenokarzinom (N=10) und Plattenepithelkarzinom (N=8), wurden auf die differenzielle Expression von TGFβ-Signalwegsmediatoren im Vergleich zu tumorfreier Lunge (N=22) mittels Microarray untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA und einem Benjamini-Hochberg *post hoc* Test bei Annahme eines Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$. Die Ergebnisse der statistischen Analyse wurden hierarchisch geclustert und als *Heat-Map* mit einem gemittelten, relativen Expressionsniveau von -3 bis 3 dargestellt.

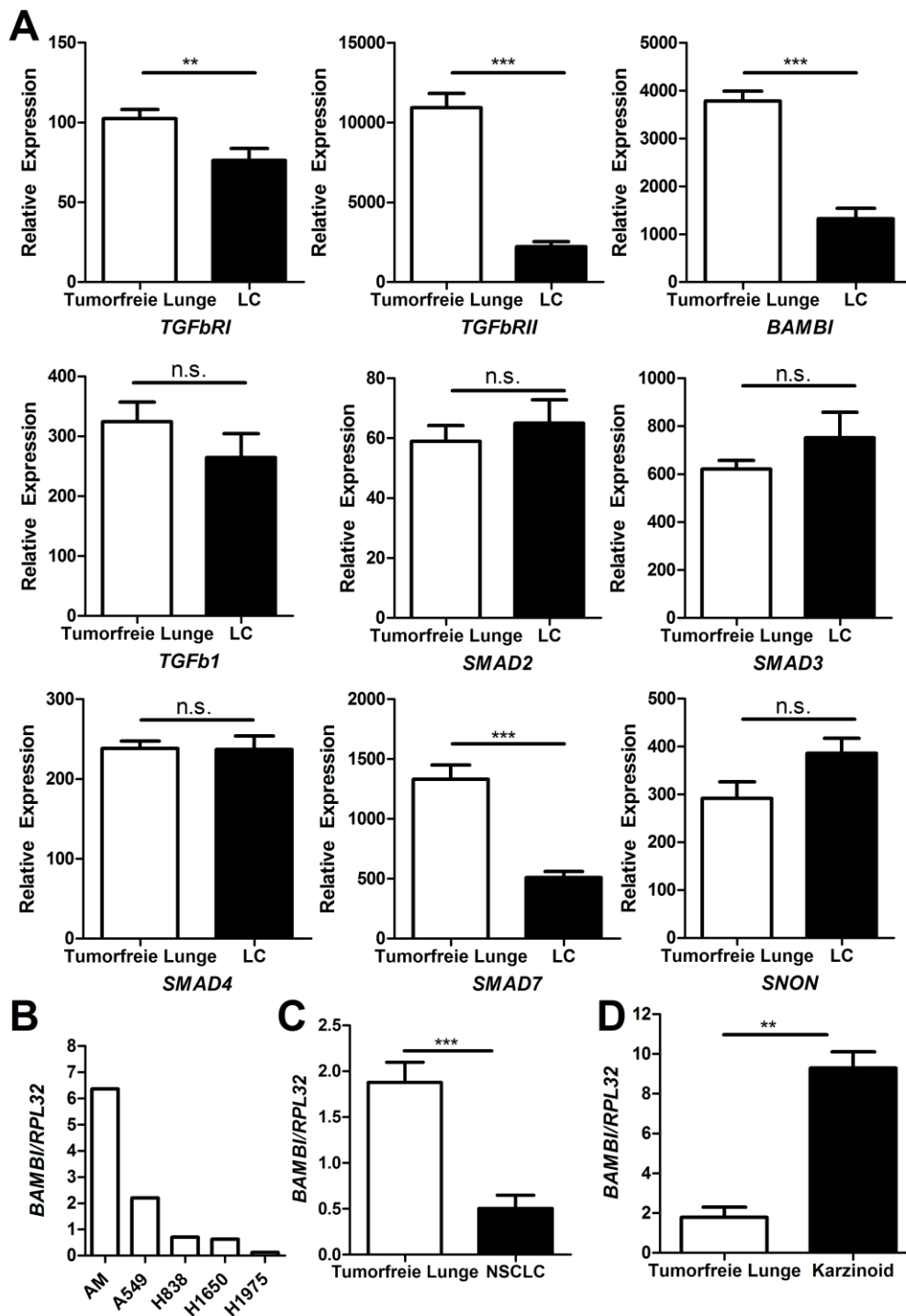
Die mRNA-Expression von *TGFβRI+II* und *BAMBI* ist im Tumor reprimiert

Abbildung 28: Darstellung des TGFβ-Signalwegs auf Genexpressionsebene im Vergleich von Lungenkrebs und tumor-freier Lunge. (A) Quantilnormalisierte Microarray-Daten wurden mittels T-Test für gepaarte Stichproben auf unterschiedliche Genexpression zwischen tumorfreier Lunge (N=22) und Lungenkrebs (LC; N=22) untersucht. (B-D) qRT-PCR zur Validierung der Microarray-Daten der Expression von *BAMBI* in den immortalisierten Zelllinien (B), Lungengeweben und dazugehörigen Lungentumorgeweben (C) sowie Karzinoiden mit gepaarten, tumorfreien Geweben (D). Die Expression von *BAMBI* ist als relative Expression zum Referenzgen *RPL32* angegeben. AM in (B) zeigt die Expression von *BAMBI* in Alveolarmakrophagen als Positivkontrolle und NSCLC in (C) beinhaltet die cDNA der Proben des Microarrays der nicht-kleinzelligen Lungentumorgewebe und ihren entsprechenden tumorfreien Geweben derselben Patienten. Signifikant differenzielle Genexpression wurde definiert bei Annahme eines Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,005$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) bei Nutzung des T-Tests (zweiseitig).

Um die immunhistochemisch erhobenen Daten der Proteinebene für die 9 Signalwegsmediatoren auf Genexpressionsebene zu komplementieren, wurden die Microarrayrohdaten mittels der DirectArray-Software quantilnormalisiert (Abbildung 28). Zusätzlich zu mittels Immunhistochemie detektierten Mediatoren wurde noch die Genexpression der *TGF β RI+II* bestimmt. Auf Rezeptorebene wurden signifikante (*TGF β RI*, *TGF β RII* und *BAMBI*; $p \leq 0,005$) Unterschiede zwischen den tumorfreien Lungen und Lungentumoren festgestellt. Keine signifikanten Unterschiede wurden zwischen Lungengeweben und Lungentumoren im Fall von *SMAD2*, -3, -4 und *SNON* festgestellt. Die Expression von *SMAD7* erwies sich, verglichen mit tumorfreien Lungengeweben, als signifikant vermindert in Lungentumorgeweben.

Aufgrund der Tatsache, dass *BAMBI* sowohl bei COPD-Patienten (Drömann et al. 2010) als auch im Ovarialkarzinom (Pils et al. 2010) und kolorektalen Karzinom (Fritzmann et al. 2009) überexprimiert gefunden wurde, überraschten die Ergebnisse der Protein- und mRNA-Ebene. Um die Microarray-Daten zu validieren, wurde die Genexpression von *BAMBI* mittels qRT-PCR genauer analysiert (Abbildung 28B-D). Die immortalisierten Zelllinien zeigten im Vergleich zu mRNA von Alveolarmakrophagen eine verminderte Expression von *BAMBI* (Abbildung 28B). Die Ergebnisse der Microarray-Versuche konnten reproduziert werden und es zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied auf Genexpressionsebene zwischen tumorfreier Lunge und NSCLC-Material (Abbildung 28C).

Karzinoide exprimieren BAMBI-mRNA jedoch kein Protein

Weiterhin zeigte sich in den Microarrays im Karzinoid eine starke Expression von *BAMBI*, die konträr zu der Expression in den anderen Tumoren war. Um dieses überraschende Ergebnis zu validieren, wurde Patientenmaterial von 4 weiteren Karzinoiden mittels qRT-PCR und Immunhistochemie auf die Expression von *BAMBI* analysiert. Auf mRNA-Ebene ergab sich eine verstärkte Expression in den Karzinoiden verglichen mit ihren jeweiligen tumorfreien Kontrollgeweben (Abbildung 28D). Weiterhin erwies sich die Genexpression sogar als stärker im Vergleich zu den Alveolarmakrophagen. Auf Proteinebene jedoch zeigte sich bei keinem der untersuchten Karzinoide eine Expression von *BAMBI* (Abbildung 29).

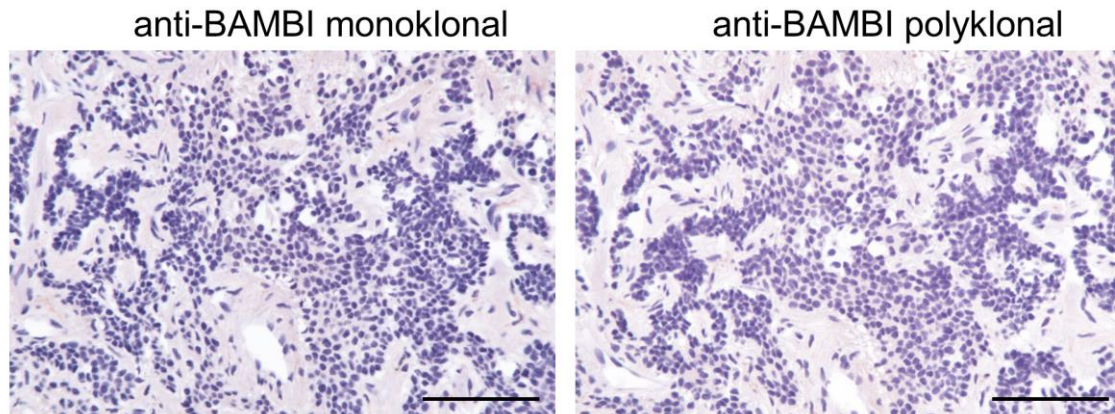


Abbildung 29: Keine Expression von BAMBI auf Protein-Ebene im Karzinoid. Hope-fixiertes, paraffineingebettetes Patientenmaterial von 4 Karzinoiden wurde mittels Immunhistochemie auf die Expression von BAMBI untersucht. Verwendet für die Detektion des Proteins wurden jeweils monoklonale und polyklonale Antikörper. Alle Aufnahmen bei 400x Vergrößerung und mit einem Maßstabsbalken von 100 μm .

3.2.4. Epigenetische Untersuchungen des TGF β -Signalwegs bei Lungenkrebs

Im nichtneoplastischen Lungengewebe wurde eine stetige Expression von BAMBI beobachtet und daher waren die Ergebnisse seiner nicht vorhandenen oder sehr stark verminderten Expression bei Lungenkrebs überraschend. Eine mögliche epigenetische Stilllegung der Genaktivität von BAMBI wurde bereits in desmoiden Tumoren (Kitazawa et al. 2005) und Blasenkrebs (Khin et al. 2009) beobachtet. Um eine mögliche Inaktivierung der Genexpression durch epigenetische Regulationsmechanismen zu untersuchen, wurde in einer Kooperation mit dem Institut für Humangenetik des UKSH Campus Kiel (Prof. Siebert, Prof. Ammerpohl), die DNA von mikrodisssektierten Tumoren und dazugehörigen Lungengeweben mittels Illumina Bead Arrays analysiert. Hierbei wurde dieselbe Liste von TGF β -Signalwegsmediatoren wie in den Transkriptomanalysen untersucht und einem Clustering unterzogen.

Der TGF β -Signalweg ist zwischen Lunge und Tumor differenziell methyliert

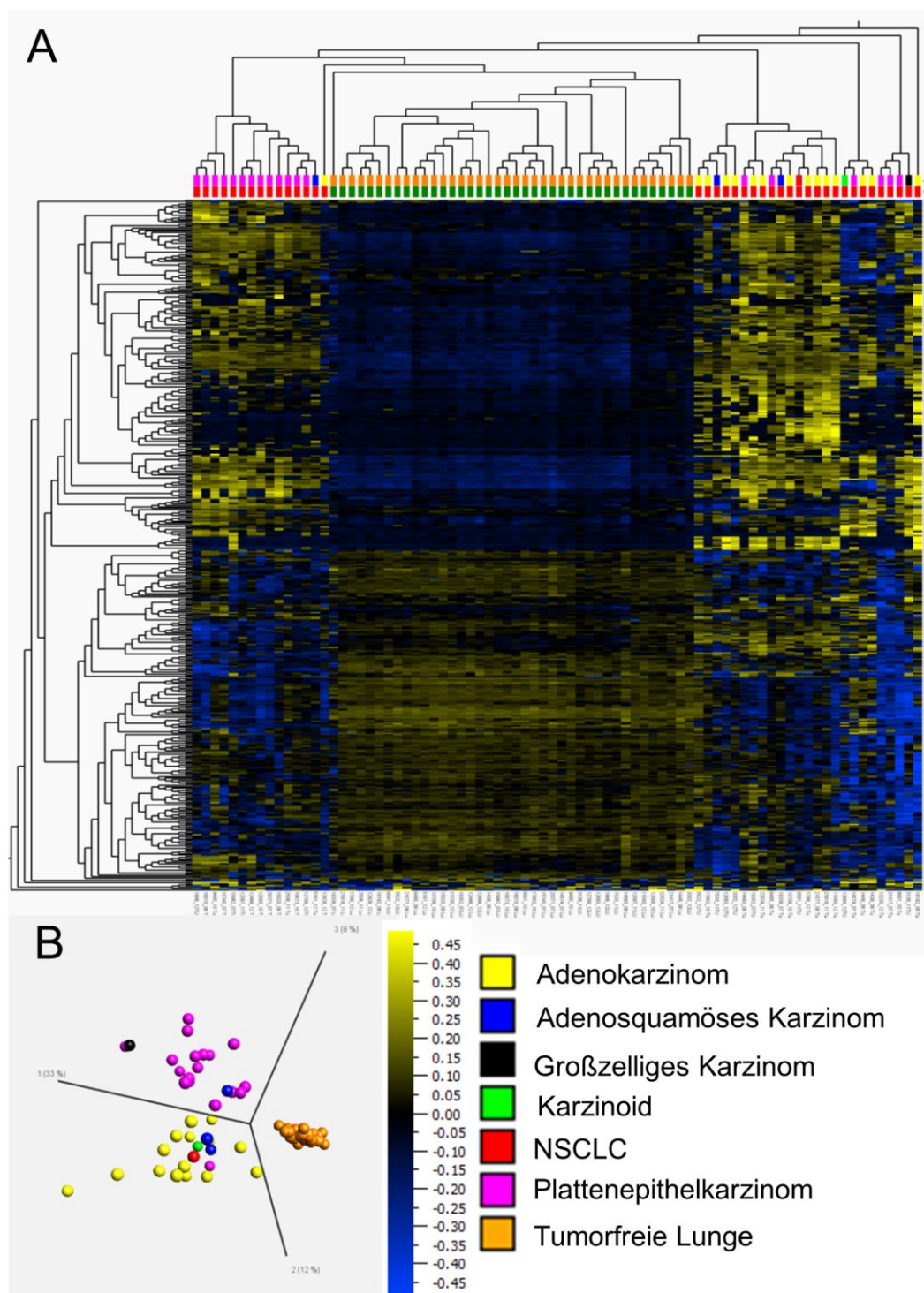


Abbildung 30: Differenzielle epigenetische Modifikationen des TGF β -Signalwegs bei Lungenkrebs und tumorfreier Lunge. Um epigenetische Modifikationen der DNA im TGF β -Signalweg zu untersuchen wurde von jeweils 46 mikrodisezierten Tumoren und dazugehöriger tumorfreier Lunge die DNA bisulfidkonvertiert und auf Illumina WholeGenome Arrays hybridisiert. Es erfolgte eine unsupervidierte Analyse der Proben mit einem Varianzfilter von $\sigma/\sigma_{\max} > 0,45$ aus einer *a priori* erstellten Liste bekannter TGF β -Signalwegsteilnehmer. Die Ergebnisse des Varianzfilters (476 Loci) wurden hierarchisch geclustert und als *Heat-Map* dargestellt (A) sowie eine *Principal-Component Analyse* (PCA) durchgeführt (B).

Die Ergebnisse der unsupervidierten Methyloanalyse zeigen deutliche Unterschiede im TGF β -Signalweg zwischen Tumor-freier Lunge und den Lungenkrebsgeweben (Abbildung 30). Bei dieser Art der bioinformatischen Auswertung wurden die Proben, unabhängig von den experimentellen Parametern (Gewebart; Tumorentität), einem Clustering unterzogen. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Trennung zwischen neoplastisch und nichtneoplastisch (Abbildung 30A) sowie eine Trennung der häufigsten, histologischen Entitäten (Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom) voneinander (Abbildung 30B). Anhand der vorliegenden Daten für den TGF β -Signalweg lassen sich somit Tumor und tumorfreies Gewebe klar voneinander unterscheiden.

Die Methylierung von BAMBI diskriminiert Tumor von Tumor-freier Lunge

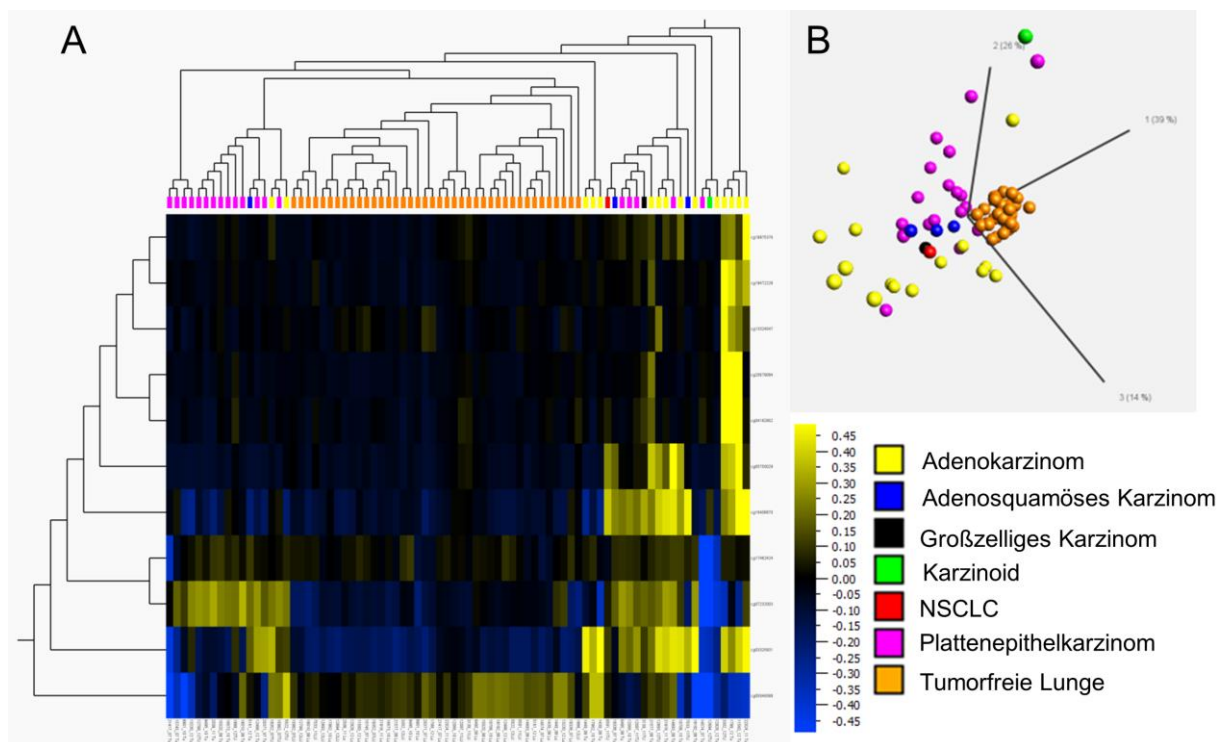


Abbildung 31: Unterscheidung von tumorfreier Lunge und Tumorgewebe aufgrund des Methylierungsgrades von BAMBI. 11 einzelne Loci für BAMBI des Illumina-Arrays wurden einem unsupervidierten Clustering unterzogen und als *Heat-Map* dargestellt (A) sowie einer *Principal-Component Analyse* (B) unterzogen.

Bei Betrachtung der auf dem Array enthaltenen Loci für BAMBI, ergibt eine unsupervidierte Cluster-Analyse eine deutliche Diskriminierung der Tumoren von den tumorfreien Lungen (Abbildung 31A). Weiterhin zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen Plattenepithel- und Adenokarzinomen im Methylierungsstatus der CpG-Loci des BAMBI-Gens (Abbildung 31B).

3.2.5. Einfluss der Überexpression von BAMBI in Lungenkrebszellen

Nachdem gezeigt wurde, dass BAMBI so gut wie nie im Lungenkrebs sowie den Krebszelllinien auf Proteinebene zu finden ist und epigenetische Veränderungen in dem Genlocus stattfinden, wurde die erzwungene Expression in Krebszellen untersucht. Die Versuche eine stabile Zelllinie zu erstellen ließen bereits vermuten, dass die Expression von BAMBI in A549-Zellen einen nachteiligen Effekt auf die Zellvitalität hat (siehe Abbildung 12). Um dies näher zu analysieren, wurden A549-Zellen transient mit den Expressionsplasmiden transfiziert und nach 48 h Kultur die Proliferation mittels Ki67-Immunfluoreszenzfärbung untersucht (Abbildung 32).

Expression von BAMBI in A549-Zellen bewirkt eine reduzierte Proliferation

Der Transfektionsvorgang an sich zeigte keinen negativen Einfluss auf die Zellen, wie man anhand der Ki67-Färbung der Vehikelkontrolle (nur Transfektionsreagenz) verglichen mit den nichttransfizierten A549-Zellen (A549 wt) erkennen kann. Generell waren sowohl die Transfektionseffizienz als auch die GFP-Signalintensität bei den Kontroll-Plasmiden (pCMV GFP) höher als bei den BAMBI-Expressionsplasmiden. Vergleicht man den Anteil der DAPI⁺/GFP⁺-Zellen auf die Expression von Ki67 so zeigen sich signifikant mehr Ki67-positive Zellen mit dem Kontroll-Plasmid als mit dem BAMBI-Plasmid.

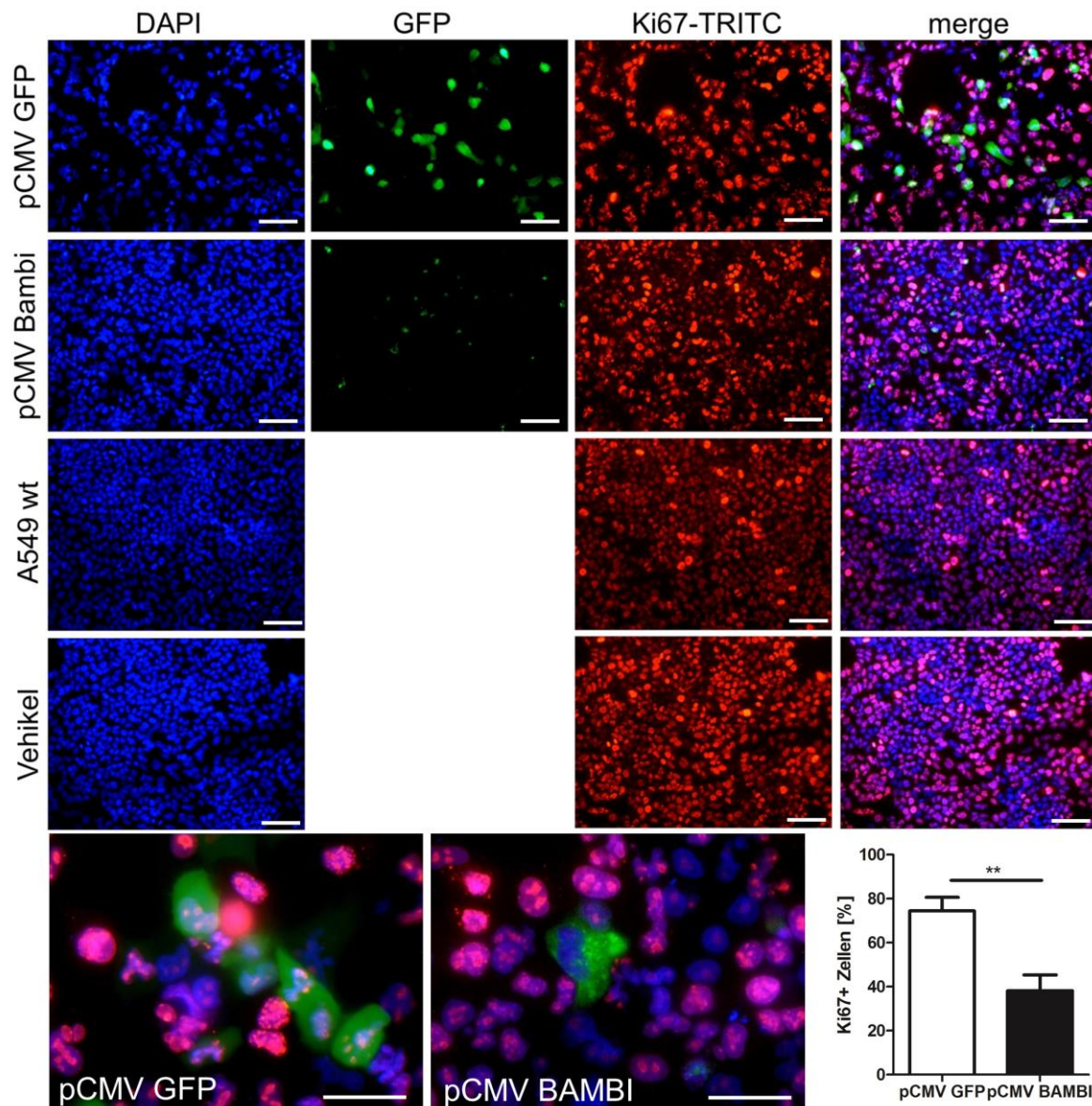


Abbildung 32: BAMBI-exprimierende A549-Zellen zeigen eine Reduktion der Ki67-Expression.

Auf Deckgläsern ausgesäte A549-Zellen wurden mit pCMV-GFP und pCMV-BAMBI Plasmiden transient transfiziert. Nach 48 h Kultur erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Ki67 um die Proliferation zu untersuchen. Die positiv-transfizierten Zellen sind im GFP-Kanal in grün dargestellt. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und Ki67 mit TRITC-konjugierten Sekundärantikörpern detektiert. Im Rahmen einer bildanalytischen Auswertung mit ImageJ wurden von jedem Experiment für die transfizierten Zellen jeweils 2 Wells ausgewertet und je Well vier Bilder bei 100x Vergrößerung aufgenommen. Die DAPI+/GFP+-Zellen wurden dann auf die Expression von Ki67 untersucht und ausgezählt. Dargestellt im Balkendiagramm ist der Anteil der Ki67+-Zellen unter den DAPI+/GFP+-Zellen in Abhängigkeit von dem verwendeten Plasmid als Mittelwert von 4 biologischen Replikaten. Eine statistische Prüfung erfolgt mittels zweiseitigem T-Test bei Annahme eines Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ (*) und $p \leq 0,005$ (**). Aufnahmen bei 100x bzw. 400x mit Maßstabsbalken = 100 μm .

Expression von BAMBI in A549-Zellen induziert Apoptose

Zusätzlich zur Bestimmung des Einflusses der erzwungenen Expression von BAMBI in A549-Zellen auf die Proliferation wurde analysiert ob in diesen Zellen auch Apoptose ausgelöst wird. Transient transfizierte Zellen wurden hierzu auf die Verschiebung von Phosphatidylserin von der Membraninnenseite auf die Außenseite mittels Annexin-V Assay im Durchflußzytometer untersucht. Um Zellen, die im Prozess der Apoptose sind, von denen zu differenzieren die bereits tot oder nekrotisch sind, wurde ein *gate* auf die 7-AAD⁻/GFP⁺ Zellen gesetzt. Im Weiteren wurden daher nur die Zellen in Betracht gezogen, die einzig Annexin-V und kein 7-AAD Signal aufwiesen (Abbildung 33A).

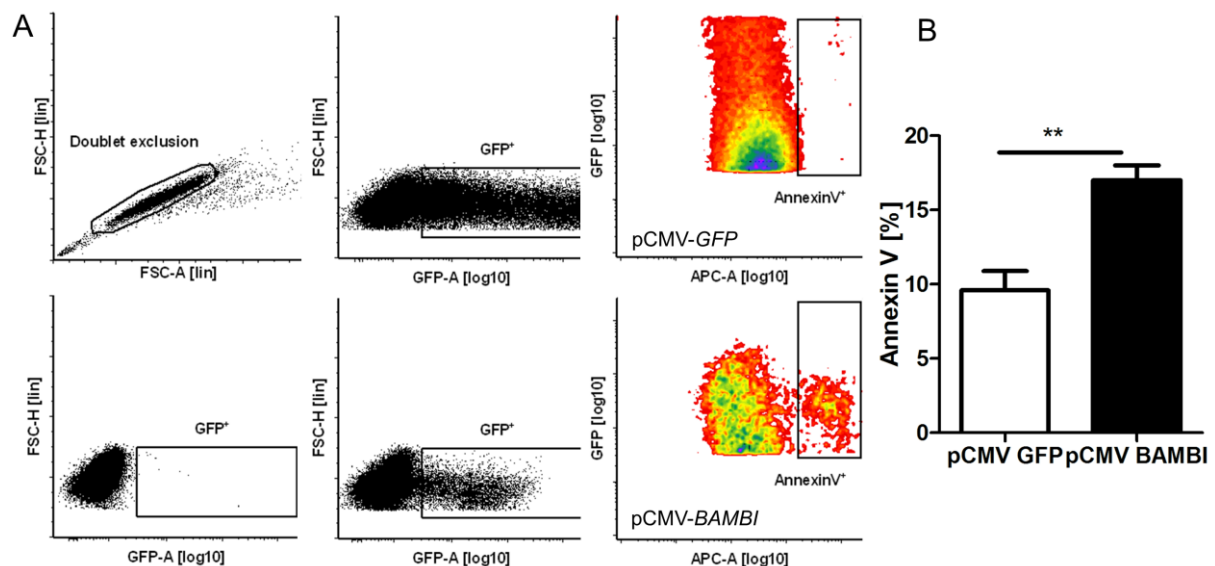


Abbildung 33: Die Expression von BAMBI in A549-Zellen führt zu Apoptose. A549-Zellen wurden mit pCMV-GFP und pCMV-BAMBI Plasmiden transient transfiziert um den Einfluss der erzwungenen Expression von Bambi auf Apoptose zu untersuchen. Hierfür wurden die transfizierten Zellen von den Kulturgefäßen abgelöst und die Apoptose mittels Annexin-V APC am Durchflußzytometer nachgewiesen (A). Für die Auswertung wurde auf die GFP-exprimierenden Einzelzellen ein *gate* gesetzt und unter diesen die GFP⁺/7-AAD⁻/Annexin-V⁺ bestimmt. Um die Zellen die im Prozess der Apoptose sind von denen zu unterscheiden die bereits tot sind wurden nur die 7-AAD⁺ negativen Zellen analysiert. (B) Statistische Auswertung von 5 biologischen Replikaten mittels zweiseitigem T-Test bei Annahme eines Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ (*) und $p \leq 0,005$ (**).

Im direkten Vergleich der Plasmidkontrolle mit den Zellen die BAMBI exprimieren, zeigt sich ein signifikant höherer Anteil von apoptotischen Zellen durch die Expression von BAMBI (Abbildung 33B).

Retrovirale Expression von BAMBI in NSCLC-Zellen beeinträchtigt die Proliferation

Um die eigenen Daten der transienten Transfektion zu überprüfen, wurden im Rahmen eines DZL-Kooperationsprojektes mit dem DKFZ in Heidelberg die Versuche mit retroviraler Transfektion wiederholt. Hierfür wurden Konstrukte

eingesetzt bei denen sich die Expression von *BAMBI* oder GFP mittels Doxycyclin induzieren lässt.

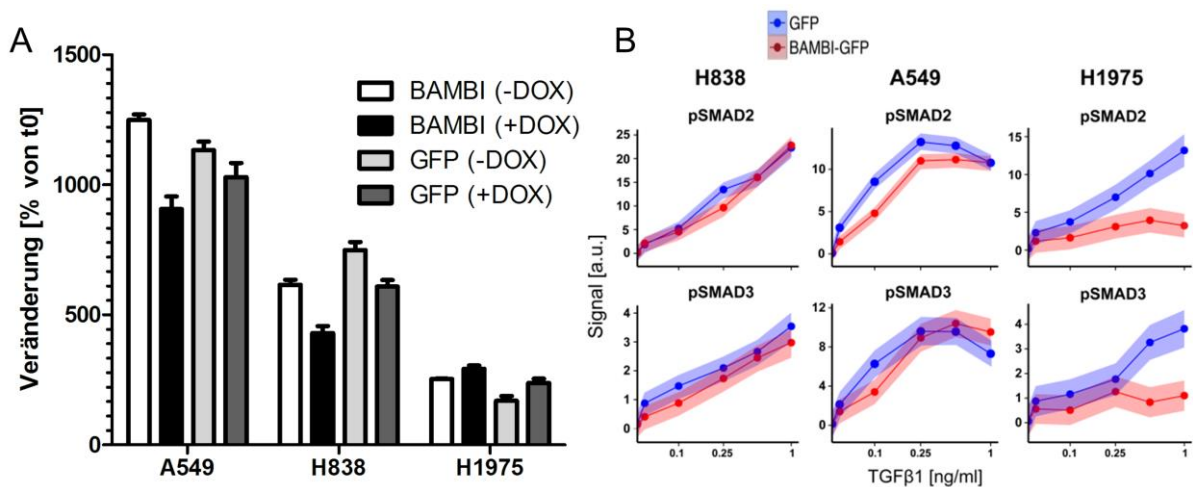


Abbildung 34: Einfluss der retroviralen Transfektion von *BAMBI* mit Doxycyclin-induzierbaren Konstrukten auf Proliferation (A) und SMAD-Phosphorylierung (B). In einem Pilot-Experiment mit verschiedenen, transfizierten NSCLC-Zelllinien wurde die Proliferation mittels Cell Titer Blue Assay nach 48 h bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als die Veränderung (Mittelwert +/- Standardabweichung) in Prozent vom Ausgangswert zu t=0 h. (B) Der Einfluss der induzierten Überexpression von *BAMBI* auf die Phosphorylierung in H838, A549 und H1975-Zellen wurde mittels Western Blots und anschließender Densitometrie von 3 Replikaten am DKFZ Heidelberg bestimmt. Gezeigt sind hierfür die Konfidenzintervalle der Experimente.

Die Nutzung nichtinduzierbarer Konstrukte führte im Fall des *BAMBI*-Inserts zu einem Absterben der Zellen bevor Experimente durchgeführt werden konnten. Erste Ergebnisse mit induzierbaren Konstrukten zeigten eine verminderte Proliferation der *BAMBI*-Zellen (Abbildung 34A) im Vergleich zu den GFP-Kontroll-Zellen. Sowohl A549, als auch H838-Zellen, die mit *BAMBI*-Konstrukten transfiziert wurden, zeigen eine verminderte Proliferation nach Induktion mit Doxycyclin. Der beobachtete Effekt äußert sich hierbei am deutlichsten in den H838-Zellen. Bei den jeweiligen GFP-Kontroll-Zellen ist der Effekt in beiden Zelllinien geringer. In H1975-Zellen, die eine aktivierende EGFR-Mutation aufweisen, war kein offensichtlicher Unterschied sowohl zwischen den Konstrukten, als auch nach Doxycyclingabe zu beobachten.

BAMBI verhindert eine Aktivierung der Signalkaskade und inhibiert TGFβ

Als TGFβ-Pseudorezeptor sollte eine verstärkte Expression von *BAMBI* einen Effekt auf die Phosphorylierung der Signalwegsmediatoren SMAD2 und -3 haben. Mittels Western-Blots wurde in den Lysaten von doxycyclininduzierten NSCLC-Zellen die Menge an pSMAD2 und pSMAD3 bestimmt in Abhängigkeit einer ansteigenden Konzentration von TGFβ1 (Abbildung 34B). Eine verstärkte Expression von *BAMBI* führte in beiden Fällen (pSMAD2 und pSMAD3) zu einer reduzierten

Phosphorylierung der Signalwegsmediatoren in A549- und H1975-Zellen, während in H838-Zellen kein deutlicher Unterschied zu erkennen war.

3.2.6. Anzeichen für EMT in Lungenkrebsgeweben

Es wurde sowohl mittels transienter Transfektion und Plasmiden als auch stabiler Transfektion durch Retroviren gezeigt, dass BAMBI einen inhibierenden Einfluss auf TGF β -abhängige Effekte hat. Der TGF β -Signalweg gilt als einer der zentralen, EMT-steuernden Signalwege (Kasai et al. 2005; Iwatsuki et al. 2010). Daher wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob sich EMT-relevante Gensignaturen in den Transkriptomen der Lungenkrebsgewebe im Vergleich zu den dazugehörigen Lungengeweben finden lassen. Hierfür wurde erneut eine *a priori* erstellte Liste an EMT-relevanten Genen auf differenzielle Expression zwischen tumorfreier Lunge und Lungenkrebs untersucht (Abbildung 35).

EMT in BAMBI negativen Lungenkrebsgeweben?

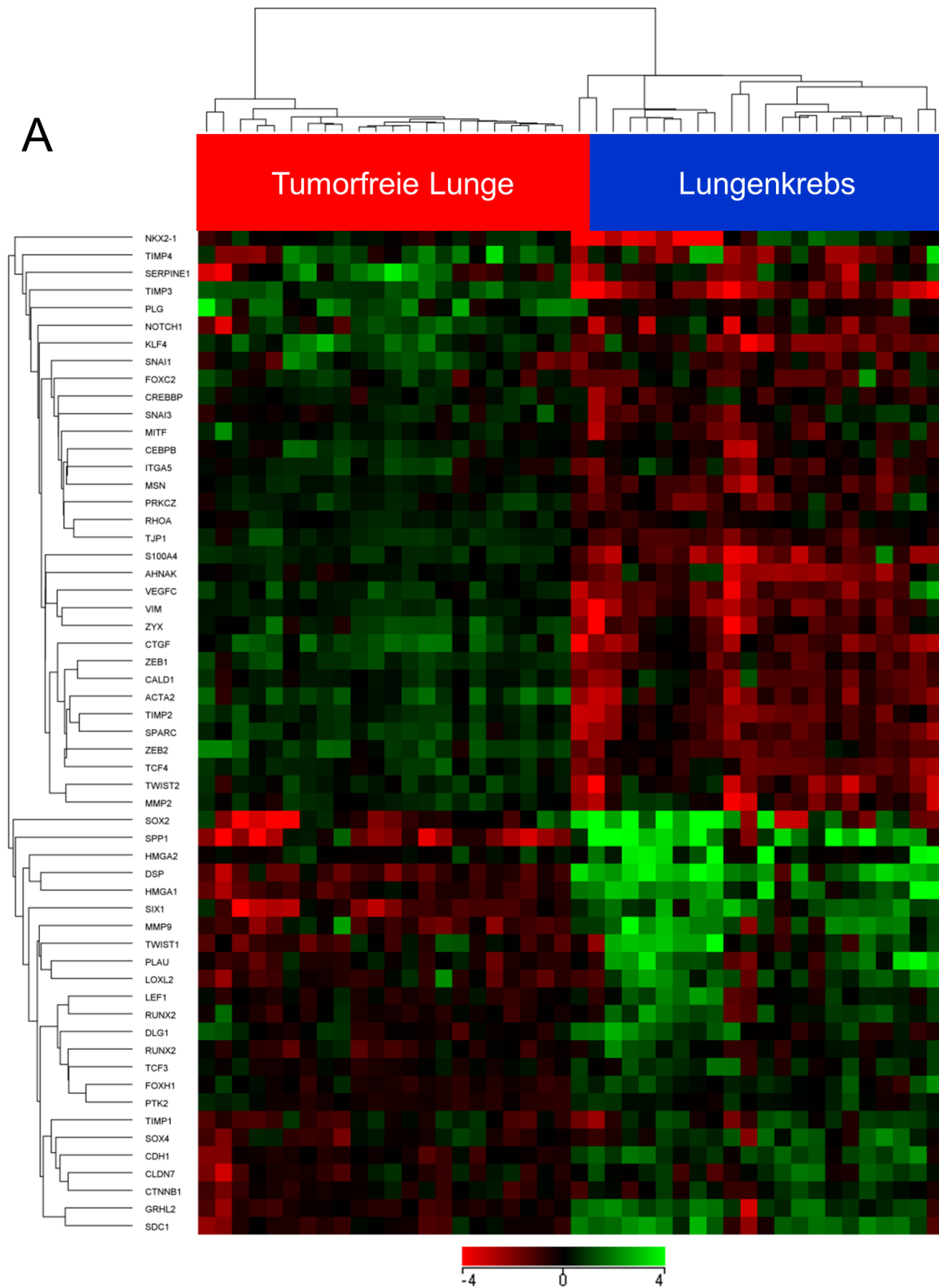


Abbildung 35A →b.w.

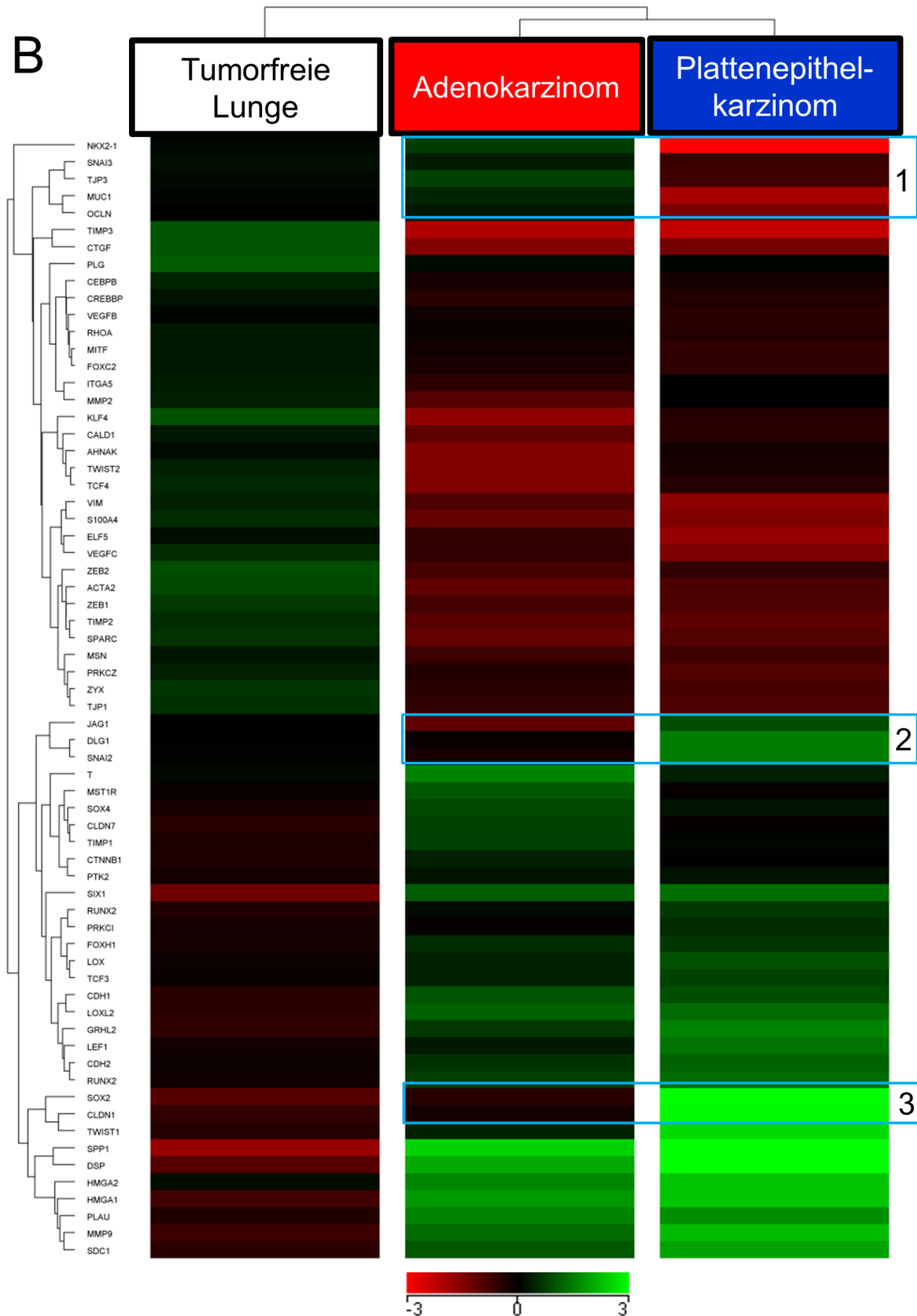


Abbildung 35: Expression signifikant regulierter, EMT-assoziierte Gene im Lungenkrebs. Eine differentielle Expression von EMT-assoziierten Genen aus einer *a priori* erstellten Liste wurde zwischen tumorfreier Lunge (N=22) und Lungenkrebs (N=22) mittels T-Test für gepaarte Beobachtungen (A) untersucht. Die Expression EMT-relevanter Gene zwischen tumorfreier Lunge (N=22), Adenokarzinom (N=10) und Plattenepithelkarzinom (N=8) wurde mittels One-way ANOVA (B) untersucht. In beiden Fällen erfolgte ein Benjamini-Hochberg *post hoc* Test für multiple Vergleiche sowie ein hierarchisches Clustering der Ergebnisse und Darstellung als *Heat-Map*. Das Signifikanzniveau betrug jeweils $p \leq 0,05$.

Unter den im Lungenkrebs stärker exprimierten Genen waren klassische „Master“-EMT Faktoren zu finden wie *HMGA1/2* (Pegoraro et al. 2013; Morishita et al. 2013), *TWIST2* (Sánchez-Tilló et al. 2012), *SIX1* (Ono et al. 2012a), *SOX4* (Tiwari et al. 2013), *RUNX2* (Niu et al. 2012), *LEF1* (Zirkel et al. 2013) oder *TCF3/E47* (Lee et al. 2011). Eine erwartete, verminderte Expression vom epithelialen Marker E-Cadherin/CDH1 wurde jedoch nicht beobachtet. Ebenso wurde keine verstärkte Expression von *SNAI1*, *SNAI2* (Lee et al. 2011), *ZEB1*, *ZEB2* (Sánchez-Tilló et al. 2012), Vimentin oder *ACTA2* vorgefunden, welche als mesenchymale Marker gelten. Auf Ebene der Metalloproteinasen sowie ihrer Inhibitoren (TIMP), war eine deutliche Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Lungenkrebs und den tumorfreien Geweben zu erkennen: *MMP9* wurde in den Tumoren induziert und *TIMP2-4* herunter reguliert, was auf einen invasiven Phänotyp schließen lässt. Insgesamt bietet sich ein gemischtes Bild der differentiellen Expression von EMT-Markern im Lungenkrebs (Abbildung 35A).

Bei Betrachtung der häufigsten Karzinome des untersuchten Kollektivs (Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom) miteinander und den tumorfreien Kontrollgeweben (Abbildung 35B), ist eine weitestgehende Homogenität zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinom zu erkennen. Es werden, wie im vorigen Vergleich von tumorfreier Lunge und Lungenkrebs, bekannte EMT-Marker sowohl aufreguliert als auch reprimiert (*SOX4*, *SIX1*, *LOX*, *TCF3*, *LEF1*, *CDH2*, *TWIST1*, *HMGA1/2*). Nur wenige Gene der Liste sind differentiell zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinom reguliert. In diesem Fall handelt es sich um eine Repression von epithelialen Markern wie *MUC1* (Kalluri & Weinberg 2009), *OCLN* (Ikenouchi et al. 2003), *TJP3* und *NKX2-1* (Saito et al. 2009) die verstärkt im Plattenepithelkarzinom stattfindet (Abbildung 35B Box 1). Weiterhin werden im Plattenepithelkarzinom mehr EMT-fördernde Faktoren wie *JAG1*, *SNAI2*, *DLG1* (Vieira et al. 2008) (Abbildung 35B Box2) oder *SOX2* (Abbildung 35B Box 3) exprimiert.

Expression von BAMBI in EGFR-mutierten Lungentumoren

Im Großteil der untersuchten Patientengewebe fand sich keinerlei Expression von BAMBI. Einzig in 2/157 Fällen lag eine positive Färbung mittels Immunhistochemie vor. Einer der beiden Fälle wies eine EGFR-Mutation auf. Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurde in einem kleinen Kollektiv von EGFR-mutierten und EGFR-Wt Fällen die Expression von BAMBI auf Proteinebene untersucht.

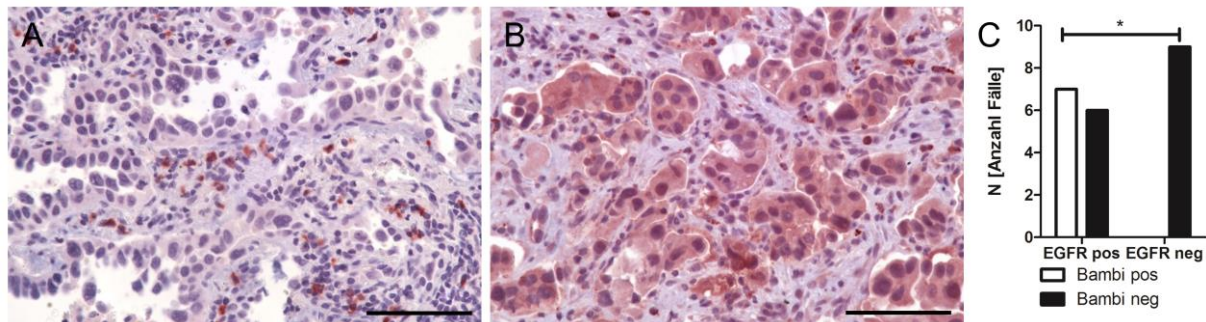


Abbildung 36: BAMBI wird in 50% der EGFR-mutierten Lungentumoren exprimiert. Formalinfixierte, paraffineingebettete Lungenkrebsgewebe aus dem diagnostischen Routinebetrieb wurden mittels Immunhistochemie auf die Expression von Bambi (anti-BAMBI polyklonal) untersucht. In EGFR-Wildtyp-Tumoren (A) wurde keine Expression von BAMBI im Tumorgewebe beobachtet (N=8). EGFR-mutierte Tumore, wie am Beispiel einer Exon 19 Deletion (B, L747-T751) gezeigt, wiesen in 50% der Fälle (6/12 Fällen) Signale für BAMBI im Tumorgewebe auf. Eine Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mit dem Exakten-Fischer Test bei Annahme eines Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ (*). Alle Aufnahmen bei 400x Vergrößerung mit Maßstabsbalken = 100 μm .

In keinem der EGFR-Wt Fälle wurde eine Expression von BAMBI in den Tumorzellen beobachtet. Einzig im Interstitium zeigten sich BAMBI-exprimierende Zellen in Form von entzündlichem Infiltrat (Abbildung 36A). Im Gegensatz hierzu fand sich in 50% der analysierten, EGFR-mutierten Fälle eine Positivität für BAMBI (Abbildung 36B). Das Signal war in diesen Fällen weder granulär/vesikulär noch membranös und zeigte sich eher homogen zytoplasmatisch. Eine statistische Überprüfung der Ergebnisse ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den EGFR-Wt und EGFR-mutierten Lungentumoren für die Expression von BAMBI (Abbildung 36C)

4. Diskussion

4.1. Der TGF β -Signalweg und BAMBI: Fibrosierung durch EMT?

4.1.1. Differenzielle Expression der Signalwegsmediatoren bei IPF, Emphysem und COPD-freier Lunge

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen Mediatoren des TGF β -Signalwegs bei nichtneoplastischen Lungenerkrankungen am Beispiel von IPF und Emphysem zellulär lokalisiert und ihre Frequenz sowie Expressionsstärke erfasst. Hierbei stellte sich heraus, dass es deutliche Unterschiede sowohl zwischen den beiden Erkrankungen, als auch jeweils im Vergleich zu COPD-freier Lunge gab. Die Unterschiede betrafen am stärksten die Alveolarmakrophagen sowie die AECII.

IPF und Emphysem unterscheiden sich in Signalwegsaktivität und Expression

Während in den IPF-Geweben die AECII eine stetige Expression von TGF β sowie Phosphorylierung von SMAD3 aufwiesen, war das Bild in den Emphysemen genau umgekehrt: es wurde nahezu kein TGF β in den AECII exprimiert sowie keine nennenswerte pSMAD3-Expression nachgewiesen. Dies zeigt deutliche Unterschiede der TGF β Signalkaskade bei den beiden Erkrankungen: eine Aktivierung in der IPF steht im Gegensatz zur Deaktivierung in den Emphysemen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von deutlicher TGF β -Expression in AEC von IPF-Patienten (Khalil et al. 1996; Kelly et al. 2006) sowie in den AECII (Kelly et al. 2006) von IPF-Patienten überein. Im Gegensatz hierzu steht eine reduzierte Phosphorylierung von SMAD2 in den AEC von Patienten mit Emphysemen (Leppäranta et al. 2009), die auch im eigenen Kollektiv beobachtet wurde. Eine verringerte Expression von Genen, die in die Bereiche ECM-Produktion, Fokale Adhäsionen, VEGF und TGF β fallen sowie die Tatsache, dass TGF β RI und –II in Emphysemen herunter-reguliert sind (Campbell et al. 2012), lassen vermuten, dass die gegensätzlichen Krankheiten ebenso auf Signalwegesebene einen deutlichen Unterschied aufweisen und durch ihn charakterisiert werden können.

Dies wird noch weiter unterstützt durch die Beobachtung, dass *Smad3*^{-/-}-Mäuse im Alterungsprozess aufgrund einer verminderten TGF β -Signalwegsaktivität und daraus resultierendem Ungleichgewicht zwischen den *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* (TIMPs) und den MMPs, zu einer Emphysembildung neigen (Morty et al. 2009).

Komplementär hierzu sind *TGF β RII*^{-/-}-Mäuse resistent gegen bleomycininduzierte Lungenfibrose (Li et al. 2011), was auf eine nötige Aktivierung des Signalwegs im Zuge der Fibrosierung schließen lässt.

Die Tatsache, dass trotz der deutlichen Expression von BAMBI in den AECII der IPF-Patienten eine Phosphorylierung von SMAD3 stattfand, verwundert in Anbetracht der Möglichkeit des Pseudorezeptors das *downstream* Signal zu inhibieren (Onichtchouk et al. 1999). Auffällig war jedoch eine deutliche granuläre Färbung des Zytoplasmas in der Immunhistochemie, obwohl es sich eigentlich um einen Transmembranrezeptor handelt. Ein direkter Zusammenhang der Expression von BAMBI durch TGF β -Induktion ist bekannt (Sekiya et al. 2004) und eine kurze mRNA *turn-over* Zeit sowie lysosomaler/autolysosomaler Abbau und Autophagie in HUVECs beschrieben (Xavier et al. 2010). Es bleibt zu vermuten, dass *BAMBI* aufgrund der starken TGF β -Expression in AECII von IPF-Geweben stetig neu transkribiert wird, weil das Protein im Zuge der Abbauprozesse eine andauernde Degradation erfährt. Unter Berücksichtigung der vorliegenden Daten lässt sich eine differenzielle Expression und Aktivität des TGF β -Signalwegs zwischen den phänotypisch unterschiedlichen Erkrankungen IPF und Emphysem festhalten.

Diese Beobachtungen in humanen Geweben spiegeln den Phänotyp der Pathophysiologie wieder und mögen in einem TIMP/MMP-Ungleichgewicht begründet liegen, wie es bereits in der Maus gezeigt wurde (Bonniaud et al. 2004; Morty et al. 2009). Die durchgeführten Färbungen am Patientenmaterial zeigten eine differenzielle Expression des TGF β -Signalwegs, die in dieser Form bisher nicht erfasst wurde. Eine aktivierte Signalkaskade bedingt eher fibrotische Prozesse, während ihre Abschaltung einen MMP-Überschuss nach sich zieht.

4.1.2. Einfluss von *Bambi*^{-/-} auf die bleomycininduzierte, murine Lungenfibrose

Um den Einfluss von *Bambi* in der IPF *in vivo* zu untersuchen, wurde vor Ort erfolgreich das Bleomycinmodell der Lungenfibrose etabliert. Die Induktion von Lungenfibrose mittels Bleomycin gilt als ein akzeptiertes Modell in der Lungenforschung (Mouratis & Aidinis 2011). Aufgrund seiner Fähigkeit TGF β zu binden (Onichtchouk et al. 1999) wurde vermutet, dass ein Knockout von *Bambi* eine größere Menge an ungebundenem TGF β bedingen könnte und somit für eine Verstärkung des Fibrosierungsprozesses sorgen könnte, da TGF β als eines der zentralen profibrogenen Moleküle gilt (Broekelmann et al. 1991).

Erfolgreiche Etablierung des Bleomycin-Modells

Der beobachtete Gewichtsverlust deckt sich mit den Angaben von Oury et al. (Oury et al. 2001), die in Balb/c-Mäusen mit 20% um Tag 14 einen vergleichbaren Gewichtsverlust beobachtet haben, aber generell als resistenter als andere Mausstämme im Bleomycin-Modell gelten (Phan & Kunkel 1992). Die applizierten Dosen von Bleomycin mit erst 3 U/kg und dann 2 U/kg zeigten für den ersten Versuch eine stärkere Mortalität für *Bambi*^{-/-}-Mäuse, die jedoch, vermutlich aufgrund der geringen Gruppengröße, nicht signifikant war. Generell wurde bei diesem Protokoll eine Mortalität beobachtet, die vergleichbar ist mit der kürzlich erschienen Studie von Peng et al. (Peng et al. 2013). Gleiches gilt sowohl für die Aufarbeitung der BAL als auch die beobachteten Histo-Scores. Allgemein kann man sagen, dass erfolgreich vor Ort das Bleomycinmodell der Lungenfibrose etabliert wurde, mit den typischen Eigenschaften wie erhöhter TGF β -Konzentration in der BALF (Khalil et al. 2001; Moeller et al. 2008), dem histopathologischen Bild (Izbicki et al. 2002), Zusammensetzung der BALF (Izbicki et al. 2002), sowie Anstieg des Histo-Scores nach Ashcroft (Peng et al. 2013).

Obwohl ein beliebtes Modell, hat die Induktion mit Bleomycin auch Nachteile: Es gilt nach 3-4 Wochen als selbstlimitierend mit einer möglichen Resorption der Fibrosierung (Chung et al. 2003). Auch fehlt eine AECII-Hyperplasie, die eine der Haupteigenschaften der IPF in Patienten ist (Moore & Hogaboam 2008). Eine persistierende Fibrosierung wurde bisher besser durch ein Protokoll mit mehreren Gaben von Bleomycin über einen langen Zeitraum (Degryse et al. 2010) erreicht. In diesem Fall lässt sich auch eine AECII-Hyperplasie feststellen. Da in den IPF-Patienten eine starke Expression von BAMBI in AECII perinukleär bzw. zytosplasmatisch beobachtet wurde, könnte in einem Bleomycinmodell mit AECII-Hyperplasie der KO evtl. einen deutlicheren Effekt zeigen. Die Etablierung dieses Bleomycinprotokolls, das sich über 3-4 Monate erstreckt ist für zukünftige Experimente vorgesehen. Ebenso würde ein Versuch Sinn machen, in dem eine so geringe Gabe Bleomycin appliziert wird, dass in den Wt-Tieren keine Fibrosierung zu Tage tritt und diese dann in den KO-Tieren untersucht würde.

Bambi^{-/-} bedingt höhere TGFβ Spiegel sowie verstärkte Col1A1 Expression ex vivo

Da die durchgeführten Arbeiten in dem In-vivo-Versuch rein histologisch an FFPE-Material erfolgten, wurden entnommene Mäuselungen *ex vivo* mit TGFβ sowie dem TGFβRI-Inhibitor SB431542 stimuliert, um Einflüsse auf der Genexpressionsebene zu untersuchen. Im direkten Vergleich zwischen Wt und KO zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Kollagen 1A1 Genexpression in den KO-Tieren. Die Expression von Kollagen I wurde bereits in Lungen von IPF-Patienten beobachtet (Limper et al. 1991; Konishi et al. 2009). In diesem Fall lässt es auf eine TGFβ-abhängige, profibrogene Induktion schließen. Ebenso wurde in Gewebekulturüberständen der KO-Tiere eine höhere Konzentration von TGFβ gemessen als in den der Wt-Tiere, was durch die Fähigkeit von BAMBI, TGFβ zu binden (Onichtchouk et al. 1999) erklärbar ist. In diesem Fall würde die Abwesenheit des Pseudorezeptors die erhöhte Menge an gemessenen TGFβ begründen.

BAMBI könnte in der Initialphase der Fibrosierung eine inhibierende Rolle spielen

Da es sich bei den Ex-vivo-Versuchen um sehr kurze Zeiträume handelt, lässt sich vermuten, dass BAMBI in der Initialphase der Fibrosierungsreaktion die Funktion haben könnte, TGFβ nach Verletzung/Stimulus zu binden und damit die Signalwegsaktivierung zu verhindern. Warum dann in den Bleomycin-Tieren rein morphologisch kein Unterschied gesehen wurde, ist mit diesem Versuch noch nicht abschließend zu klären. Hierzu sollte man in einer Erweiterung des Protokolls Gewebe zu Genexpressionsstudien gewinnen und entsprechend aufarbeiten. Es ist durchaus vorstellbar, dass in den KO-Tieren eine verstärkte Expression bzw. Phosphorylierung der SMAD-Moleküle anzutreffen ist. Wenn man *Smad3^{-/-}*-Mäuse altern lässt, so entwickeln sie Emphyseme aufgrund der fehlenden regulatorischen Funktion des TGFβ-Signalwegs, der das Gleichgewicht von MMPs und TIMPs reguliert (Bonniaud et al. 2004). Generell gibt es bisher noch keine Daten für den *Bambi*-KO in Bezug auf natürliche Todesursachen oder altersbedingte Erkrankungen/Phänotypen. Vorstellbar wäre, dass diese Tiere im Gegensatz zu den *Smad3^{-/-}*-Mäusen aufgrund stetig erhöhter TGFβ-Spiegel und damit einhergehender Signalwegsaktivierung, eine altersbedingte Fibrosierung aufweisen, wie in den humanen Geweben beobachtet wurde. Als Kontrolle hierfür würde sich eine Kreuzung der beiden Mausstämmen anbieten, sofern diese nicht letal wäre. Ein KO von *Bambi* zeigte keinen Unterschied in der Schwere und dem histomorphologischen

Bild der Fibrosierung in dem verwendeten Bleomycinmodell. Generell erwies sich die Etablierung des Protokolls mit den erwarteten Eigenschaften als erfolgreich. Auf genregulatorischer Ebene wurde eine signifikant verstärkte Expression von *Col1A1* in den KO-Tieren beobachtet, was eine Rolle von *Bambi*, zumindestens in der Initialphase, der Fibrose andeutet. Dies geht einher mit erhöhten TGF β -Konzentrationen in unstimulierten Geweben der KO-Tiere. Eine Adaptation des Bleomycinmodells ist geplant, um das Bild im humanen System besser zu simulieren. Dies könnte eventuell auch Rückschlüsse auf den beobachteten Phänotyp der granulären/zytoplasmatischen Lokalisierung des BAMBI-Signals in der humanen IPF zulassen.

4.1.3. AECII zeigen EMT-Eigenschaften und produzieren TGF β -abhängig Kollagen

Hinweise auf EMT als Pathomechanismus in der IPF

Auf die Arbeiten von Kasai (Kasai et al. 2005) aufbauend, wurde bald gezeigt, dass EMT in A549 und immortalisierten Bronchialepithelzellen SMAD-abhängig ist (Câmara & Jarai 2010) sowie das AECII von Mäusen unter Bleomycin-Gabe *in vivo* (Kim et al. 2006) und *in vitro* (Alipio et al. 2011) EMT vollziehen. In Gewebeproben von Patienten mit IPF wurden mittels Immunfluoreszenz (Yamada et al. 2008) oder immunhistochemischen Doppelfärbungen (Harada et al. 2010) Versuche unternommen in AECII mesenchymale Marker sowie Kollagen darzustellen. Hierbei zeigten sich jedoch gegenteilige Aussagen der Autoren was die Expression von EMT-Markern im IPF-Gewebe angeht. Die negativen Ergebnisse von Yamada et al. sind kritisch zu sehen, da diese auf Immunfluoreszenzanalysen aufbauen, die im humanen, paraffineingebetteten Lungengewebe aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz des Lungengewebes als eher fragwürdig einzuschätzen sind. Doppelfärbungen mittels Immunhistochemie zeigten, dass epitheliale Zellen im Gebiet der Fibroblastenfoki Vimentin exprimieren können (Harada et al. 2010). Weiterhin wurde in IPF-Geweben gezeigt, dass sowohl Kollagen I als auch ACTA2 sowie EMT-induzierende Moleküle wie TWIST in den Fibroblastenfoki anzutreffen sind (Lomas et al. 2012). Bis dato gab es also stichhaltige Beweise, die eine Rolle der EMT in der Fibrosierung untermauern und darüber hinaus dafür, dass AECII in einer TGF β -abhängigen Rolle vermutliche Ausgangszellen dieses Prozesses sein

können. Allerdings gab es zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch keinen Beweis der dies funktionell *in vitro* in humanen Zellen oder Geweben zeigen konnte.

Humane AECII zeigen ein TGF β -abhängiges Zytoskelett-Remodelling

Um einen Brückenschlag in das humane System zu vollziehen ohne Nachteile der immortalisierten Krebszelllinien wie A549 oder Beas2B in Kauf zu nehmen, war es nötig primäre humane AECII für die Versuche zu benutzen. Vor Ort wurde erfolgreich eine AECII-Isolation mit Hilfe von Prof. Dr. Gernot Zissel (Universitätsklinikum Freiburg) etabliert und die Zellen für die weiteren Versuche genutzt, um den Einfluss von TGF β auf EMT und Fibrosierung zu untersuchen. Da das Aktin-Zytoskelett-Remodelling als eine Haupteigenschaft der EMT (Kim et al. 2007; Thiery et al. 2009; Mendez et al. 2010) gilt, wurden Versuche unternommen dieses in AECII durch TGF β -Gabe zu modulieren. Es zeigte sich, dass bereits ohne Stimulation ein deutliches Aktin-Signal in den AECII aufzufinden ist, das sich aber durch TGF β verstärken lässt. Die Spezifität der Stimulation für den TGF β -Signalweg wurde erfolgreich durch Inhibition des TGF β RI mittels SB431542 verifiziert (Inman et al. 2002). Diese so stimulierten Zellen wiesen die bereits in A549-Zellen (Kim et al. 2007) oder Beas2B-Zellen (Doerner & Zuraw 2009) beschriebenen Eigenschaften des TGF β induzierten Aktin-Zytoskeletts-Remodelling auf. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Wirkung im Bereich von 5-10 ng/ml TGF β 1 liegt und höhere Konzentrationen keinen weiteren Einfluss auf das Ergebnis haben.

Humane AECII exprimieren mesenchymale Marker

Neben dem Aktin-Zytoskelett-Remodelling gilt die verminderte Expression von epithelialen Markern wie E-Cadherin (Kolossova et al. 2011) sowie die verstärkte Expression von mesenchymalen Markern wie Vimentin (Mendez et al. 2010) als ein verlässliches Anzeichen von EMT. Mittels Immunzytochemie konnte an TGF β -stimulierten AECII nachgewiesen werden, dass die E-Cadherin Expression nicht vollkommen abgeschaltet, wohl aber reduziert wird. Simultan hierzu wird die Expression von Vimentin verstärkt. Beide Effekte sind durch Inhibition des TGF β -Signalwegs regulierbar und die TGF β -induzierte Produktion von Kollagen I sogar komplett aufhebbar. Interessanterweise ist bereits in der Mediumkontrolle eine Expression von sowohl epithelialen als auch mesenchymalen Markern zu beobachten. Dies legt den Schluss nahe, zusammen mit einer ähnlichen

Beobachtung in der Aktin-Darstellung, dass die Zellen an sich schon unter diesen Kulturbedingungen in einem pro-EMT Zustand sein können.

Humane AECII als Ursprung des Kollagens in der Lungenfibrose?!

Nachdem mittels Immunzytochemie eine gemischte Zellpopulation vorgefunden wurde, die sowohl epitheliale als auch mesenchymale Marker exprimiert und Kollagen I synthetisiert, stand der Beweis aus, dass es sich wirklich um AECII handelt. Aufgrund der hohen Reaktivität der Surfactant-Moleküle (Haller et al. 1998), die ein klassischer Marker von AECII sind, wurde TTF-1, der für die Expression von SP-A und SP-B verantwortlich ist (Bohinski et al. 1994; Bruno et al. 1995; Kolla et al. 2007), als ein verlässlicher epithelialer Marker gewählt. Als Anzeichen für einen induzierten Kollagenstoffwechsel wurde HSP47 als ein Kollagenchaperon (Iwashita et al. 2000) verwendet, das z. B. bei Patienten mit akuten IPF-Exazerbationen vorkommt (Kakugawa et al. 2013). Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz legen eine Aktivierung des Kollagenstoffwechsels nahe, der durch TGF β -Gabe verstärkt und durch TGF β RI-Inhibition vermindert wird. Dies wird durch die Sirius Red-Analysen und die intrazelluläre Anfärbung des Kollagens in den AECII auf Proteinebene weiter unterstützt. Eine verstärkte Transkription von Kollagen I ist in Lungen von IPF-Patienten anzutreffen (Limper et al. 1991; Konishi et al. 2009); doch waren diese Analysen nur an Gesamtgeweben durchgeführt, was keinen Aufschluss über den zellulären Ursprung liefert. Um die mögliche TGF β -induzierte Kollagen I Expression zu untersuchen, wurde RNA von stimulierten AECII isoliert und mittels qRT-PCR untersucht. Es konnte eine deutliche Induktion gezeigt werden. Aufgrund der Varianz zwischen den einzelnen Experimenten erwies sich dies jedoch als nicht statistisch signifikant. Weil die Menge an RNA nicht ausreichend war, um im großen Maßstab die gesamten EMT-Marker mittels qRT-PCR zu untersuchen, wurden transkriptomweite Genexpressionsanalysen durchgeführt.

TGF β führt zu einer Häufung von EMT-relevanten GO-Terms in AECII

Die unsupervidierte GO-Analyse zeigte einen maßgeblichen Anteil von Begriffen, die man den Gruppen ECM/Fibrosierung, Differenzierung/Embryogenese sowie Adhäsion/Zytoskelett zuordnen kann. Eine ähnliche Begriffssignatur wurde von Campanaro et al. (Campanaro et al. 2007) in TGF β stimulierten Nierenepithelzellen gefunden und eine Aktivierung von entwicklungspezifischen Signalwegen vermutet.

Aufbauend hierauf wurde auch eine signifikante Anreicherung von GO-Terms des Zytoskeletts und Aktin-Stoffwechsels zwischen stabil verlaufender und exazerbierender IPF gefunden (Boon et al. 2009). Eine Bedeutung von Embryogeneseprogrammen wurde seitdem von mehreren Gruppen (Selman et al. 2008; Ferndandez & Eickelberg 2012) im Fokus der IPF diskutiert. Besonders GO-Begriffe dieser Bereiche (Entwicklung/Morphogenese/Differenzierung) wurden als signifikant differenziell zwischen den Genexpressionsprofilen von IPF und Hypersensitivitätspneumonie gefunden (Selman et al. 2006). In der Studie von Selman et al. (2006) die mit Geweben durchgeführt wurde, fanden sich in großen Anteilen Begriffsgruppen, die mit Immunantwort in Verbindung zu bringen sind und vermutlich dem komplexeren System des Gewebes zu zuordnen sind. Auf Basis der unsupervidierten Analyse lässt sich also sagen, dass eine TGF β -Stimulation von humanen AECII signifikant Gene reguliert, die bestimmten GO-Begriffen zugeordnet werden können und bereits mit IPF und EMT in Verbindung gebracht wurden. Humane AECII weisen somit eine Begriffssignatur auf, die mit Fibrosierung, IPF und EMT bereits in Patientengewebe gezeigt wurde. Um diese Ergebnisse weiter zu fokussieren wurde eine *a priori* erstellte Liste an bekannten Genen verwendet, die in EMT und Fibrosierung eine Rolle spielen und diese in die Analyse einbezogen. Dies diente der gezielten Analyse von spezifischen EMT- und Fibrosierungsmarkern.

Humane AECII exprimieren EMT-Marker in einem TGF β -abhängigen Prozess

Hier fanden sich Transkriptionsfaktoren verstärkt exprimiert, die EMT induzieren wie *KLF8* (Wang et al. 2007; Zhang et al. 2013) und *SOX4* (Tiwari et al. 2013; Vervoort et al. 2013). EMT-reprimierende Transkriptionsfaktoren wie *ELF5* (Chakrabarti et al. 2012) oder *TTF1/NKX2-1* (Saito et al. 2009) waren durch TGF β in AECII reprimiert. Weiterhin erfolgte eine Verminderung von epithelialen Markern, deren Rolle in der EMT beschrieben ist, wie *MUC1* (Kalluri & Weinberg 2009) oder Occludin (Ikenouchi et al. 2003) sowie der *Tight Junction Proteine TJP1* und -3 von deren Regulation bisher nichts bekannt war. Claudin 1, ein essentielles *Tight-Junction Protein* von dem bekannt ist, dass es einen induzierenden Einfluss in der EMT als *upstream* agierender Faktor von *SNAIL* hat (Suh et al. 2013), zeigte sich ebenso aufreguliert. Interessanterweise wurde E-Cadherin nicht in AECII durch TGF β herunterreguliert. Dies wäre im Sinne einer klassischen EMT zu erwarten. Die andere Hälfte der durch TGF β in AECII positiv regulierten Gene sind größtenteils dem ECM-Stoffwechsel zu

zuordnen und kodieren für Kollagene oder andere ECM-Moleküle. Sowohl eine Expression von Kollagen 1 (Kasai et al. 2005; Willis et al. 2005; Konishi et al. 2009) als auch Kollagen 4 (Kasai et al. 2005) und Kollagen 7 (Selman et al. 2006) ist in TGF β -induzierten A549-Zellen oder den Geweben von IPF-Patienten beschrieben. Bekannte mesenchymale Marker wie *ACTA2/aSMA* (Kasai et al. 2005; Kim et al. 2006) oder N-Cadherin/*CDH2* (Kim et al., 2006, Selman et al., 2006) wurden in AECII ebenso verstärkt exprimiert wie *CTGF* als TGF β *downstream* agierender, EMT-induzierender Faktor (Jiang et al. 2013; Chang et al. 2013). Darüber hinaus wurden auch in der Kollagen-unabhängigen ECM-Synthese beteiligte Mediatoren wie die Heparan-6-O-Sulfotransferase (*H6ST1*) im eigenen Datensatz als TGF β -induziert gefunden wie Lu und Kollegen (Lu et al. 2013) erst kürzlich ebenso in der IPF beschrieben haben. Insgesamt werden eine Großzahl an bereits bekannten EMT-Markern im erwarteten Maße in AECII durch TGF β reguliert ebenso wie ECM-Moleküle, die bei Fibrosierung sowohl *in vitro* als auch im Patienten eine Rolle spielen. Weiterhin zeigen die AECII Aktin-Zytoskelett-Veränderungen die typisch für EMT-unterlaufende Zellen sind und weisen darüber hinaus eine induzierbare Kollagensynthese auf.

Humane AECII vollziehen eine Typ 2 EMT durch TGF β -Stimulation

Überraschenderweise wurde keine signifikante Regulation von *SNAIL* oder *SLUG* gefunden, die als wichtige E-Cadherin Repressoren gelten und üblicherweise als ein Hauptmerkmal der EMT angesehen werden (Cano et al. 2000; Vincent et al. 2009). Kalluri und Weinberg haben 2009 in ihrem Übersichtsartikel die EMT anhand der Expression von bestimmten epithelialen und mesenchymalen Markern in unterschiedliche Stadien unterteilt. So argumentierten sie für eine Typ 1 EMT, die in der Embryonalentwicklung eine Rolle spielt und gekennzeichnet wird durch E-Cadherin Repression, *SNAIL* und *SLUG* Expression sowie Wnt/ β -Catenin Signalwegsaktivität. Die Typ 2 EMT, die in der Wundheilung und Fibrose eine Rolle spielt, grenzten sie von dieser durch den Erhalt der E-Cadherin Expression bei gleichzeitiger Expression von *aSMA/ACTA2*, N-Cadherin und Kollagen 1 ab. Sie siedelten diese Zellen in ein intermediäres Stadium der EMT. Man kann also vermuten, dass die AECII durch TGF β -Stimulation in eine Typ 2 EMT eingehen und in die Lage versetzt werden, das für die Fibrosierung nötige Kollagen zu produzieren. Weiterhin weisen diese Zellen Eigenschaften der EMT und Fibrosierung auf, die

bisher ausschließlich in immortalisierten Krebszelllinien, Mäusen oder Patientengeweben beobachtet wurden. Besonders die Microarrayanalysen zeigen die Möglichkeit der AECII zur Transdifferenzierung unter TGF β -Einfluss in einem Umfang, der bisher nur in Gesamtgewebsanalysen gefunden wurde ohne die jeweiligen zellulären Ursprünge zu finden. Dies ist bisher damit die erste Arbeit, die diesen Prozess an isolierten und stimulierten humanen AECII zeigen konnte (Abbildung 37). Ähnliche Arbeiten wurden bisher nur im Mausmodell durchgeführt sowie in immortalisierten Zelllinien wie A549 oder Beas2B. Eine ähnliche Fragestellung wurde von Marmai et al. (Marmai et al. 2011) in von IPF isolierten AECII untersucht, jedoch erfolgte hier keine Stimulation mit TGF β um die Abhängigkeit der EMT durch diesen Faktor zu beweisen. Ebenso wurde nicht auf die Kollagensynthesemöglichkeit dieser Zellen eingegangen.

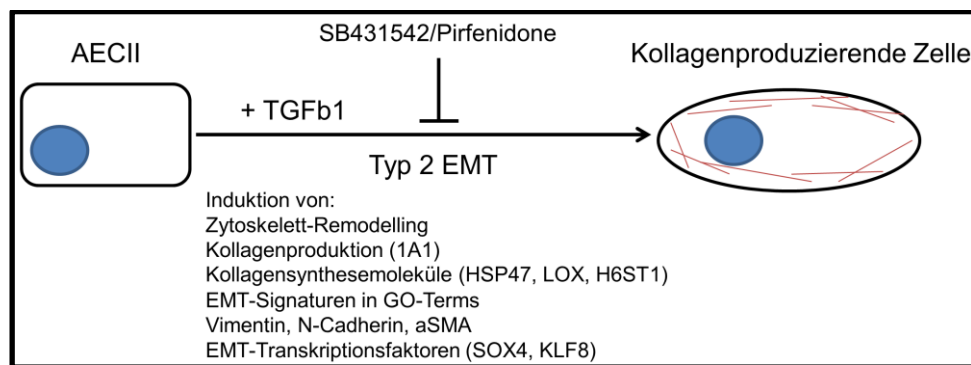


Abbildung 37: TGF β -abhängige EMT in primären, humanen AECII

Humane AECII sind ein therapierelevantes Ziel von TGF β -Modulation bei Fibrose

In der vorliegenden Arbeit wurden die AECII als die kollagenproduzierenden Zellen in der Pathogenese der IPF identifiziert sowie eine Typ 2 EMT als den möglichen Mechanismus (Abbildung 37). Die Lokalisierung dieser Vorgänge in den AECII bietet ein tieferes Verständnis der Vorgänge in der menschlichen Lunge während der Fibrosierungsreaktion und einen möglichen Ansatzpunkt für spätere Therapien. Pilotexperimente mit Pirfenidone deuten an, dass dieses direkt auf AECII *in vitro* wirkt und deren Kollagensynthese reprimiert. Bisherige In-vitro-Arbeiten haben einen Effekt von Pirfenidone auf die TGF β -induzierte Expression von Kollagen 1 und HSP47 in der Krebszelllinie A549 untersucht und eine Repression beider profibrotischen Marker festgestellt (Hisatomi et al. 2012). Die eigenen Arbeiten mit den AECII liefern unter diesem Aspekt Hinweise nicht nur auf eine Wirksamkeit Pirfenidones in AECII, sondern auch auf eine Inhibition TGF β -abhängiger

Fibrosierungsprozesse. Zusätzlich zu Pirfenidone könnte man daher weitere inhibitorische Substanzen oder neutralisierende Antikörper gegen den TGF β -Signalweg als Therapieoptionen bei der IPF propagieren bzw. versuchen diesen gezielt in AECII zu beeinflussen. Zusätzlich hierzu liefern die erhobenen Daten Anlass für die Spekulation, dass es sich bei den Myofibroblasten um transdifferenzierte AECII handeln könnte.

4.2. Der TGF β -Signalweg bei Lungenkrebs

4.2.1. Organspezifische Beteiligung des Signalwegs in der Karzinogenese?

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Expression und Regulation des TGF β -Signalwegs bei Lungenkrebs untersucht. Nachdem eigene Vorarbeiten gezeigt hatten, dass der TGF β -Pseudorezeptor BAMBI durch *Haemophilus influenzae* reguliert bzw. im Gewebe von COPD-Patienten stark exprimiert wird (Drömann et al. 2010), wurde seine Expression im Zusammenhang mit dem TGF β -Signalweg bei Lungenkrebs untersucht. Der TGF β -Signalweg gilt als zweiseitiges Schwert bei der Karzinogenese: Wirkt er am Anfang noch antiproliferativ und proapoptotisch auf die Zellen, wird diese Wirkung im Zuge der Karzinogenese oft überwunden mit der Folge einer tumorfördernden Wirkung durch lokale Immunsuppression, Invasion und Metastasierung (Massagué 2008).

Keine Expression von BAMBI im Lungenkrebs bei gleichzeitiger Signalwegsaktivierung

In den untersuchten Patientengeweben zeigte sich ein deutliches Bild für die Signalkaskade auf Proteinebene: In der Mehrzahl der Gewebe lag eine aktivierte Signalkaskade vor wie am Beispiel der Doppelpositivität für pSMAD2 und pSMAD3 ersichtlich. Darüber hinaus waren die meisten Tumore sowohl positiv für den Liganden, als auch für SMAD4 als R-Smad. Nur in 1% der Fälle konnte BAMBI nachgewiesen werden, was im Vergleich zu seiner stetigen Expression in der tumorfreien Lunge überraschte. Hinsichtlich der Signalwegsaktivierung zeigte sich kein Unterschied zwischen den häufigsten NSCLC-Subtypen Adeno- und Plattenepithelkarzinom, wohl aber ein signifikanter Unterschied zu den tumorfreien Kontrollgeweben. Ein vergleichbares Bild wurde in den untersuchten NSCLC-Zelllinien beobachtet. Interessanterweise wurde in den Karzinomen auf Proteinebene eine stetige Expression von SMAD7 im Kern beobachtet, während die Expression auf

mRNA-Ebene signifikant im Tumor vermindert war. Diese Observation ist zunächst widersprüchlich, da SMAD7 einen zytoplasmatischen Inhibitor der R-SMADs darstellt und deren Phosphorylierung verhindern kann (Zhu et al. 1999). Jedoch wurde auch von anderer Seite eine nukleäre Lokalisation beschrieben und mit einer effektiven Signalinhibition in Verbindung gebracht (Zhang et al. 2007; Hanyu et al. 2001). Man kann also vermuten, dass obwohl SMAD7 in den NSCLC-Geweben stark exprimiert wird eine effektive Inhibition des Signalwegs ausbleibt, wie anhand der Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 ersichtlich ist. Diese Vermutung stimmt mit den Ergebnissen von Huang et al. überein, die beim Cholangiokarzinom eine starke Expression beobachteten, gemeinsam mit TGF β *downstream* agierenden Molekülen (Huang et al. 2012).

Diese Ergebnisse stellen die bisher erste Studie dar, die umfassend den TGF β -Signalweg mit der Expression und Lokalisation dieser Mediatoren an humanem Material untersucht hat und gehen einher mit den Beobachtungen von hohen TGF β -Spiegeln im Serum von NSCLC-Patienten, die mit einer schlechten Prognose sowie Tumorprogression und Lymphknotenmetastasen korrelieren (Hasegawa et al. 2001). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch beim Mamma-Karzinom mit einer verstärkten Expression von TGF β an der Wachstumsfront der Tumore (Dalal et al. 1993) sowie einer Aktivierung der Signalkaskade und Korrelation mit den Metastasierungsfaktoren UPA/PAI1 (Lang et al., accepted).

Allgemein ist die Expression des Signalwegs bei Lungenkrebs nicht vollständig verstanden und manche Beobachtungen widersprüchlich. So wird im Gewebe von NSCLC-Patienten mit einer TGF β -Überexpression sowohl eine bessere (Inoue et al. 1995) als auch eine schlechtere (Takanami et al. 1994), 5-Jahres-Prognose festgestellt. Gleichzeitig wird aber wiederum ein erhöhter Serum-Spiegel mit schlechter Prognose verbunden (Hasegawa et al. 2001). Ähnliches gilt für Daten aus dem Mamma-Karzinom, wo eine chemotherapieinduzierte Erhöhung des TGF β -Spiegels im Serum mit verstärkter Metastasierung einher geht, aber durch eine TGF β -blockierende Therapie überwunden werden kann (Biswas et al. 2007). Generell gilt die antiproliferative Wirkung von TGF β sowohl zell-, als auch kontext- und dosisspezifisch. Eine geringe Menge an TGF β wurde als proliferationsfördernd angesehen und eine hohe wiederum als antiproliferativ (Moses et al. 1990). So schützte ein kurzer Stimulationsimpuls sowohl murine als auch humane

Adenokarzinomzellen vor Apoptose durch Serumdeprivation und verstärkte das metastatische Potential dieser Zellen (Vázquez et al. 2013).

Organspezifische Rolle des TGF β beim Lungenkrebs

Im Hinblick auf den TGF β -Signalweg scheint es eine organspezifische Rolle in der Karzinogenese zu geben. Während beim Kolonkarzinom häufig Mutationen im TGF β -Signalweg zu finden sind, die vor allem *TGF β RII* (Markowitz et al. 1995; Grady et al. 2006) sowie *SMAD4* (S. Jones et al. 2008) betreffen und zu einer kompletten Stilllegung der Genaktivität führen können, finden sich beim Lungenkrebs selten Mutationen für *TGF β RII* (Anumanthan et al. 2005) sowie den intrazellulären Mediatoren *SMAD2* (Uchida et al. 1996) und *SMAD4* (Nagatake et al. 1996). Es gibt also einen Unterschied im funktionalen Erhalt der Signalwegskomponenten. Im Kolonkarzinom gelten die Kernkomponenten der Signalkaskade als herunterreguliert oder durch Mutation inhibiert im Vergleich zum jeweiligen Normalgewebe. Die eigenen Daten zeigen ein gegensätzliches Bild für die Lungenkarzinome: es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen tumorfreier Lunge und Lungenkrebs bei *SMAD2*, *SMAD3* und *SMAD4* beobachtet, die als Kernkomponenten der Signalkaskade gelten (Poncelet et al. 2007). Die Kernkomponenten bleiben also, anders als beim Kolonkarzinom, erhalten und ermöglichen einen funktionierenden Signalweg.

Eine organspezifische Rolle des TGF β -Signalwegs lässt sich auch durch die Expression von *BAMBI* unterstützen. Die eigenen Daten zeigten in nahezu allen untersuchten Patientengeweben sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene keine ersichtliche oder stark verminderte Expression des TGF β -Pseudorezeptors in den Tumoren. Gleiches gilt für die untersuchten NSCLC-Zelllinien. Bei den Tumoren gilt zu beachten, dass es sich um makrodissektierte Gewebe handelt. Eventuelle entzündliche Infiltrate wie Makophagen könnten noch in Spuren vorhanden sein und die weiterhin detektierbare, aber schwache, Expression auf mRNA-Ebene erklären. Im Kolorektalen-Karzinom wiederum wurde eine starke Expression gefunden und als eines von mehreren Genen einer Signatur als Prädiktor für das metastatische Potential verwendet (Fritzmann 2009). Die Expression von *BAMBI* wurde in dieser Krebsart mit dem Wnt/ β -catenin Signalweg in Verbindung gebracht und durch diesen induziert. Dies führte zu einer Resistenz gegen den antiproliferativen Effekt von TGF β (Sekiya et al. 2004). Togo et al. argumentierten, dass eine *BAMBI*-Expression

im kolorektalen Karzinom zu einer schlechteren Prognose führt, aufgrund der BAMBI-vermittelten Resistenz gegen den antiproliferativen Effekt. Einer verstärkten Expression BAMBI im kolorektalen Karzinom steht eine verminderte Expression im Lungenkarzinom entgegen, ebenso wie die Tatsache, dass sich beide Krebsarten in der Deaktivierung von Signalwegskernkomponenten unterscheiden. Eine Spezifität des TGF β -Signalwegs für die Karzinogenese in der Lunge lässt sich weiterhin aufgrund der Abwesenheit von pulmonalen Metastasen (Togo et al. 2008; Fritzmann et al. 2009) der BAMBI-positiven Kolorektalen-Karzinome vermuten. Die BAMBI-positiven Kolorektalen Tumore streuen nicht in die Lunge. Weiterhin scheint in dieser Art von Tumoren BAMBI eher mit dem Wnt/ β -Catenin Signalweg zu kooperieren und positiv die Zellproliferation zu unterstützen (Lin et al. 2008).

Eine duale Teilung des TGF β -Signalwegs ist schon von Massagué diskutiert worden, wo ein Wegfall von Signalwegskernkomponenten typisch ist für das kolorektale Karzinom, während ein Verlust der tumorsuppressiven Eigenschaften, bei Erhalt der Kernkomponenten eher im Brustkrebs eintritt (Massagué 2008). Eigene Daten für einen stark exprimierten TGF β -Signalweg und keine Expression von BAMBI im Mamma-Karzinom unterstützen diese Ansicht (Lang et al., accepted) und legen eine Ähnlichkeit der Rolle des TGF β -Signalwegs bei Brust- und Lungenkrebs nahe. Darüber hinaus wurde ein Einfluss des TGF β -Signalwegs im Blasenkrebs gefunden (Menashe et al. 2012), sowie die verstärkte Genexpression von TGF β -abhängigen Genen wie Osteopontin/*SPP1* (Zaravinos et al. 2011) die auch in den eigenen Microarray-Daten der NSCLC beobachtet wurde. Dies geht einher mit der Abwesenheit einer Genexpression von *BAMBI* im schlechtdifferenzierten Blasenkrebs (Khin et al. 2009).

TGF/EGF-Achse als mögliche Dualtherapie bei NSCLC?

Im Fall des des kolorektalen Karzinoms (Togo et al. 2008; Fritzmann et al. 2009) kooperiert der TGF β -Signalweg mit Wnt/ β -Catenin. Die Beobachtung, dass nur in den EGFR-mutierten Patientengeweben und Zelllinien eine BAMBI-Expression vorgefunden wurde, spricht für eine Kooperation beider Signalwege; zumindestens für eine Verschiebung zugunsten des EGFR-Signalwegs bei Lungenkrebs. Eine Interaktion beider Signalwege wurde von Kang et al. (Kang et al. 2012) beobachtet, als sie Hepatozyten mit TGF β stimulierten. Das Ergebnis war eine Aktivierung des EGFR-Signalwegs sowie die Induktion von EMT. Durch Inhibition sowohl des EGFR-

Signalwegs als auch von SMAD-Molekülen wurde der Effekt nivelliert. Ein möglicher Mechanismus der Signalwegskooperation könnte über MAPK und PI3K/Akt erfolgen, die als Verbindungsglied beider Signalwege beschrieben sind (Jia & Souchelnytskyi 2011). Genau diese Synergie beider Signalwege gilt als tumorfördernd sowie EMT- und metastasierungsbegünstigend (Jia & Souchelnytskyi 2011). Weitere indirekte Anzeichen für eine Signalwegskooperation bzw. Integration wurden bei Tumoren der Kopf- und Halsregion entdeckt, wo eine EGFR-Überexpression mit MMP9-Expression korreliert, welches ein direktes, TGF β *downstream* agierendes Molekül ist (O-Charoenrat et al. 2000).

Im Fall von Brustkrebs bedingen HER2, ein Rezeptor der EGFR-Familie, und TGF β gemeinsam die Malignität der Tumore und TGF β -Gensignaturen stehen im Verdacht eine Resistenz gegen den anti-HER2 Antikörper Trastuzumab zu fördern (Wang 2011). Diese Beobachtungen sind von klinischer Relevanz und könnten zu einer verbesserten Therapie bei verschiedenen Tumorarten führen. Eine Monotherapie allein gegen EGFR mit Cetuximab führte in einem Xenograft-Mausmodell bei Tumoren der Kopf- und Halsregion zu einer verstärkten Expression von TGF β in den überlebenden Krebszellen und damit einhergehender Resistenz gegen immunzellvermittelte Zytotoxizität. Eine Dualtherapie mit inhibierenden/blockierenden Antikörpern gegen EGFR und TGF β hingegen verhinderte die Expansion von resistenten Tumorzellen und begünstigte eine Regression (Bedi et al. 2012). Obwohl dies vielversprechende In-vitro-Daten sind, gibt es noch durchaus widersprüchliche Aussagen und Raum für weitere Studien. Luwor und Kollegen (Luwor et al. 2012) favorisierten eine reduzierte TGF β -Signalwegsaktivität im Fall von überexprimierten EGFR durch Stat3 und argumentierten für ein Umgehen der ansonsten zytostatischen Effekte durch TGF β in der Anfangsphase der Tumorentstehung.

Pirfenidone: möglicher „off-label use“ bei NSCLC

Ein Vorteil einer gezielten Therapie gegen TGF β wäre die Tatsache, dass mehr Patienten davon profitieren könnten, als im Fall von EGFR, wo nur bei ca. 16% eine aktivierende und damit therapieansprechende Mutation vorliegt (Rosell et al. 2009). Bisherige Ansätze gegen TGF β richten sich gegen die Liganden oder inhibieren gezielt die Kinasedomänen der Rezeptoren (Lahn et al. 2005). Von diesen sind bisher jedoch keine Therapien gegen Lungenkrebs zugelassen. Ein neuartiger Ansatz wäre zum Beispiel Pirfenidone als *off-label use* eines, bereits für die IPF-

Behandlung, zugelassenen Medikaments, das TGF β -Effekte inhibiert (Hisatomi et al. 2012). Bisherige Therapieansätze gegen einen Signalweg allein haben sich zwar als effektiv erwiesen (Kim et al. 2008), ignorieren aber die komplexe Biologie und führen oft zu einer Resistenzentwicklung der Tumore. Daher werden kombinatorische Therapien gegen mehrere Signalwege als vielversprechende Möglichkeiten gesehen (Jia & Souchelnytskyi 2011). Aufgrund der vorliegenden Daten und der dominierenden Aktivität des TGF β -Signalwegs bei Lungenkrebs, sowie einer möglichen Kooperation mit dem EGF-Signalweg, wäre eine Dualtherapie mit Pirfenidone oder anderen TGF β -inhibierenden Molekülen gemeinsam mit einer anti-EGFR-Therapie eventuell ein sinnvoller Ansatz.

Außerdem, sollten sich die bisherigen Ergebnisse einer BAMBI-Expression in 50% der EGFR-mutierten Lungenkarzinome in einem größeren Kollektiv bewahrheiten, könnte BAMBI als ein immunhistochemischer Marker für die Diagnostik eingesetzt werden. Die bisherige Diagnose erfolgt an mikrodisezierten Tumorzellen, aus denen DNA isoliert wird und 3 verschiedene PCR-Reaktionen erfolgen, um schließlich sequenziert zu werden. Dieses Verfahren ist mit einem beträchtlichen, personellen, zeitlichen und materiellen Aufwand verbunden. Die Verwendung von BAMBI würde sich daher im Rahmen eines Screenings eignen um geeignete Kandidaten für Sequenzierungen zu ermitteln.

4.3. BAMBI als möglicher Tumorsuppressor bei Lungenkrebs

Verlust der Expression von BAMBI bei zunehmender Malignität durch epigenetische Abschaltung der Genaktivität?

Die Tatsache das BAMBI im normalen Lungengewebe sowie in den nichtneoplastischen Lungenerkrankungen stetig exprimiert wird, jedoch keine oder nur eine stark verminderte Expression bei Lungenkrebs beobachtet wurde, war überraschend. Vor allem da der Pseudorezeptor im kolorektalen Karzinom (Sekiya et al. 2004; Togo et al. 2008; Lin et al. 2008), Ovarialkarzinom (Pils et al. 2010) sowie Osteosarkom (Zhou et al. 2013) als überexprimiert gilt. Weiterhin wurde nur in nichtmetastasierenden Melanomzelllinien eine Expression von BAMBI detektiert; nicht aber in den metastasierenden (Degen et al. 1996). Interessanterweise wurde nur in den Karzinoiden eine mRNA Expression von *BAMBI* entdeckt ohne jedoch ein Protein zu detektieren. Diese Art von Lungentumoren zeichnet sich durch eine

generell gute Prognose, seltene Metastasierung und gute Resektabilität aus (Yeh & Chou 2013; Swarts et al. 2013).

Da bereits eine epigenetische Stilllegung von *BAMBI* beim Blasenkrebs beobachtet wurde (Khin et al. 2009) sowie in einem Fallbericht einer desmoiden Fibromatose (Kitazawa et al. 2005), lag der Schluss nahe, dass die Abwesenheit von *BAMBI* im Lungenkrebs epigenetisch bedingt sein könnte. In Kooperation mit dem Institut für Humangenetik (Prof. Dr. Siebert/Prof. Dr. Ammerpohl) wurden in einem großen Kollektiv (N=46) von Lungenkrebsgeweben und den tumorfreien Kontrollgeweben derselben Patienten epigenetische Untersuchungen zum Methylom der Lunge durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass eine Vielzahl an CpG-Loci im *BAMBI*-Gen der Tumore signifikant stärker methyliert sind als in der dazugehörigen tumorfreien Lungen, was die verminderte Genexpression erklären könnte.

Es lässt sich vermuten, dass die Expression von *BAMBI* im Verlauf der Tumorentstehung abgeschaltet wird, damit die Zellen sensibler für die Wirkung von TGF β werden können (siehe Abbildung 36). Eine verstärkte Empfänglichkeit gegenüber TGF β -Signalen könnte einher gehen mit der Induktion von Transdifferenzierungsprozessen wie der EMT, welche bei Brustkrebs (Shipitsin et al. 2007; Taube et al. 2010), Ösophaguskarzinom (Ohashi et al. 2010) und Lungenkrebs (Pirozzi et al. 2011) beobachtet wurden.

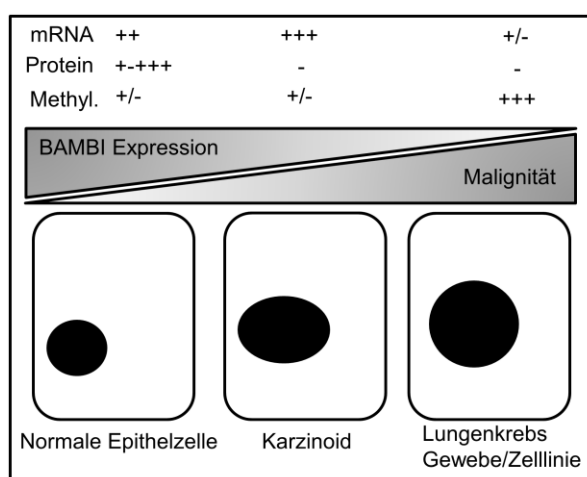


Abbildung 38: Schema der Expression von *BAMBI* in Abhängigkeit von der Malignität.

Langzeitstimulation von Brustdrüsenepithelzellen über Wochen mit TGF β führte zu einer metastabilen EMT und Resistenz gegenüber den antiproliferativen und proapoptotischen Effekten TGF β s in Abhängigkeit der PI3K/Akt-Signalkaskade (Gal

et al. 2008). Dieses wäre auch ein möglicher Mechanismus mit dem die Zellen der TGF β -induzierten Apoptose entgehen könnten. Es ist daher anzunehmen, dass solche Epithelzellen in Folge des metastabilen EMT-Zustands während der Krebsentstehung eine Resistenz gegen die tumorhemmenden Effekte von TGF β entwickeln. Dieser Zustand wird im Lungenkrebs mit Stammzeleigenschaften in Verbindung gebracht (Pirozzi et al. 2011) und ist im kolorektalen Karzinom durch gegen TGF β 1-gerichtete Peptide reversibel (Zubeldia et al. 2013). Die Beobachtungen von EMT im Krebs gehen einher mit einer Resistenz gegenüber der üblichen Chemotherapie sowie der Induktion von Krebsstammzellen (Singh & Settleman 2010; Lim et al. 2013). Dieser Prozess ist in Brustkrebszelllinien abhängig von *SNAIL* (Lim et al. 2013), dass auch im eigenen NSCLC-Kollektiv der Microarray-Analysen als signifikant aufreguliert gefunden wurde. Eine epigenetische Inhibition der Genaktivität von BAMBI könnte daher zu einer verbesserten Sensitivität der Tumorzellen führen und damit einen Selektionsvorteil für diese Zellen darstellen.

EMT in BAMBI-negativen NSCLC als Pathogenitätsmechanismus

Generell werden EMT-auslösende Transkriptionsfaktoren mit tumorbegünstigenden Eigenschaften wie Metastasierung, Angiogenese, Apoptoseresistenz oder replikativer Immortalisierung in Verbindung gebracht (Sánchez-Tilló et al. 2012). Über eine Chemotherapieresistenz hinaus gibt es auch Hinweise, dass EMT einen Einfluss auf die Resistenz gegenüber *targeted therapies* gegen EGFR hat. So wurde gezeigt, dass eine TGF β -abhängige EMT A549 Zellen resistent gegen den EGFR-Tryosinkinase-Inhibitor Gefitinib macht (Rho et al. 2009). Eine forcierte Reexpression von E-Cadherin und damit einhergehender Umkehr der EMT erhöhte wieder die Sensitivität gegenüber Gefitinib (Witta et al. 2006). Im Zuge der Tumorentstehung und des weiteren Wachstums wären die BAMBI^{-/-}-Zellen also empfänglicher für Transdifferenzierungsprozesse und damit resistenter gegen chemotherapeutische Interventionsversuche. Die eigenen Microarray-Daten legen den Schluss nahe, dass in den untersuchten Lungenkrebsgeweben EMT stattfindet oder im Zuge der Krebsentwicklung stattgefunden hat. Gemeinsam mit der anzunehmenden Kooperation von TGF β - und EGFR-Signalweg zeichnet sich hiermit ein komplexes Netzwerk ab und bietet damit neue Ansatzpunkte für gezielte Therapieversuche. Gerade der Aspekt von EMT als Mechanismus einer Resistenzentstehung könnte hierbei in Zukunft von Bedeutung sein.

Forcierte Expression von BAMBI in Lungenkrebszelllinien induziert Apoptose

Um den Effekt der Expression von BAMBI im Lungenkrebs zu untersuchen, wurde seine Expression mittels Plasmiden in immortalisierten Krebszellen erzwungen. Wie bereits schon der Versuch der Herstellung von stabiltransfizierten A549-Zellen vermuten ließ, hat eine Expression von BAMBI einen negativen Effekt auf die Krebszelllinie A549. Die so transfizierten Zellen wiesen eine geringere Proliferation auf und es wurde eine höhere Apoptoserate beobachtet. Diese Beobachtungen werden unterstützt durch am DKFZ Heidelberg (AG Klingmüller) retroviral-transfizierte Lungenkrebszelllinien. Der Versuch einer stabilen Transfektion mittels Retroviren ohne induzierbare Konstrukte scheiterte daran, dass die Zellen sich nicht expandieren ließen und vor Durchführung von Experimenten starben. Daraufhin wurden induzierbare Konstrukte verwendet, um die Zelllinien zu transfizieren. In diesen Zelllinien, bei denen man mittels Doxycyclin eine Expression von BAMBI induzieren kann, wurde auch ein negativer Einfluss auf die Zellvitalität nach Induktion von BAMBI beobachtet. Weiterhin bedingt eine Expression von BAMBI eine geringere Phosphorylierung der *downstream* agierenden SMAD2 und SMAD3-Moleküle, was auf eine erfolgreiche Deaktivierung der Signalkaskade deuten lässt und eine mögliche Rolle als EMT-Inhibitor (Abbildung 37A). Diese Erkenntnis sowie die proapoptischen und antiproliferativen Effekte auf die NSCLC-Zellen könnten einen möglichen Ansatz für Therapien bieten. Hierfür könnte sich eine Gentherapie anbieten bei der BAMBI in den Krebszellen überexprimiert wird. Solche Versuche haben sich im Fall von p53 bereits *in vitro* erfolgreich erwiesen mit einem rekombinanten, adeno-assoziierten, viralen Vektor der eine ausgesprochen gute Effizienz in NSCLC-Zellen aufwies (Rohr et al. 2003). Darüber hinaus könnte eine viralinduzierte Überexpression von BAMBI zu einer verminderten EMT in den Krebszellen führen, die wiederum einen Einfluss auf die Chemotherapie/ *targeted therapy* hat.

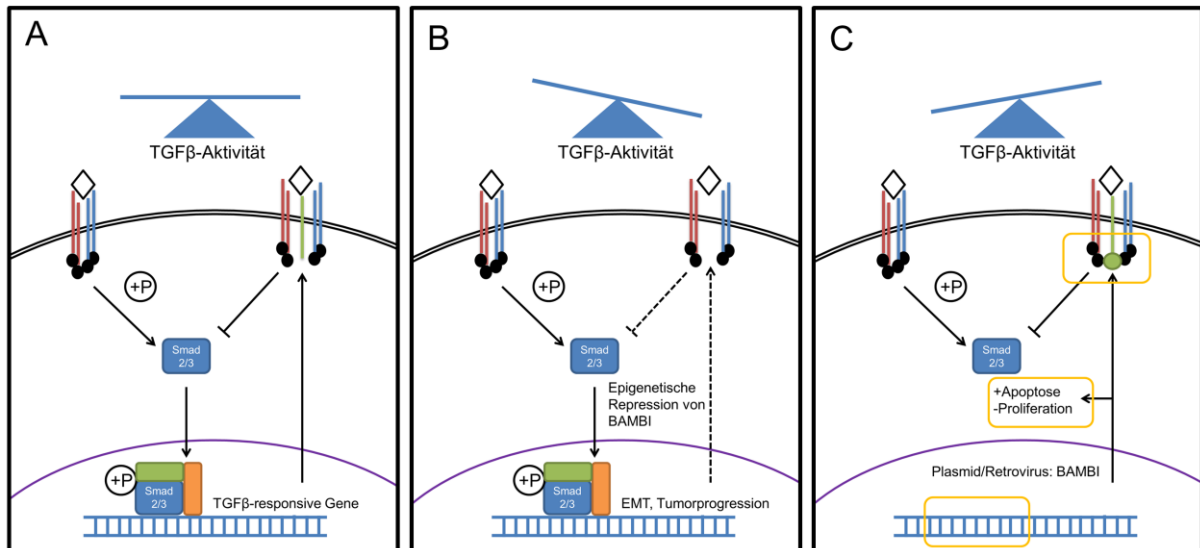


Abbildung 39: Zusammenfassendes Schema der Rolle von BAMBI im gesunden Gewebe (A), Tumor (B) und bei forcierter Expression im Krebs (C). Gelbe Boxen zeigen Ansatzpunkte für weitere Experimente.

Ausgehend davon, dass BAMBI im Normalgewebe sowohl auf Protein als auch auf mRNA-Ebene exprimiert wird (Abbildung 39A), im wenig malignen Karzinoid nur noch auf mRNA-Ebene eine Expression stattfindet und im NSCLC weder ein Proteinsignal, noch eine nennenswerte mRNA-Menge anzutreffen ist, lässt sich sagen, dass BAMBI im Zuge einer malignen Veränderung in der Lunge abgeschaltet wird. Dieser Prozess wird wahrscheinlich epigenetisch durch CpG-Hypermethylierung vermittelt (siehe Abbildung 39B). Eine Expression von BAMBI in A549-Zellen führt zu einer reduzierten Wirkung der antiproliferativen Eigenschaften von TGFβ. Darüber hinaus wirkt eine Expression von BAMBI in A549-Zellen gegen die Krebszellen indem es die Proliferation negativ beeinflusst sowie die Apoptose fördert (siehe Abbildung 39C). Dies kann weiterhin im Hinblick auf Proliferation mittels retroviraler Transfektion unabhängig repliziert werden. Der Mechanismus hierbei ist noch unbekannt, ebenso was für Auswirkungen es auf *downstream*-agierende Gene hat. Außerdem zeigen die BAMBI-überexprimierenden, retroviral-transfizierten Zellen eine verminderte Aktivierung der Signalwegsmediatoren SMAD2 und SMAD3. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass dieses eine TGFβ-abhängige EMT verhindern oder abschwächen könnte, was zu beweisen noch aussteht. Wenn seine Expression erneut forciert wird, zeigt sich ein nachteiliger Effekt für die Tumorzellen und führt zu Apoptose oder verminderter Proliferation. Genau solche Eigenschaften, vor allem eine frühe Genabschaltung, finden sich oft bei Tumorsuppressorgenen im Zuge einer Kanzerogenese (Jones & Baylin 2007). Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei *BAMBI* um einen neuen Tumorsuppressor

beim Lungenkarzinom handelt. Die Tatsache, dass sein Methylierungsstatus eine Diskriminierung zwischen Tumor und Tumor-freier Lunge erlaubt, macht BAMBI im Hinblick auf diagnostische Anwendungen interessant.

4.4. Synopsis: TGF-Signaling bei Fibrose und Krebs

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der TGF β -Signalweg bei Lungenfibrose und Lungenkrebs eine zentrale Rolle spielt. Bei beiden Krankheiten ist eine aktivierte Signalkaskade zu beobachten: humane AECII vollziehen eine TGF β -abhängige Typ 2 EMT und erlangen so die Fähigkeit zur Kollagensynthese. Parallel hierzu wurden in Tumorgeweben EMT-Gensignaturen entdeckt und gezeigt, dass der Pseudorezeptor BAMBI einen negativen Einfluss auf die Krebszellvitalität hat. Mit seiner Fähigkeit den Signalweg zu inhibieren und damit EMT zu beeinflussen, ist der in der Lunge bislang kaum untersuchte Pseudorezeptor BAMBI relevant für die Pathophysiologie beider Erkrankungen.

5. Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Primärzellkultur stellt ein effektives System zur Testung antifibrotischer Wirkstoffe im humanen System dar. Ein mechanistischer Zusammenhang von TGF β -induzierter EMT in AECII könnte ein neues Ziel für die Entwicklung gezielter Therapeutika darstellen. Die Hypothese, dass BAMBI ein negativer Regulator der EMT ist, wird in murinen AECII-*Bambi*^{-/-} Zellen sowie in retroviral-transfizierten NSCLC-Zelllinien in Kooperation mit der AG Klingmüller am DKFZ untersucht werden.

Der genaue Weg wie die Zellen durch die Überexpression von BAMBI sterben, steht momentan im Fokus intensiver Bemühungen im Rahmen eines DZL-Projektes. Hierfür werden in den nächsten Schritten Transkriptome der induzierbaren, retroviral-transfizierten Zellen durchgeführt, um die Veränderung der Genexpression zu untersuchen. Außerdem wird untersucht zu welchem Zeitpunkt einer Entartung die Expression von *BAMBI* abgeschaltet wird. Hierfür werden BAMBI-positive Präneoplasien (wie z. Bsp. AECII-Hyperplasien) im Gewebe mittels *Laser-Capture-Micro-Dissection* extrahiert und ihre Genexpression sowie ihr Methylohm untersucht. Außerdem ist geplant, weitere klassische Apoptosemarker, sowie den Einfluss von BAMBI auf Invasion und als ein möglicher EMT-Inhibitor im Bezug auf Chemotherapieresistenz zu untersuchen.

Von besonderem Interesse ist die Hypothese, dass eine Expression von BAMBI Hinweise auf den EGFR-Mutationsstatus in den Patientengeweben liefern könnte. Die vorläufigen Daten legen nahe, dass eine BAMBI-Expression auf Proteinebene in 50% der EGFR-mutierten Lungenkrebsgeweben zu finden ist. Dieser diagnostisch-relevante Aspekt wird in einem größeren Kollektiv untersucht werden und könnte bei Validierung ein effektiveres Screening in der Routine-Diagnostik zulassen. Von besonderem Interesse in weiteren Untersuchungen wird die Aufklärung möglicher Signalwegsinteraktionen im Hinblick auf Therapiemöglichkeiten sein. Hierfür werden unterschiedliche TGF β - und EGFR-Inhibitoren in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika verwendet. Insbesondere die Möglichkeit einer generellen, gezielten TGF β -Inhibition durch Pirfenidone wird untersucht. Da es sich in diesem Fall um ein bereits zugelassenes Medikament handelt, sind die Möglichkeiten einer klinischen Anwendung bei NSCLC vorstellbar.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der TGF β -Signalweg unter dem Aspekt des neuentdeckten TGF β -Pseudorezeptors BAMBI bei nichtneoplastischen und neoplastischen Lungenerkrankungen untersucht. Im Fokus der nichtneoplastischen Lungenerkrankungen standen die Remodelling-assoziierten Krankheiten wie die Lungenfibrose. Hierbei wurden in einer umfassenden Analyse der Signalwegsmediatoren bei IPF, Emphysem und tumorfreier Lunge die Expressionsstärke sowie die zelluläre Lokalisation untersucht. Deutliche Unterschiede zwischen Emphysem und IPF hinsichtlich der Signalwegsaktivierung und zellulären Lokalisation einzelner Mediatoren wurden gezeigt. Weiterhin wurde die Frage verfolgt, inwiefern ein Knockout des *Bambi*-Gens im Mausmodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose einen Einfluss hat. Hierbei fanden sich in den In-vivo-Experimenten aufgrund der noch geringen Gruppengröße keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wt und den KO-Tieren. *Ex vivo* stimuliertes Lungengewebe der KO-Tiere zeigte jedoch eine signifikant stärkere Expression des profibrogenen Kollagen 1A1 in einer TGF β -abhängigen Art und Weise. Um den Einfluss von TGF β *in vitro* auf EMT und fibrotische Prozesse in der Zellkultur zu untersuchen, wurde eine AECII-Primärzellkultur etabliert. Im Zuge der Arbeiten gelang es zum ersten Mal zu zeigen, dass AECII in Abhängigkeit vom TGF β -Signalweg den Phänotyp einer Typ 2 EMT annehmen und in der Lage sind Kollagen zu produzieren. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine EMT *in vitro* in AECII stattfindet und diese Zellen in der Lage sind Kollagen zu produzieren. Dieses Erkenntnis könnte sich als therapierelevant erweisen, wenn man bedenkt, dass Pirfenidone diesen Prozess *in vitro* inhibiert. Von besonderer Bedeutung ist hierbei der Aspekt der zellulären Lokalisation dieser Vorgänge. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle von BAMBI und des TGF β -Signalwegs bei Lungenkrebs eingehend untersucht. In einem großen Kollektiv von Patientengeweben wurde die Expression der Signalwegsmediatoren auf mRNA- und Protein-Ebene grundlegend untersucht. Es zeigte sich eine Signalwegsaktivierung im Lungenkrebs, die im Normalgewebe nicht zu finden war. Der TGF β -Signalweg war sehr homogen und zeigte insgesamt gesehen zwischen den einzelnen histologischen Tumor-Entitäten nur wenig signifikante Unterschiede. Es stellte sich heraus, dass die verminderte Expression von BAMBI sehr wahrscheinlich epigenetisch verursacht wird. Eine forcierte

Expression des Gens mittels Plasmiden und retroviraler Transfektion führte zu reduzierter Proliferation und gesteigerter Apoptose. Außerdem führte eine Überexpression zu einer verminderten Signalwegsaktivität durch Inhibition der SMAD2/3-Phosphorylierung. Es wird daher vermutet, dass es sich bei BAMBI um einen bisher unbekanntem Tumorsuppressor bei Lungenkrebs handelt.

7. Abstract

Lung diseases are among the leading causes of death world-wide. They affect millions of people and lead not only to increasing hospital admissions as well as deaths but also cause severe socio-economic problems. The TGF β signaling pathway is centrally involved in crucial developmental programs such as gastrulation, morphogenesis or pattern formation. Furthermore it tightly controls the tissue homeostasis by regulating apoptosis, proliferation and differentiation of both, epithelial and immune cells. With the evolution of more complex body plans, the TGF β signalling family acquired a sophisticated orchestra of regulating factors. TGF β signals undergo tight tempo-spatial control. Distorted signalling activity leads to severe outcomes and is mainly involved in organ fibrosis or carcinogenesis. The present study focusses on the recently discovered TGF β pseudo-receptor BAMBI and its role in lung fibrosis and lung cancer. Here we have shown that the TGF β pathway is differentially regulated and expressed on protein level between emphysema and IPF patients. BAMBI as well as TGF β and pSMAD3 were observed to be significantly differentially regulated and over-expressed in IPF compared to emphysema patient samples. Moreover, the involvement of BAMBI in bleomycin-induced IPF was investigated by using *Bambi*^{-/-} and Wt mice. Although no statistical difference between KO and Wt animals could be observed regarding the pattern as well as severity of observed fibrosis, KO mice seemed to suffer more from the bleomycin-induced lung damage as indicated by mortality and weight-loss. In conjunction with these observations, *ex vivo* stimulated lungs of KO mice expressed significantly higher levels of pro-fibrotic collagen 1A1 in a TGF β -dependent manner. In addition to the animal experiments, primary human AECII were used to address the possible role of these cells in lung fibrosis. This study is the first to show that primary human AECII transdifferentiate in a TGF β -dependent manner and acquire mesenchymal phenotype as well as the ability to express and secrete collagen. These findings may lead the way to IPF treatment with AECII as the main targets. In

addition, pilot experiments applied pirfenidone to suppress TGF β -induced collagen synthesis in AECII and first results suggested a possible therapeutic effect.

The second part of this study investigated the general expression of the TGF β pathway in lung cancer tissues and cells. The majority of patient tissues harbored an activated signalling cascade as indicated by phosphorylation of both, SMAD2 and SMAD3. The same held true for 2 of 4 investigated NSCLC cell lines. No, or only negligible expression of BAMBI was found in the tissues on mRNA and protein level. Epigenetic analyses discovered distinct differential methylation of human lung cancer tissues compared to matched tumor-free lung tissues with regards to the TGF β pathway. Among these, *BAMBI* was found to be differentially methylated as others have observed in bladder cancer. To elucidate further the role of BAMBI in carcinogenesis, A549 cells were transfected with plasmids and retro-viruses to force over-expression. Transiently transfected A549 cells showed increased apoptosis and reduced proliferation upon BAMBI over-expression compared to GFP control constructs. Retrovirally transfected A549 cells also showed reduced proliferation and downstream phosphorylation of SMAD2 and SMAD3. These findings clearly showed a central role of BAMBI in human lung cancer biology. The data suggests a possible role as a specific lung tumor suppressor gene and might lead to implications for further therapies. Among the 2 observed cases with BAMBI-expression in lung tumor tissue, 1 tumor harbored an EGFR-mutation. In a small cohort of patient tissues, we investigated the expression of BAMBI with regards to the EGFR-mutation status. The preliminary data revealed an expression of BAMBI in 50% of mutated tissues, while EGFR-wt tumors were all negative for BAMBI. These findings suggest not only a cooperation between both pathways, or a bias towards EGFR, but could also lead to implications for therapy and diagnostics.

8. Literaturverzeichnis

- Abedallaa, N. et al., 2012. Effect of chemotherapy in patients with resected small-cell or large-cell neuroendocrine carcinoma. *Journal of Thoracic Oncology* :, 7(7), pp.1179–1183.
- Alejandre Alcázar, M.A. et al., 2011. Inhibition of TGF- β Signaling and Decreased Apoptosis in IUGR-Associated Lung Disease in Rats D. *PLoS ONE*, 6(10), p.e26371.
- Alipio, Z.A. et al., 2011. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) induced by bleomycin or TGF(b1)/EGF in murine induced pluripotent stem cell-derived alveolar Type II-like cells. *Differentiation*; 82(2), pp.89–98.
- Anumanthan, G. et al., 2005. Restoration of TGF-beta signalling reduces tumorigenicity in human lung cancer cells. *British Journal of Cancer*, 93(10), pp.1157–1167.
- Araya, J. & Nishimura, S.L., 2010. Fibrogenic reactions in lung disease. *Annual Review of Pathology*, 5, pp.77–98.
- Ashburner, M. et al., 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*, 25(1), pp.25–29.
- Bedi, A. et al., 2012. Inhibition of TGF- Enhances the In Vivo Antitumor Efficacy of EGF Receptor-Targeted Therapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(11), pp.2429–2439.
- Beers, M.F. & Morrisey, E.E., 2011. The three R's of lung health and disease: repair, remodeling, and regeneration. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), pp.2065–2073.
- Bierie, B. & Moses, H.L., 2006. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 6(7), pp.506–520.
- Biswas, S. et al., 2007. Inhibition of TGF-beta with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(5), pp.1305–1313.
- Boggaram, V., 2009. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1/Nkx2.1/TITF1) gene regulation in the lung. *Clinical Science*, 116(1), p.27.
- Bohinski, R.J., Di Lauro, R. & Whitsett, J.A., 1994. The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis. *Molecular and Cellular Biology*, 14(9), pp.5671–5681.
- Bonnaud, P. et al., 2004. Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 173(3), pp.2099–2108.
- Boon, K. et al., 2009. Molecular phenotypes distinguish patients with relatively stable from progressive idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *PLoS ONE*, 4(4), p.e5134.
- Borcuk, A.C. et al., 2005. Lung Adenocarcinoma Global Profiling Identifies Type II Transforming Growth Factor- β Receptor as a Repressor of Invasiveness. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172(6), pp.729–737.
- Broekelmann, T.J. et al., 1991. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(15), pp.6642–6646.
- Bruno, M.D. et al., 1995. Lung cell-specific expression of the murine surfactant protein A (SP-A) gene is mediated by interactions between the SP-A promoter and thyroid transcription factor-1. *The*

- Journal of Biological Chemistry*, 270(12), pp.6531–6536.
- Burch, M.L. et al., 2010. TGF-beta stimulates biglycan synthesis via p38 and ERK phosphorylation of the linker region of Smad2. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(12), pp.2077–2090.
- Campanaro, S. et al., 2007. Genes involved in TGF beta1-driven epithelial-mesenchymal transition of renal epithelial cells are topologically related in the human interactome map. *BMC Genomics*, 8, p.383.
- Cano, A. et al., 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology*, 2(2), pp.76–83.
- Câmara, J. & Jarai, G., 2010. Epithelial-mesenchymal transition in primary human bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF-alpha. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 3(1), p.2.
- Chakrabarti, R. et al., 2012. Elf5 inhibits the epithelial-mesenchymal transition in mammary gland development and breast cancer metastasis by transcriptionally repressing Snail2. *Nature Cell Biology*, 14(11), pp.1212–1222.
- Chang, C.-C. et al., 2013. Connective tissue growth factor activates pluripotency genes and mesenchymal-epithelial transition in head and neck cancer cells. *Cancer Research*, 73(13), pp.4147–4157.
- Chen, J. et al., 2007. The TGF-beta pseudoreceptor gene Bambi is dispensable for mouse embryonic development and postnatal survival. *Genesis (New York, NY : 2000)*, 45(8), pp.482–486.
- Chesnoy, S. & Huang, L., 2000. Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29, pp.27–47.
- Chung, M.P. et al., 2003. Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin-induced fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 29(3 Pt 1), pp.375–380.
- Coward, W.R., Saini, G. & Jenkins, G., 2010. The pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 4(6), pp.367–388.
- Crosby, L.M. & Waters, C.M., 2010. Epithelial repair mechanisms in the lung. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 298(6), pp.L715–L731.
- Dalal, B.I., Keown, P.A. & Greenberg, A.H., 1993. Immunocytochemical localization of secreted transforming growth factor-beta 1 to the advancing edges of primary tumors and to lymph node metastases of human mammary carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 143(2), pp.381–389.
- de Larco, J.E. & Todaro, G.J., 1978. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(8), pp.4001–4005.
- Degen, W.G. et al., 1996. Expression of nma, a novel gene, inversely correlates with the metastatic potential of human melanoma cell lines and xenografts. *International Journal of Cancer*. 65(4), pp.460–465.
- Degryse, A.L. et al., 2010. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 299(4), pp.L442–L452.
- Devesa, S.S. et al., 2005. International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *International Journal of Cancer*, 117(2), pp.294–299.
- Doerner, A.M. & Zuraw, B.L., 2009. TGF-beta1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1beta but not abrogated by corticosteroids. *Respiratory Research*, 10, p.100.

- Drömann, D. et al., 2010. The TGF-beta-pseudoreceptor BAMBI is strongly expressed in COPD lungs and regulated by nontypeable Haemophilus influenzae. *Respiratory Research*, 11, p.67.
- Eickelberg, O. & Selman, M., 2010. Update in diffuse parenchymal lung disease 2009. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(9), pp.883–888.
- European Respiratory Society, 2013. ERS Whitebook-The burden of lung disease. pp.1–14.
- Fehrenbach, H., 2001. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respiratory Research*, 2(1), pp.33–46.
- Fehrenbach, H., 2012. Alveolar epithelial type II cells from embryonic stem cells: knights in shining armour? *European Respiratory Journal*, 39(2), pp.240–241.
- Ferlay, J. et al., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*. 127(12), pp.2893–2917.
- Fernandez, I & Eickelberg, O., 2012. New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet*, 380(9842), pp.680–688.
- Fox, W. & Scadding, J.G., 1973. Medical Research Council comparative trial of surgery and radiotherapy for primary treatment of small-celled or oat-celled carcinoma of bronchus. Ten-year follow-up. *The Lancet*, 2(7820), pp.63–65.
- Försti, A. et al., 2010. Polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 pathway in relation to colorectal cancer progression. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 49(3), pp.270–281.
- Fritzmann, J. et al., 2009. A colorectal cancer expression profile that includes transforming growth factor beta inhibitor BAMBI predicts metastatic potential. *Gastroenterology*, 137(1), pp.165–175.
- Gabrielson, E., 2006. Worldwide trends in lung cancer pathology. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 11(5), pp.533–538.
- Gal, A. et al., 2008. Sustained TGF beta exposure suppresses Smad and non-Smad signalling in mammary epithelial cells, leading to EMT and inhibition of growth arrest and apoptosis. *Oncogene*, 27(9), pp.1218–1230.
- Gauldie, J. et al., 2006. Smad3 signaling involved in pulmonary fibrosis and emphysema. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(8), pp.696–702.
- Giangreco, A., Groot, K.R. & Janes, S.M., 2007. Lung cancer and lung stem cells: strange bedfellows? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(6), pp.547–553.
- Goldmann, T. et al., 2002. Assessment of transcriptional gene activity in situ by application of HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathology, Research and Practice*, 198(2), pp.91–95.
- Goldmann, T. et al., 2005. Tissue microarrays from HOPE-fixed specimens allow for enhanced high throughput molecular analyses in paraffin-embedded material. *Pathology, Research and Practice*, 201(8-9), pp.599–602.
- Goldmann, T., Vollmer, E. & Gerdes, J., 2003. What's cooking? detection of important biomarkers in HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues eliminates the need for antigen retrieval. *The American Journal of Pathology*, 163(6), pp.2638–2640.
- Goodwin, A. & Jenkins, G., 2009. Role of integrin-mediated TGFbeta activation in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Biochemical Society Transactions*, 37(Pt 4), pp.849–854.
- Gordon, K.J. & Blobel, G.C., 2008. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1782(4), pp.197–228.
- Grady, W.M. et al., 2006. Proliferation and Cdk4 expression in microsatellite unstable colon cancers

- with TGFBR2 mutations. *International Journal of Cancer*. 118(3), pp.600–608.
- Grotewold, L. et al., 2001. Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development*, 100(2), pp.327–330.
- Haller, T. et al., 1998. Dynamics of surfactant release in alveolar type II cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4), pp.1579–1584.
- Hanyu, A. et al., 2001. The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of Cell Biology*, 155(6), pp.1017–1027.
- Harada, T. et al., 2010. Epithelial-mesenchymal transition in human lungs with usual interstitial pneumonia: quantitative immunohistochemistry. *Pathology International*, 60(1), pp.14–21.
- Hasegawa, Y. et al., 2001. Transforming growth factor-beta1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, 91(5), pp.964–971.
- Haura, E.B. et al., 2010. Molecular origins of lung cancer: prospects for personalized prevention and therapy. *Journal of Thoracic Oncology*. pp. S207–13.
- Heine, U. et al., 1987. Role of transforming growth factor-beta in the development of the mouse embryo. *The Journal of Cell Biology*, 105(6 Pt 2), pp.2861–2876.
- Herbst, R.S., Heymach, J.V. & Lippman, S.M., 2008. Lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 359(13), pp.1367–1380.
- Higashihori, N., Song, Y. & Richman, J.M., 2008. Expression and regulation of the decoy bone morphogenetic protein receptor BAMBI in the developing avian face. *Developmental Dynamics*, 237(5), pp.1500–1508.
- Hisatomi, K. et al., 2012. Pirfenidone inhibits TGF- β 1-induced over-expression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells. *BMC Pulmonary Medicine*, 12(1), pp.1–1.
- Hong, M. et al., 2011. Non-Smad transforming growth factor- β signaling regulated by focal adhesion kinase binding the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), pp.17841–17850.
- Hough, C., Radu, M. & Doré, J.J.E., 2012. Tgf-beta induced Erk phosphorylation of smad linker region regulates smad signaling. *PLoS ONE*, 7(8), p.e42513.
- Hsia, C.C.W. et al., 2010. An Official Research Policy Statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: Standards for Quantitative Assessment of Lung Structure. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(4), pp.394–418.
- Huang, Q. et al., 2012. Expression of Smad7 in Cholangiocarcinoma: Prognostic Significance and Implications for Tumor Metastasis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(10), pp.5161–5165.
- Huminiacki, L. et al., 2009. Emergence, development and diversification of the TGF-beta signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Evolutionary Biology*, 9, p.28.
- Hübner, R.-H. et al., 2008. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *BioTechniques*, 44(4), pp.507–517.
- Ikenouchi, J. et al., 2003. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 10), pp.1959–1967.
- Inman, G.J. et al., 2002. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7.

- Molecular Pharmacology*, 62(1), pp.65–74.
- Inoue, T. et al., 1995. The relationship between the immunodetection of transforming growth factor-beta in lung adenocarcinoma and longer survival rates. *Surgical Oncology*, 4(1), pp.51–57.
- Ishinaga, H. et al., 2007. TGF- β induces p65 acetylation to enhance bacteria-induced NF- κ B activation. *The EMBO Journal*, 26(4), pp.1150–1162.
- Itoh, S. & Dijke, ten, P., 2007. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2), pp.176–184.
- Iwashita, T. et al., 2000. Involvement of collagen-binding heat shock protein 47 and procollagen type I synthesis in idiopathic pulmonary fibrosis: contribution of type II pneumocytes to fibrosis. *Human Pathology*, 31(12), pp.1498–1505.
- Iwatsuki, M. et al., 2010. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Science*, 101(2), pp.293–299.
- Izbicki, G. et al., 2002. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *International Journal of Experimental Pathology*, (83), pp.111–119.
- Jeon, H.-S. & Jen, J., 2010. TGF-beta signaling and the role of inhibitory Smads in non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(4), pp.417–419.
- Jia, M. & Souchelnytskyi, S., 2011. Comments on the cross-talk of TGF β and EGF in cancer. *Experimental Oncology*, 33(3), pp.170–173.
- Jiang, C.-G. et al., 2013. Connective tissue growth factor is a positive regulator of epithelial-mesenchymal transition and promotes the adhesion with gastric cancer cells in human peritoneal mesothelial cells. *Cytokine*, 61(1), pp.173–180.
- Jimenez, W. et al., 1985. Measurement of Fibrosis in Needle Liver Biopsies: Evaluation of a Colorimetric Method. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 5(5), pp.815–818.
- Jones, P.A. & Baylin, S.B., 2007. The epigenomics of cancer. *Cell*, 128(4), pp.683–692.
- Jones, S. et al., 2008. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(11), pp.4283–4288.
- Kakugawa, T. et al., 2013. Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Stress & Chaperones*, 18(5), pp.581–590.
- Kalluri, R. & Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), pp.1420–1428.
- Kang, M. et al., 2012. Cross-talk between TGF β 1 and EGFR signalling pathways induces TM4SF5 expression and epithelial–mesenchymal transition. *The Biochemical Journal*, 443(3), pp.691–700.
- Kasai, H. et al., 2005. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respiratory Research*, 6, p.56.
- Kähler, D. et al., 2010. Proteomics out of the archive: Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry using HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 58(3), pp.221–228.
- Kelly, M.M. et al., 2006. Cell-specific gene expression in patients with usual interstitial pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(5), pp.557–565.
- Khalil, N. et al., 2001. Regulation of the effects of TGF-beta 1 by activation of latent TGF-beta 1 and differential expression of TGF-beta receptors (T beta R-I and T beta R-II) in idiopathic pulmonary

- fibrosis. *Thorax*, 56(12), pp.907–915.
- Khalil, N. et al., 1996. TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 14(2), pp.131–138.
- Khin, S.S. et al., 2009. BAMBI gene is epigenetically silenced in subset of high-grade bladder cancer. *International Journal of Cancer*, 125(2), pp.328–338.
- Kim, E.-S., Kim, M.-S. & Moon, A., 2004. TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. *International Journal of Oncology*, 25(5), pp.1375–1382.
- Kim, J.H. et al., 2007. Transforming growth factor beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition of A549 cells. *Journal of Korean Medical Science*, 22(5), pp.898–904.
- Kim, K.K. et al., 2006. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), pp.13180–13185.
- Kim, S. et al., 2008. Systemic Blockade of Transforming Growth Factor- Signaling Augments the Efficacy of Immunogene Therapy. *Cancer Research*, 68(24), pp.10247–10256.
- Kitazawa, S. et al., 2005. Desmoid tumor with ossification in chest wall: possible involvement of BAMBI promoter hypermethylation in metaplastic bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(8), pp.1472–1477.
- Kolla, V. et al., 2007. Thyroid Transcription Factor in Differentiating Type II Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 36(2), pp.213–225.
- Kolosova, I., Nethery, D. & Kern, J.A., 2011. Role of Smad2/3 and p38 MAP kinase in TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of pulmonary epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 226(5), pp.1248–1254.
- Konishi, K. et al., 2009. Gene expression profiles of acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 180(2), pp.167–175.
- Königshoff, M., Kneidinger, N. & Eickelberg, O., 2009. TGF- β signaling in COPD: deciphering genetic and cellular susceptibilities for future therapeutic regimen. *SWISS MED WKLY*, 139(39-40), pp.554–563.
- Lang, D.S. et al. 2014. Transforming Growth Factor-Beta signaling leads to uPA/PAI-1 activation and metastasis: A study on human breast cancer tissues. *Pathol Oncol Res. Accepted*
- Lahn, M., Kloeker, S. & Berry, B.S., 2005. TGF-beta inhibitors for the treatment of cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 14(6), pp.629–643.
- Lee, K. et al., 2011. Snail1, Snail2, and E47 promote mammary epithelial branching morphogenesis. *The EMBO Journal*, 30(13), pp.2662–2674.
- Leppäranta, O. et al., 2009. Reduced phosphorylation of the TGF-Beta signal transducer Smad2 in emphysematous human lung. *COPD*, 6(4), pp.234–241.
- Li, M. et al., 2011. Epithelium-specific deletion of TGF- β receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(1), pp.277–287.
- Lim, J. & Thiery, J.P., 2012. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development (Cambridge, England)*, 139(19), pp.3471–3486.
- Lim, S. et al., 2013. SNAI1-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition Confers Chemoresistance and Cellular Plasticity by Regulating Genes Involved in Cell Death and Stem Cell Maintenance O..

- PLoS ONE*, 8(6), p.e66558.
- Limper, A.H. et al., 1991. Analysis of local mRNA expression for extracellular matrix proteins and growth factors using in situ hybridization in fibroproliferative lung disorders. *Chest*, 99(3 Suppl), pp.55S–56S.
- Lin, C. et al., 2012. Alveolar Type II Cells Possess the Capability of Initiating Lung Tumor Development. *PLoS ONE*, 7(12), p.e53817.
- Lin, Z. et al., 2008. The pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor positively modulates Wnt/beta-catenin signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(48), pp.33053–33058.
- Lomas, N.J. et al., 2012. Idiopathic pulmonary fibrosis: immunohistochemical analysis provides fresh insights into lung tissue remodelling with implications for novel prognostic markers. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 5(1), pp.58–71.
- Loveland, K.L. et al., 2003. Expression of Bambi is widespread in juvenile and adult rat tissues and is regulated in male germ cells. *Endocrinology*, 144(9), pp.4180–4186.
- Lozano, R. et al., 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380(9859), pp.2095–2128.
- López-De León, A. & Rojkind, M., 1985. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33(8), pp.737–743.
- Lu, J. et al., 2013. Upregulation of Heparan Sulfate 6-O-Sulfation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*.
- Luwor, R.B. et al., 2012. Targeting Stat3 and Smad7 to restore TGF- β cytosstatic regulation of tumor cells in vitro and in vivo. *Oncogene*, 32(19), pp.2433–2441.
- Markowitz, S. et al., 1995. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, 268(5215), pp.1336–1338.
- Marmai, C. et al., 2011. Alveolar Epithelial Cells Express Mesenchymal Proteins in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*.
- Marwitz, S. et al., 2011. HOPE-BAL: Improved Molecular Diagnostics by Application of a Novel Technique for Fixation and Paraffin Embedding. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 59(6), pp.601–614.
- Mason, R.J. & Williams, M.C., 1977. Type II alveolar cell. Defender of the alveolus. *The American Review of Respiratory Disease*, 115(6 Pt 2), pp.81–91.
- Massagué, J., 2008. TGF β in Cancer. *Cell*, 134(2), pp.215–230.
- Massagué, J. & Chen, Y.G., 2000. Controlling TGF- β signaling. *Genes & Development*, 14(6), pp.627–644.
- Massagué, J. & Gomis, R.R., 2006. The logic of TGF β signaling. *FEBS Letters*, 580(12), pp.2811–2820.
- Menashe, I. et al., 2012. Large-scale pathway-based analysis of bladder cancer genome-wide association data from five studies of European background. *PLoS ONE*, 7(1), p.e29396.
- Mendez, M.G., Kojima, S.-I. & Goldman, R.D., 2010. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *The FASEB Journal*, 24(6),

- pp.1838–1851.
- Michaelson, J.E., Aguayo, S.M. & Roman, J., 2000. Idiopathic pulmonary fibrosis: a practical approach for diagnosis and management. *Chest*, 118(3), pp.788–794.
- Moeller, A. et al., 2008. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(3), pp.362–382.
- Moore, B.B. & Hogaboam, C.M., 2008. Murine models of pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(2), pp.L152–60.
- Morgensztern, D. et al., 2010. Trends in stage distribution for patients with non-small cell lung cancer: a National Cancer Database survey. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(1), pp.29–33.
- Morishita, A. et al., 2013. HMGA2 is a driver of tumor metastasis. *Cancer Research*, 73(14), pp.4289–4299.
- Morty, R.E., Königshoff, M. & Eickelberg, O., 2009. Transforming growth factor-beta signaling across ages: from distorted lung development to chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(7), pp.607–613.
- Moses, H.L. et al., 1981. Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Research*, 41(7), pp.2842–2848.
- Moses, H.L., Yang, E.Y. & Pietenpol, J.A., 1990. TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell*, 63(2), pp.245–247.
- Mouratis, M.A. & Aidinis, V., 2011. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 17(5), pp.355–361.
- Moustakas, A. & Heldin, C.-H., 2009. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development (Cambridge, England)*, 136(22), pp.3699–3714.
- Nagatake, M. et al., 1996. Somatic in vivo alterations of the DPC4 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Research*, 56(12), pp.2718–2720.
- Niu, D.-F. et al., 2012. Transcription factor Runx2 is a regulator of epithelial-mesenchymal transition and invasion in thyroid carcinomas. *Laboratory Investigation*, 92(8), pp.1181–1190.
- O-Charoenrat, P. et al., 2000. Overexpression of epidermal growth factor receptor in human head and neck squamous carcinoma cell lines correlates with matrix metalloproteinase-9 expression and in vitro invasion. *International Journal of Cancer*. 86(3), pp.307–317.
- Ohashi, S. et al., 2010. Epidermal growth factor receptor and mutant p53 expand an esophageal cellular subpopulation capable of epithelial-to-mesenchymal transition through ZEB transcription factors. *Cancer Research*, 70(10), pp.4174–4184.
- Olert, J. et al., 2001. HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues. *Pathology, Research and Practice*, 197(12), pp.823–826.
- Onichtchouk, D. et al., 1999. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, 401(6752), pp.480–485.
- Ono, H. et al., 2012a. SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation. *Oncogene*, 31(47), pp.4923–4934.
- Ono, T. et al., 2012b. Direct in vitro and in vivo evidence for interaction between Hsp47 protein and collagen triple helix. *Journal of Biological Chemistry*, 287(9), pp.6810–6818.
- Oury, T.D. et al., 2001. Attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by a catalytic antioxidant

- metalloporphyrin. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 25(2), pp.164–169.
- Pao, W. & Girard, N., 2011. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *The Lancet Oncology*, 12(2), pp.175–180.
- Parkin, D.M. et al., 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 55(2), pp.74–108.
- Pegoraro, S. et al., 2013. HMGA1 promotes metastatic processes in basal-like breast cancer regulating EMT and stemness. *Oncotarget*, 4(8), pp.1293–1308.
- Peng, R. et al., 2013. Bleomycin induces molecular changes directly relevant to idiopathic pulmonary fibrosis: a model for “active” disease. *PLoS ONE*, 8(4), p.e59348.
- Pfeifer, G.P. et al., 2002. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*, 21(48), pp.7435–7451.
- Phan, S.H. & Kunkel, S.L., 1992. Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Experimental Lung Research*, 18(1), pp.29–43.
- Pils, D. et al., 2010. BAMBI is overexpressed in ovarian cancer and co-translocates with Smads into the nucleus upon TGF-beta treatment. *Gynecologic Oncology*, 117(2), pp.189–197.
- Pirozzi, G. et al., 2011. Epithelial to Mesenchymal Transition by TGFβ-1 Induction Increases Stemness Characteristics in Primary Non Small Cell Lung Cancer Cell Line S. *PLoS ONE*, 6(6), p.e21548.
- Poncelet, A.-C. et al., 2007. Cell phenotype-specific down-regulation of Smad3 involves decreased gene activation as well as protein degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(21), pp.15534–15540.
- Raghu, G. et al., 2006. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(7), pp.810–816.
- Reck, M. et al., 2013. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments. *The Lancet*, 382(9893), pp.709–719.
- Rho, J.K. et al., 2009. Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 63(2), pp.219–226.
- Roberts, A.B. & Sporn, M.B., 1992. Differential expression of the TGF-beta isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues. *Molecular Reproduction and Development*, 32(2), pp.91–98.
- Roberts, A.B. et al., 1981. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(9), pp.5339–5343.
- Roberts, A.B. et al., 1980. Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(6), pp.3494–3498.
- Rohr, U.-P. et al., 2003. Non-small lung cancer cells are prime targets for p53 gene transfer mediated by a recombinant adeno-associated virus type-2 vector. *Cancer Gene Therapy*, 10(12), pp.898–906.
- Rosell, R. et al., 2009. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361(10), pp.958–967.
- Saito, R.-A. et al., 2009. Thyroid transcription factor-1 inhibits transforming growth factor-beta-

- mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Research*, 69(7), pp.2783–2791.
- Salam, M.T. et al., 2007. Transforming growth factor- 1 C-509T polymorphism, oxidant stress, and early-onset childhood asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176(12), pp.1192–1199.
- Sánchez-Tilló, E. et al., 2012. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cellular and molecular life sciences* .69(20), pp.3429–3456.
- Schroeder, A. et al., 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7(1), pp.1–14.
- Seki, E. et al., 2007. TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis. *Nature Medicine*, 13(11), pp.1324–1332.
- Sekiya, T. et al., 2004. Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling, as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(8), pp.6840–6846.
- Selman, M. et al., 2006. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(2), pp.188–198.
- Selman, M., Pardo, A. & Kaminski, N., 2008. Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs? *PLoS Medicine*, 5(3), p.e62.
- Shi, S.-R., Key, M.E. & Kalra, K.L., 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 39(6), pp.741–748.
- Shipitsin, M. et al., 2007. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*, 11(3), pp.259–273.
- Siegel, P.M. & Massagué, J., 2003. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 3(11), pp.807–820.
- Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A., 2012. Cancer statistics, 2012. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 62(1), pp.10–29.
- Singh, A. & Settleman, J., 2010. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29(34), pp.4741–4751.
- Srinivasan, M., Sedmak, D. & Jewell, S., 2002. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *The American Journal of Pathology*, 161(6), pp.1961–1971.
- Stone, K.C. et al., 1992. Distribution of lung cell numbers and volumes between alveolar and nonalveolar tissue. *The American Review of Respiratory Disease*, 146(2), pp.454–456.
- Strieter, R.M. & Mehrad, B., 2009. New mechanisms of pulmonary fibrosis. *Chest*, 136(5), pp.1364–1370.
- Suh, Y. et al., 2013. Claudin-1 induces epithelial-mesenchymal transition through activation of the c-Abl-ERK signaling pathway in human liver cells. *Oncogene*, 32(41), pp.4873–4882.
- Sun, S., Schiller, J.H. & Gazdar, A.F., 2007. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nature Reviews. Cancer*, 7(10), pp.778–790.
- Sutherland, K.D. & Berns, A., 2010. Cell of origin of lung cancer. *Molecular Oncology*, 4(5), pp.397–403.

- Swarts, D.R.A. et al., 2013. An exploration of pathways involved in lung carcinoid progression using gene expression profiling. *Carcinogenesis*, 34(12), pp.2726–2737.
- Takanami, I. et al., 1994. Transforming growth factor beta 1 as a prognostic factor in pulmonary adenocarcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, 47(12), pp.1098–1100.
- Taube, J.H. et al., 2010. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), pp.15449–15454.
- Thannickal, V.J. et al., 2004. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annual Review of Medicine*, 55, pp.395–417.
- Thiery, J.P. et al., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), pp.871–890.
- Tiwari, N. et al., 2013. Sox4 is a master regulator of epithelial-mesenchymal transition by controlling Ezh2 expression and epigenetic reprogramming. *Cancer Cell*, 23(6), pp.768–783.
- Togo, N. et al., 2008. Prognostic significance of BMP and activin membrane-bound inhibitor in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 14(31), pp.4880–4888.
- Toonkel, R.L., Borczuk, A.C. & Powell, C.A., 2010. Tgf-beta signaling pathway in lung adenocarcinoma invasion. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(2), pp.153–157.
- Tramullas, M. et al., 2010. BAMBI (bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor) reveals the involvement of the transforming growth factor-beta family in pain modulation. *The Journal of Neuroscience*, 30(4), pp.1502–1511.
- Travis, W.D., 2004. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart - *World Health Organization Classification of Tumors*. IARC Press, Lyon, 2004
- Tsang, M. et al., 2000. Zebrafish nma is involved in TGFbeta family signaling. *Genesis (New York, NY : 2000)*, 28(2), pp.47–57.
- Tullberg-Reinert, H. & Jundt, G., 1999. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochemistry and Cell Biology*, 112(4), pp.271–276.
- Uchida, K. et al., 1996. Somatic in vivo alterations of the JV18-1 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Research*, 56(24), pp.5583–5585.
- Vázquez, P.F. et al., 2013. TGF-beta specifically enhances the metastatic attributes of murine lung adenocarcinoma: implications for human non-small cell lung cancer. *Clinical & Experimental Metastasis*, 30(8), pp.993–1007.
- Vervoort, S.J. et al., 2013. SOX4 mediates TGF- β -induced expression of mesenchymal markers during mammary cell epithelial to mesenchymal transition. *PLoS ONE*, 8(1), p.e53238.
- Vieira, V. et al., 2008. Differential regulation of Dlg1, Scrib, and Lgl1 expression in a transgenic mouse model of ocular cancer. *Molecular Vision*, 14, pp.2390–2403.
- Vincent, T. et al., 2009. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nature Cell Biology*, 11(8), pp.943–950.
- Vollmer, E. et al., 1999. HOPE--a novel tool for the pathologist. *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, 45, pp.35–40.
- Vollmer, E. et al., 2006. The HOPE technique opens up a multitude of new possibilities in pathology. *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, 47(1), pp.15–19.

- Wahbah, M. et al., 2007. Changing trends in the distribution of the histologic types of lung cancer: a review of 4,439 cases. *Annals of Diagnostic Pathology*, 11(2), pp.89–96.
- Wang, J. et al., 2007. Differentiated Human Alveolar Epithelial Cells and Reversibility of their Phenotype In Vitro. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 36(6), pp.661–668.
- Wang, S.E., 2011. The Functional Crosstalk between HER2 Tyrosine Kinase and TGF- β Signaling in Breast Cancer Malignancy. *Journal of Signal Transduction*, 2011(10), pp.1–8.
- Weinstein, M. et al., 1998. Failure of egg cylinder elongation and mesoderm induction in mouse embryos lacking the tumor suppressor smad2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), pp.9378–9383.
- WHO, 2013. WHO-The top 10 causes of death 2011. Fact Sheet 310, pp.1–4.
- Wiedorn, K.H. et al., 2002. HOPE--a new fixing technique enables preservation and extraction of high molecular weight DNA and RNA of > 20 kb from paraffin-embedded tissues. Hepes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect. *Pathology, Research and Practice*, 198(11), pp.735–740.
- Willis, B. et al., 2005. Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor- β 1: Potential Role in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Pathology*, 166(5), p.1321.
- Willis, B.C., duBois, R.M. & Borok, Z., 2006. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(4), pp.377–382.
- Witta, S.E. et al., 2006. Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer Research*, 66(2), pp.944–950.
- Wynn, T.A., 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology*, 214(2), pp.199–210.
- Xavier, S. et al., 2010. BAMBI is expressed in endothelial cells and is regulated by lysosomal/autolysosomal degradation. *PLoS ONE*, 5(9), p.e12995.
- Xiao, H.-B. et al., 2012. HSP47 regulates ECM accumulation in renal proximal tubular cells induced by TGF- β 1 through ERK1/2 and JNK MAPK pathways. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 303(5), pp.F757–65.
- Xu, J. et al., 2009. TGF β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*. 19:pp.156-172
- Yagi-Utsumi, M. et al., 2012. NMR and mutational identification of the collagen-binding site of the chaperone Hsp47. *PLoS ONE*, 7(9), p.e45930.
- Yamada, M. et al., 2008. Dual-immunohistochemistry provides little evidence for epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis. *Histochemistry and Cell biology*, 129(4), pp.453–462.
- Yeh, Y.-C. & Chou, T.-Y., 2013. Pulmonary neuroendocrine tumors: Study of 90 cases focusing on clinicopathological characteristics, immunophenotype, preoperative biopsy, and frozen section diagnoses. *Journal of surgical oncology*.
- Zaravinos, A. et al., 2011. Spotlight on differentially expressed genes in urinary bladder cancer. *PLoS ONE*, 6(4), p.e18255.
- Zhang, H. et al., 2013. KLF8 involves in TGF-beta-induced EMT and promotes invasion and migration in gastric cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139(6), pp.1033–1042.
- Zhang, S. et al., 2007. Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by

- interfering with functional Smad-DNA complex formation. *Molecular and Cellular Biology*, 27(12), pp.4488–4499.
- Zhao, Y. et al., 2000. Ontogeny and localization of TGF-beta type I receptor expression during lung development. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 278(6), pp.L1231–9.
- Zhou, L. et al., 2013. The overexpression of BAMBI and its involvement in the growth and invasion of human osteosarcoma cells. *Oncology Reports*, 30(3), pp.1315–1322.
- Zhu, H.-J., Iaria, J. & Sizeland, A.M., 1999. Smad7 differentially regulates transforming growth factor beta-mediated signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(45), pp.32258–32264.
- Zirkel, A. et al., 2013. IGF2BP1 promotes mesenchymal cell properties and migration of tumor-derived cells by enhancing the expression of LEF1 and SNAI2 (SLUG). *Nucleic Acids Research*, 41(13), pp.6618–6636.
- Zubeldia, I.G. et al., 2013. Epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes leading to liver metastasis are abrogated by the novel TGFβ1-targeting peptides P17 and P144. *Experimental Cell Research*, 319(3), pp.12–22.

9. Appendizes

Appendix I :verwendetes Patientenmaterial für IHC

Patienten-ID	Diagnose	Geschlecht (m/f)	Alter	T	N	M	G
11359-08	Adenokarzinom	m	70,00	1b	0	x	2
1799-12	Adenokarzinom	f	71,00	4	2	x	3
5622-12	Adenokarzinom	f	58,00	2	2	1	3
12928-12	Adenokarzinom	m	74,00	3	2	x	3
13036-12	Adenokarzinom	f	73,00	2b	0	x	2
22378-08	Adenokarzinom	m	65,00	1a	0	x	2
22521-08	Adenokarzinom	m	68,00	2b	0	x	2-3
5781-12	Adenokarzinom	m	67,00	2a	3	x	3
12722-12	Adenokarzinom	m	67,00	2a	0	x	3
12893-12	Adenokarzinom	f	66,00	3	0	x	3
13114-12	Adenokarzinom	m	69,00	1b	0	x	3
11560-12	Adenokarzinom	m	69,00	3	3	x	3
12990-12	Adenokarzinom	f	45,00	2a	1	x	2
10921-11	Adenokarzinom	f	80,00	1b	0	x	3
10455-12	Adenokarzinom	m	61,00	2a	1	x	3
12072-12	Adenokarzinom	m	50,00	3	1	x	3
19726-11	Adenokarzinom	f	64,00	1b	3	x	3
19934-11	Adenokarzinom	m	52,00	2a	0	x	3
9146-07	Adenokarzinom	m	60,00	2a	3	x	3
10353-07	Adenokarzinom	f	48,00	4	2	x	3
21456-07	Adenokarzinom	m	67,00	2a	0	x	2
1183-08	Adenokarzinom	f	75,00	2a	0	x	2
1439-08	Adenokarzinom	m	52,00	2a	0	x	2
12554-08	Adenokarzinom	f	65,00	4	0	x	2
21577-08	Adenokarzinom	f	57,00	1b	0	x	2-3
3302-12	Adenokarzinom	f	61,00	3	1	x	3
3450-12	Adenokarzinom	f	67,00	1b	0	1	2
11135-10	Adenokarzinom	m	57,00	3	1	x	3
13298-12	Adenokarzinom	m	56,00	4	3	x	3
12251-12	Adenokarzinom	f	55,00	2a	1	x	3
7413-07	Adenokarzinom	f	51,00	2b	0	x	2
530-11	Adenokarzinom	m	68,00	3	0	x	3
17514-11	Adenokarzinom	m	77,00	3	1	x	3
22024-11	Adenokarzinom	f	53,00	3	0	x	3
10329-11	Adenokarzinom	f	73,00	4	1	x	2
13867-12	Adenokarzinom	m	67,00	2a	0	x	3
20839-07	Adenokarzinom	m	74,00	2a	1	x	2
21239-07	Adenokarzinom	m	58,00	2b	1	x	2
21255-07	Adenokarzinom	f	58,00	3	1	x	3
20367-08	Adenokarzinom	m	66,00	2a	1	x	3

22032-08	Adenokarzinom	f	73,00	2	2	x	2
21918-11	Adenokarzinom	f	54,00	4	3	x	3
18105-11	Adenokarzinom	m	57,00	2a	1	x	3
21405-11	Adenokarzinom	f	83,00	2b	2	x	3
25258-11	Adenokarzinom	m	59,00	3	1	x	3
1449-08	Adenokarzinom	f	63,00	3	3	x	3
20980-11	Adenokarzinom	f	82,00	2a	0	x	3
19352-07	Adenokarzinom	m	66,00	2b	0	x	2-3
19524-07	Adenokarzinom	f	50,00	2a	2	x	3
22394-08	Adenokarzinom	f	41,00	3	3	x	3
6591-11	Adenokarzinom	f	75,00	2a	1	x	3
18105-11	Adenokarzinom	m	57,00	2a	1	x	3
13830-12	Adenokarzinom	f	65,00	1b	0	x	3
15463-12	Adenokarzinom	m	45,00	4	1	x	3
7171-11	Adenokarzinom	f	76,00	2a	x	x	3
7976-11	Adenokarzinom	f	52,00	2a	2	x	3
15306-12	Adenokarzinom	m	62,00	2a	1	x	3
10708-10	Adenokarzinom	m	73,00	1b	1	x	2-3
17962-10	Adenokarzinom	f	74,00	2b	2	x	2
8145-08	Adenosquamöses Karzinom	m	69,00	2a	3	x	3
5161-12	Adenosquamöses Karzinom	m	74,00	2a	0	x	3
7533-11	Adenosquamöses Karzinom	m	69,00	2b	0	x	3
16176-07	Adenosquamöses Karzinom.	m	77,00	2b	0	x	3
19338-07	Adenosquamöses Karzinom.	m	69,00	3	0	x	3
7944-07	Adenosquamöses Karzinom.	f	62,00	2a	0	x	2-3
12894-12	Karzinoid	f	65,00	2	0	x	1
14574-07	Karzinoid	m	55,00	2a	0	x	1
13035-12	Karzinoid	m	75,00	2a	0	x	3
19192-08	gemischtes Kleinzelliges Karzinom	m	65,00	3	2	x	3
13740-12	Großzeller	m	69,00	3	1	x	3
15861-12	Großzeller	m	78,00	2a	0	x	4
7510-11	Großzeller	f	69,00	1a	0	x	3
20252-11	Großzeller	m	62,00	3	1	x	2
13159-12	Großzeller	m	74,00	3	0	x	3
24903-11	Großzeller	f	49,00	2b	2	x	3
1938-11	Großzeller	f	80,00	2b	2	x	3
17855-11	Großzeller	f	65,00	3	0	x	3
282-12	Großzeller	f	61,00	2a	3	x	3
3139-11	Großzeller	m	70,00	3	1	x	3
20623-07	Metastase Mammakarzinom	f	69,00	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
19656-08	Metastase Kolonkarzinom	f	78,00	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
3128-11	NSCLC	m	76,00	1b	0	x	3
6578-11	Sarkomatoides Karzinom	m	60,00	3	1	x	3
10717-07	Plattenepithelkarzinom	f	79,00	3	1	x	2
4945-12	Plattenepithelkarzinom	m	73,00	3	0	x	2
12038-12	Plattenepithelkarzinom	m	75,00	2a	1	x	2
6269-08	Plattenepithelkarzinom	m	70,00	2b	2	x	2

18234-08	Plattenepithelkarzinom	m	62,00	2a	1	x	2-3
1396-09	Plattenepithelkarzinom	m	52,00	2a	2	x	3
14022-12	Plattenepithelkarzinom	f	61,00	2a	2	x	3
12394-12	Plattenepithelkarzinom	m	72,00	2a	0	x	3
12798-12	Plattenepithelkarzinom	m	76,00	4	1	x	2
11116-12	Plattenepithelkarzinom	m	94,00	2b	1	x	3
12799-12	Plattenepithelkarzinom	f	66,00	2a	0	x	3
14892-08	Plattenepithelkarzinom	m	66,00	3	1	x	2
21398-11	Plattenepithelkarzinom	m	65,00	1b	0	x	3
15765-12	Plattenepithelkarzinom	m	60,00	4	0	x	2
12488-12	Plattenepithelkarzinom	m	74,00	2a	0	x	2
21153-07	Plattenepithelkarzinom	m	52,00	2a	1	x	3
3498-08	Plattenepithelkarzinom	m	60,00	2b	1	x	2-3
15019-08	Plattenepithelkarzinom	m	76,00	2a	0	x	3
18010-08	Plattenepithelkarzinom	f	68,00	3	1	x	2
22531-08	Plattenepithelkarzinom	m	54,00	4	2	x	3
12097-11	Plattenepithelkarzinom	m	74,00	2b	2	x	3
2274-12	Plattenepithelkarzinom	m	68,00	2b	1		3
9495-10	Plattenepithelkarzinom	m	75,00	2b	0	x	2
16673-10	Plattenepithelkarzinom	m	66,00	2	1	0	2
17735-10	Plattenepithelkarzinom	m	87,00	2a	1	x	3
13802-12	Plattenepithelkarzinom	m	69,00	2b	0	x	2
7620-07	Plattenepithelkarzinom	m	50,00	2b	1	x	3
12082-07	Plattenepithelkarzinom	m	77,00	2b	0	x	2
15982-07	Plattenepithelkarzinom	m	63,00	3	0	x	3
14743-08	Plattenepithelkarzinom	m	75,00	4	1	x	2
2475-11	Plattenepithelkarzinom	m	69,00	2b	0	x	3
8389-11	Plattenepithelkarzinom	m	77,00	2a	0	x	3
22222-11	Plattenepithelkarzinom	m	59,00	2a	0	x	2
17201-10	Plattenepithelkarzinom	f	67,00	1a	0	x	1
13486-12	Plattenepithelkarzinom	m	68,00	2b	3	x	3
13231-12	Plattenepithelkarzinom	m	71,00	2a	0	x	3
13230-12	Plattenepithelkarzinom	m	79,00	3	1	x	3
13188-12	Plattenepithelkarzinom	m	75,00	3	1	x	3
8132-08	Plattenepithelkarzinom	f	46,00	2b	0	x	2
6495-08	Plattenepithelkarzinom	m	61,00	2a	0	x	2-3
13232-08	Plattenepithelkarzinom	m	75,00	2a	1	x	2
19717-11	Plattenepithelkarzinom	m	70,00	2a	0	x	2
24215-11	Plattenepithelkarzinom	m	73,00	2a	0	x	3
926-12	Plattenepithelkarzinom	m	69,00	2b	0	x	3
935-12	Plattenepithelkarzinom	f	79,00	1b	0	x	3
1093-12	Plattenepithelkarzinom	m	63,00	2a	0	x	2
4223-12	Plattenepithelkarzinom	m	76,00	2b	1	x	3
13341-12	Plattenepithelkarzinom	m	84,00	3	0	x	3
14183-12	Plattenepithelkarzinom	f	60,00	2a	2	x	3
10367-07	Plattenepithelkarzinom	m	70,00	2a	0	x	2
15626-07	Plattenepithelkarzinom	m	60,00	2b	0	0	1
21417-07	Plattenepithelkarzinom	m	55,00	2a	2	x	2

9461-08	Plattenepithelkarzinom	m	64,00	2a	3	x	3
20605-08	Plattenepithelkarzinom	m	77,00	2	0	x	2
22014-08	Plattenepithelkarzinom	m	80,00	3	0	x	2
1148-11	Plattenepithelkarzinom	m	63,00	4	3	x	3
277-12	Plattenepithelkarzinom	f	69,00	2a	0	x	2
1888-12	Plattenepithelkarzinom	m	75,00	2a	0	x	2
12470-10	Plattenepithelkarzinom	m	67,00	2a	1	x	2
14023-12	Plattenepithelkarzinom	f	66,00	2a	0	x	2
8828-07	Plattenepithelkarzinom	m	54,00	1b	0	x	3
15745-07	Plattenepithelkarzinom	m	41,00	2b	2	x	3
20371-07	Plattenepithelkarzinom	m	57,00	2b	0	x	3
3431-11	Plattenepithelkarzinom	m	77,00	2b	3	x	3
13592-12	Plattenepithelkarzinom	m	79,00	2a	2	x	3
13702-12	Plattenepithelkarzinom	m	60,00	1a	0	x	3
26468-10	Plattenepithelkarzinom	m	60,00	2a	0	x	2
2508-11	Plattenepithelkarzinom	m	69,00	1b	0	x	3
6429-11	Plattenepithelkarzinom	m	74,00	2a	2	x	3
9344-11	Plattenepithelkarzinom	f	78,00	2b	1	x	3
11872-11	Plattenepithelkarzinom	m	62,00	3	2	x	3
8901-10	Plattenepithelkarzinom	f	61,00	1b	0	x	3
12066-10	Plattenepithelkarzinom	f	82,00	1b	0	x	3
15148-07	Plattenepithelkarzinom	m	65,00	2b	1	x	3
n.v.	A549	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
n.v.	H838	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
n.v.	H1650	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
n.v.	H1975	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
2951-13	Karzinoid	m	68,00	2a	0	x	1
14574-07	Karzinoid	m	55,00	2	0	x	n.v.
21090-09	Karzinoid	m	54,00	2	0	x	1
13035-12	Tumor-freie Lunge	m	75,00				
3128-11	Tumor-freie Lunge	m	76,00				
18072-11	Tumor-freie Lunge		52,00				
21417-07	Tumor-freie Lunge	m	55,00				
530-11	Tumor-freie Lunge	m	68,00				
1117-11	Tumor-freie Lunge	w	69,00				
1938-11	Tumor-freie Lunge	w	73,00				
17514-11	Tumor-freie Lunge	m	77,00				
15227-11	Tumor-freie Lunge	m	80,00				
17287-11	Tumor-freie Lunge	w	49,00				
6444-11	Tumor-freie Lunge	w	57,00				
12578-11	Tumor-freie Lunge	m	66,00				
16094-11	Tumor-freie Lunge	m	78,00				
811-11	Tumor-freie Lunge	m	58,00				
1953-11	Tumor-freie Lunge	m	51,00				
10687-11	Tumor-freie Lunge	m	69,00				
18105-11	Tumor-freie Lunge	m	57,00				
19724-11	Tumor-freie Lunge	m	70,00				

17885-11	Tumor-freie Lunge	w	60,00				
786-11	Tumor-freie Lunge	m	69,00				
16481-11	Tumor-freie Lunge	m	61,00				
9345-11	Tumor-freie Lunge	w	78,00				
7519-11	Tumor-freie Lunge	m	62,00				
2475-11	COPD-freie Lunge	m	69,00				
9661-11	COPD-freie Lunge	w	66,00				
6591-11	COPD-freie Lunge	w	75,00				
786-11	COPD-freie Lunge	m	69,00				
24885-11	COPD-freie Lunge	w	74,00				
1117-11	COPD-freie Lunge	w	69,00				
2435-11	COPD-freie Lunge	m	66,00				
20980-11	COPD-freie Lunge	w	81,00				
1938-11	COPD-freie Lunge	w	80,00				
BES	Emphysem						
BRUZ	Emphysem						
BSCH	Emphysem						
COTT	Emphysem						
DIKREZ	Emphysem						
EPO	Emphysem						
ESS	Emphysem						
GÜOL	Emphysem						
HAST	Emphysem						
HEHOL	Emphysem						
HEKE	Emphysem						
HEYO	Emphysem						
HEYO	Emphysem						
HIPE	Emphysem						
HOGRA	Emphysem						
ICH	Emphysem						
JON	Emphysem						
JUGA	Emphysem						
KLRI	Emphysem						
MALI	Emphysem						
SIPA	Emphysem						
STI	Emphysem						
WAPL	Emphysem						
WOPE	Emphysem						
WORO	Emphysem						
11014-11	IPF	m	47,00				
15042-10	IPF	m	50,00				
26073-10	IPF	m	66,00				
5239-11	IPF	w	49,00				
17866-09	IPF	w	81,00				
20932-10	IPF	w	71,00				
8625-10	IPF	w	71,00				
11193-11	IPF	w	74,00				

8197-11	IPF	w	68,00				
15919-10	IPF	m	62,00				
15257-12	Adenokarzinom	w	43,00	n.v	n.v	n.v	n.v
66-12	Adenokarzinom	w	65,00	n.v	n.v	n.v	n.v
456-13	Adenokarzinom	m	76,00	2a	1	x	3
2335-12	Adenokarzinom	m	50,00	n.v	n.v	n.v	n.v
2901-13	Adenokarzinom	w	78,00	2b	0	x	3
12849-12	Adenokarzinom	w	85,00	n.v	n.v	n.v	n.v
15913-12	Adenokarzinom	w	95,00	n.v	n.v	n.v	n.v
2304-13	Adenokarzinom	m	55,00	n.v	n.v	n.v	n.v
14530-12	Adenokarzinom	w	78,00	n.v	n.v	n.v	n.v
5569-13	Adenokarzinoma in situ	m	68,00	n.v	n.v	n.v	n.v
54-13	Adenokarzinom	w	50,00	2b	2	x	3
161-13	Adenokarzinom	w	63,00	1b	0	x	3
1250-12	Adenokarzinom (metastase nach Adeno Lu)	w	68,00	n.v	n.v	n.v	n.v
6438-10	Adenokarzinom	w	75,00	2a	2	x	3
6070-13	Plattenepithelkarzinom	w	72,00	4	1	x	3
4796-13	Metastase eines Adenokarzinom Lu	w	57,00	n.v	n.v	n.v	n.v
4569-06	evtl Adeno	m	72,00	n.v	n.v	n.v	n.v
15483-09	Adenokarzinom	w	75,00	2	0	x	3
1218-13	Adenokarzinom	w	50,00	2	0	x	3
5700-13	Metastase eines Adenokarzinom	m	67,00				

Appendix II :Verwendete Primärantikörper

Antigen	Klon	Hersteller	Wirt	Verdünnung	HIER
Bambi	4e8	eBioscience	Maus	1/100 (H+F)	TRIS EDTA pH9
Bambi	polyklonal	Sigma-Aldrich	Maus	1/100 (H)	
Collagen I	polyklonal	Abcam	Kaninchen	1/1000 (H)	
E-Cadherin	ECH6	Zytomed Systems	Maus	1/400 (H), 1/100 (F)	Citratpuffer pH6
HSP47	EPR4217	Abcam	Kaninchen	1/100 (IF)	
pSmad2	138D4	Cell Signalling Technologies	Kaninchen	1/100 (H)	
pSmad3	C25A9	Cell Signalling Technologies	Kaninchen	1/200 (H), 1/100 (F)	Citratpuffer pH6
Smad2	D43B4	Cell Signalling Technologies	Kaninchen		
Smad3	C67H9	Cell Signalling Technologies	Kaninchen	1/200 (H), 1/100 (F)	Citratpuffer pH6
Smad4	EP618Y	Abcam	Kaninchen	1/100	
Smad7	MAB2029	R&D Systems	Maus	1/100 (H)	
Snon	2F6	Abcam	Maus	1/100	
TGF-β	polyklonal	Abcam	Kaninchen	1/200 (H), 1/100 (F)	TRIS EDTA pH9
TTF-1	SPT24	Zytomed Systems	Maus	1/400 (H)	
Vimentin	V9	Zytomed Systems	Maus	1/1000(H), 1/500 (F), 1/200 (IF)	Citratpuffer pH6

IHC Hope (H)/ Formalin (F), Immulfluoreszenz (IF)

Appendix III: Verwendete Reagenzien & Chemikalien

Reagenz/Chemikalie	Hersteller	Anwendung
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	Sigma-Aldrich	Fluoreszenz
10% Ketamin	WDT	Tierversuche
2% Xylazin	Bayer	Tierversuche
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (Hepes)	Roth	allgemein
25% HCl	Merck	allgemein
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	RNA-Isolation
2-Propanol EMSURE	Merck	Entparaffinierung Hope
2x Probes Master Mix	Roche Applied Sciences	qRT-PCR
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	Sigma-Aldrich	MTT-Assay
4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich	Fluoreszenz
Accutase	MilliPore	Primärzellisolation
Agarose Ultra Pure	Invitrogen	Agarose-Gelelektrophorese
Alexa488 goat anti-rabbit/-mouse Sekundärantikörper	Molecular Probes	Fluoreszenz (Immunfluoreszenz)
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck	allgemein
Annexin V APC	BD Pharmingen	Durchflusszytometrie
Antibody Diluent	Zytemed Systems	Immunhistochemie
Aqua ad iniectionabilia Braun	B. Braun Melsungen	Zellkultur
Aceton NormaPur	VWR	Gewebeprozessierung
Azophloxin	Sigma-Aldrich	Histochemie
Azophloxin/ Rot 2G	Merck	allgemein
Biocoll	Biochrom	Primärzellisolation
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	Agarose-Gelelektrophorese
Calciumchlorid	Roth	allgemein
Calciumchlorid-di-Hydrat	Merck	allgemein
CD45 MicroBeads	Miltenyi	Primärzellisolation
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich	HE-Färbung
Citronensäure	Roth	HE-Färbung
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Applied Sciences	Tierversuche
D-Glucose	Roth	allgemein
Diff-Quik-Lösung	Medion Diagnostics	Differenzielle Zellzählung
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck	allgemein
Dispase II	Roche Applied Sciences	Primärzellisolation
Ditmethylsulfoxid	Sigma-Aldrich	TGFb1 Stimulation
DMEM High Glucose Medium (4,5g/l)	PAA	Zellkultur
DM-LB 32 Durchlichtmikroskop	Leica	Immunhistochemie
DMSO	Merck	allgemein
DNase I	Roche Applied Sciences	Primärzellisolation
dNTP Mix, 100 mM	Invitrogen	PCR
Dulbecco's PBS (1x)	PAA	Zellkultur
Eclipse 80i Fluoreszenzmikroskop	Nikon	Fluoreszenz
Eisen(III)-chlorid	Merck	allgemein
Eosin G für die Mikroskopie	Merck	HE-Färbung
Essigsäure rein	Merck	allgemein
Ethanol EMSURE	Merck	Entparaffinierung
Ethidium Bromid Lösung 10 mg/ml	Invitrogen	Agarose-Gelelektrophorese
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Merck	allgemein
FBS Superior	Biochrom	Zellkultur
FCS	PAA	Zellkultur
G418-Sulfat	PAA	Zellkultur
Gasket Slides	Agilent	Transkriptom
Gene Expression Hybridization Kit	Agilent	Transkriptom

Glycerol	Merck	allgemein
Hämatoxin für die Mikroskopie	Merck	HE-Färbung
Hämatoxylin	Merck	allgemein
HistoFix	Carl Roth	Tierversuche
Human GE 4x44K V2 Microarrays	Agilent	Transkriptom
Hybridisierungskammern	Agilent	Transkriptom
Hybridisierungsöfen	Agilent	Transkriptom
Hybridisierungspuffer Kit	Agilent	Transkriptom
Kalialaun	Sigma-Aldrich	HE-Färbung
Kaliumchlorid	Merck	allgemein
LD Säulen	Miltenyi	Primärzellisolation
Lichtgrün SF	Merck	allgemein
Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color	Agilent	Transkriptom
Low Melting Paraffin 52-54°C	DCS	Gewebeprozessierung
Magnesiumsulfat-hepta-Hydrat	Roth	allgemein
Mayers Hämalaun	Merck	Immunhistochemie
MgCl ₂ , 50 mM	Invitrogen	PCR
MicroMatrix 36 ECM Array	MicroStem	Primärzellisolation
MTT Formazan	Sigma-Aldrich	MTT-Assay
MultiGourmet Dampfgerät	Braun	Immunhistochemie
Natriumchlorid	Roth	allgemein
Natriumiodat	Merck	allgemein
Natriumjodat	Merck	HE-Färbung
Natriumpyruvat, 100 mM	PAA	Zellkultur
Non Essential Amino Acids (NEAA), 100x	PAA	Zellkultur
Nylongaze (100, 50 und 20 µm)	Frank Eckert GmbH	Primärzellisolation
OPTI-MEM	Invitrogen	Transfektion
Orange G	Merck	allgemein
Paraplast Plus 56°C Schmelzpunkt	McCormick Scientific	Gewebeprozessierung
pBR322 DNA-Msp I Digest	New England Biolabs	Agarose-Gelelektrophorese
pCMV6-AC-Bambi::GFP Expressionsvektor	Origene	Transfektion
pCMV6-AC-GFP Expressionsvektor	Origene	Transfektion
PCR-Puffer, 10x	Invitrogen	PCR
Penicillin/Streptomycin Lösung, 100x	PAA	Zellkultur
permanent AEC Kit	Zytomed Systems	Immunhistochemie
Pertex Eindeckmedium	Melite	Immunhistochemie
Pipettenspitzen	Sarstedt	allgemein
Pirfenidone	Sigma-Aldrich	TGFb1 Stimulation
Plattenlesegerät	Tecan	MTT-Assay
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween-20)	Roth	allgemein
Ponceau de Xylidine	Merck	allgemein
Prism 4	GraphPad Software	Statistik-Software
QIAmp DNA Mini Kit	Qiagen	DNA-Isolation
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt	allgemein
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	Corning	allgemein
Rhodamine-Phalloidin	Molecular Probes	Fluoreszenz Cytoskelet-Darstellung
RNA 6000 Nano Kit	Agilent	RNA Qualitätskontrolle
Rneasy Mini Kit	Qiagen	RNA-Isolation
Roche Universal Probe Library	Roche Applied Sciences	qRT-PCR
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	PAA	Zellkultur
Salzsäure, rauchend, 37%	Merck	Immunhistochemie
Säurefuchsin	Merck	allgemein
Säurefuchsin	Merck	Histochemie
SB431542	Sigma-Aldrich	TGFb1 Stimulation

Spike In Kit, One-Color RNA	Agilent	Transkriptom
Stable Glutamin (L-Alanyl Glutamin) 200 mM	PAA	Zellkultur
TGFb1, human; CHO-derived	Peprotech	TGFb1 Stimulation
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth	allgemein
Tri-Natriumacetatdihydrat	Merck	Immunhistochemie
Tris-EDTA Lösung, 10x	PAA	Zellkultur
TRIS-EDTA pH9, HIER Puffer	Zytomed Systems	Immunhistochemie
TRITC goat anti-rabbit/mouse Sekundärantikörper	Molecular Probes	Fluoreszenz (Immunfluoreszenz)
Trypsin-EDTA	Gibco	Zellkultur
TurboFect in vitro Transfektionsreagenz	Fermentas	Transfektion
Tween 20	Sigma-Aldrich	Immunhistochemie
Wasserstoffperoxid 30%	Merck	Immunhistochemie
Wolframatophosphorsäure	Merck	allgemein
Xylencyanol	Sigma-Aldrich	Agarose-Gelelektrophorese
Xylencyanol für die Elektrophorese	Merck	allgemein
Xylol	Merck	Entparaffinierung (Formalin)
Zellkulturgefäße (Platten, Flaschen)	Corning	allgemein
Zytochem Plus HRP Polymer Kit	Zytomed Systems	Immunhistochemie

Appendix IV: Verwendete Geräte

Geräte-Art	Hersteller	Modell	Anwendung
Array-Halterung	Agilent	Objekträgerhalter	Transkriptom-Analysen
Bioanalyzer	Agilent	2100	Bioanalyzer/ RNA QC
CCD-Kamera	Lumenera	Infinity 4	Immunhistochemie
Durchlichtmikroskop	Leica	DM-LB 32	Immunhistochemie
Elektrophorese-Kammer	BioRad	Wide Mini-Sub Cell GT	Agarose-Gelelektrophorese
Fluoreszenz-Kamera	Qimaging	Qi Cam Fast 1391	Fluoreszenz
Geldokumentations-System	Intas	GDS SI	Agarose-Gelelektrophorese
Glasküvetten und - Schlitten	Roth		Immunhistochemie
Heizblock	Hybaid	Omn-E	Bioanalyzer/ RNA QC
Heizblock mit Schüttelfunktion	Biosan	TS-TOC	Transkriptom-Analysen
Homogenisator	VWR	Pellet Mixer	Nukleinsäureisolation
Hybridisierungskammer	Shel Lab	SL	Transkriptom-Analysen
Kanüle	BD	Microlance 3 Nr.20	Tierversuch
MACS-Magnet	Miltenyi	Midi MACS	Primärzellisolation
MACS-Magnet-Halter	Miltenyi	MACS Multi Stand	Primärzellisolation
Microarray Scanner	Agilent	SureScan	Transkriptom-Analysen
Microarrays	Agilent	Human GE 4x44 V2	Transkriptom-Analysen
Mikrotiterplatten-Zentrifuge	Peqlab	Perfect Spin P	Real-Time PCR
Mikrotom	Leica	SM 2000R	Immunhistochemie
Plattenlesegerät	Tecan	Infinito F50	MTT-Assay
Real-Time Cyclor	Roche Applied Sciences	LightCycler 480 II	qRT-PCR
Rotationsgerät	Heto Lab	RK 20-VS	Nukleinsäureisolation
Spannungsgeber	Amersham	EPS 350 XL	Agarose-Gelelektrophorese
Thermocycler	Biometra	T Professional	PCR/cDNA Synthese
Tissue Array Stanzer	Beecher Instruments	MTA1	Tissue-Micro-Arrays
Trachealkanüle	Hugo Sachs Electronics	Trachealkanüle 1,0mm	Tierversuch
UV-Spektrophotometer	Pharmacia Biotech	Ultrospec 1000	Chondrex-Assay (Sirius Red)
UV-Spektrophotometer	Thermo Scientific	NanoDrop 2000	Nukleinsäurequantifizierung
Vortexer	IKA	MS 3	Bioanalyzer/ RNA QC
Zählkammer	Marienfeld	Neubauer Zählkammer	Tierversuch/Zellkultur

Zentrifuge	Savant	SpeedVac SC110	Unterdruckzentrifugation
Zentrifuge	Sigma	4K15	Zellkultur
Zentrifuge	Shandon	Cytospin 3	Zytozentrifugationspräparation
Zentrifuge	Eppendorf	MiniSpin	Nukleinsäureisolation
Zentrifuge	Hettich	EBA12	Nukleinsäureisolation

Appendix V: Verwendete Oligonukleotide

Benennung	Organismus Mensch (h), Maus (m)	Sequenz (5'-3')	Annealing Temperatur (°C)	UPL-Sonde Nr	Gene-ID Input
h-COL1A_p_for	h	gggattccctggacctaaag	59		
h-COL1A_p_rev	h	ggaacacctcgctctcca	59	67	NM_000088.3
h-RPL32_p_for	h	ccaccgtcccttctctct	59		
h-RPL32_p_rev	h	gggcttcacaaggggtct	60	10	NM_000994.3
m-COL1A1_p_for	m	catgttcagctttgtggacct	60		
m-COL1A1_p_rev	m	gcagctgacttcagggatgt	60	15	NM_007742.3
m-FN1_p_for	m	cggagagagtgtcccacta	59		NM_010233.1
m-FN1_p_rev	m	cgatattggtgaatcgaga	59	52	
m-RPL32_p_for	m	ttcctggtccacaatgtcag	59		
m-RPL32_p_rev	m	ttgtgagcaatctcagcaca	59	78	BC086909.1
Bambi wt_for	m	gagtggtctttatgtctgcctgagc	59		
Bambi wt_rev	m	catgctgataccggttctctgtcc	59		
Bambi neo_for	m	gcagcctctgttccacatacactc	59		
Bambi neo_rev	m	cacaccagacaagcaagcatcttacc	59		

Appendix VI: Ergebnisse der GO-Analyse

GO-Term	p-Wert
G-protein coupled receptor binding	7,6E-03
RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding transcription factor activity	2,5E-02
RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific DNA binding transcription factor activity involved in positive regulation of transcription	2,5E-02
actin cytoskeleton	5,5E-04
actin filament	1,1E-02
anatomical structure development	4,7E-15
anatomical structure formation involved in morphogenesis	2,7E-03
anatomical structure morphogenesis	4,3E-08
androsterone dehydrogenase activity	2,5E-02
axon development	1,3E-02
axon guidance	1,7E-03
axonogenesis	1,3E-02
basement membrane	2,9E-03
biological adhesion	6,7E-07

biological regulation	6,5E-03
blood coagulation	4,4E-02
blood vessel development	8,1E-03
brain development	8,2E-03
cardiovascular system development	1,9E-05
cartilage development	2,7E-03
cation channel complex	1,4E-02
cell adhesion	6,4E-07
cell communication	1,4E-05
cell development	3,5E-07
cell differentiation	1,4E-07
cell junction organization	1,4E-02
cell migration	2,0E-03
cell morphogenesis	5,6E-03
cell morphogenesis involved in differentiation	1,5E-03
cell morphogenesis involved in neuron differentiation	1,7E-02
cell motility	3,0E-03
cell part morphogenesis	2,7E-02
cell periphery	3,5E-07
cell projection morphogenesis	2,2E-02
cell projection organization	5,6E-03
cell surface receptor signaling pathway	6,8E-03
cell-cell adhesion	2,5E-02
cell-cell signaling	2,8E-03
cellular component morphogenesis	2,2E-03
cellular component movement	3,4E-08
cellular developmental process	2,1E-07
cellular response to chemical stimulus	1,8E-02
cellular response to stimulus	1,9E-05
central nervous system development	2,2E-03
chemotaxis	2,7E-03
circulatory system development	1,9E-05
coagulation	4,4E-02
connective tissue development	1,7E-02
contractile fiber	3,4E-03
contractile fiber part	8,7E-03
cornea development in camera-type eye	1,7E-02
cytokine activity	1,0E-02
cytoplasmic membrane-bounded vesicle lumen	1,7E-02
development of primary sexual characteristics	3,6E-02
developmental process	1,7E-14
developmental process involved in reproduction	3,6E-04
embryo development	2,6E-02
embryo implantation	1,0E-02
embryonic morphogenesis	3,5E-02
embryonic organ development	1,4E-02
enzyme inhibitor activity	4,0E-02
epithelial tube morphogenesis	1,4E-02
epithelium development	3,3E-03

extracellular matrix	2,9E-07
extracellular matrix part	2,1E-02
extracellular region	7,2E-18
extracellular region part	2,3E-12
extracellular space	5,1E-11
female pregnancy	1,8E-02
forebrain development	2,5E-02
generation of neurons	6,4E-05
growth	1,1E-02
growth factor activity	4,8E-04
heart development	2,5E-02
hemostasis	2,8E-02
hormone activity	7,4E-06
hormone metabolic process	3,0E-02
inflammatory response	3,7E-02
kidney development	3,1E-03
lens development in camera-type eye	1,8E-02
leukocyte migration	5,0E-02
localization of cell	3,0E-03
locomotion	1,5E-05
lung development	1,9E-03
lung morphogenesis	2,7E-02
membrane	3,7E-02
mesenchymal cell differentiation	2,4E-02
mesenchyme development	5,5E-03
monocarboxylic acid binding	9,7E-03
morphogenesis of a branching epithelium	2,7E-03
morphogenesis of a branching structure	5,0E-04
morphogenesis of an epithelial bud	1,7E-02
morphogenesis of an epithelium	2,7E-03
multi-multicellular organism process	5,0E-02
multi-organism reproductive process	2,7E-02
multicellular organismal development	5,8E-15
multicellular organismal process	5,0E-16
muscle contraction	3,6E-04
muscle organ development	2,8E-03
muscle structure development	3,6E-03
muscle system process	3,1E-04
muscle tissue development	8,1E-03
myofibril	1,9E-03
negative regulation of developmental process	1,3E-02
negative regulation of gonadotropin secretion	8,0E-03
negative regulation of hormone secretion	1,8E-02
negative regulation of hydrolase activity	2,9E-02
negative regulation of peptidase activity	3,0E-02
negative regulation of transport	3,1E-02
nervous system development	1,3E-07
neurogenesis	3,7E-05
neuron development	2,8E-03

neuron differentiation	1,3E-04
neuron projection development	7,1E-03
neuron projection guidance	1,7E-03
neuron projection morphogenesis	1,8E-02
odontogenesis	2,6E-02
organ development	1,8E-11
organ morphogenesis	5,7E-06
ossification	1,4E-02
peptidase inhibitor activity	1,2E-02
peptidase regulator activity	1,6E-02
plasma membrane	2,5E-06
plasma membrane part	3,4E-02
platelet alpha granule	1,5E-02
platelet alpha granule lumen	9,7E-03
platelet degranulation	4,8E-02
positive regulation of biological process	1,4E-02
positive regulation of cell communication	1,3E-02
positive regulation of cell differentiation	1,6E-02
positive regulation of cell migration	4,4E-02
positive regulation of cell proliferation	9,7E-03
positive regulation of cellular component movement	3,4E-02
positive regulation of cellular process	4,8E-02
positive regulation of developmental process	4,4E-06
positive regulation of multicellular organismal process	6,4E-05
positive regulation of neural precursor cell proliferation	3,1E-02
positive regulation of phosphorylation	4,7E-02
positive regulation of response to stimulus	3,7E-02
positive regulation of signal transduction	4,9E-03
positive regulation of signaling	1,4E-02
prostatic bud formation	2,5E-02
proteinaceous extracellular matrix	1,4E-06
receptor binding	5,6E-09
regeneration	5,2E-04
regulation of anatomical structure morphogenesis	1,4E-02
regulation of biological process	7,5E-03
regulation of biological quality	2,5E-02
regulation of body fluid levels	8,7E-03
regulation of cell adhesion	4,8E-02
regulation of cell development	2,2E-02
regulation of cell differentiation	5,6E-03
regulation of cell migration	4,4E-02
regulation of cell proliferation	3,7E-04
regulation of cellular component movement	3,1E-02
regulation of cellular process	4,3E-02
regulation of developmental process	1,3E-05
regulation of endocrine process	7,1E-03
regulation of gonadotropin secretion	3,1E-02
regulation of hormone levels	2,5E-02
regulation of localization	2,1E-03

regulation of multicellular organismal development	3,2E-06
regulation of multicellular organismal process	6,6E-07
regulation of nervous system development	9,7E-03
regulation of system process	2,3E-02
regulation of transport	2,7E-03
renal system development	1,5E-03
reproductive process	2,6E-02
reproductive structure development	2,6E-03
reproductive system development	2,6E-03
respiratory system development	2,9E-03
respiratory tube development	2,5E-03
response to chemical stimulus	3,2E-05
response to endogenous stimulus	1,4E-03
response to external stimulus	1,6E-02
response to hormone stimulus	4,2E-03
response to lipid	2,9E-03
response to organic substance	1,6E-02
response to oxygen levels	2,2E-02
response to oxygen-containing compound	2,6E-02
response to steroid hormone stimulus	3,6E-02
response to stimulus	2,4E-08
response to wounding	1,4E-07
sarcomere	2,7E-03
secretory granule lumen	1,1E-02
sensory organ development	2,0E-02
sex differentiation	2,9E-02
signal transduction	1,9E-05
signaling	1,7E-06
single organism signaling	1,7E-06
single-multicellular organism process	8,0E-17
single-organism cellular process	8,4E-05
single-organism developmental process	4,3E-11
single-organism process	1,6E-06
skeletal system development	2,9E-05
smooth muscle contraction	4,2E-03
stem cell development	2,7E-03
stem cell differentiation	8,0E-05
system development	6,0E-15
system process	8,3E-03
taxis	2,7E-03
tissue development	2,6E-09
tissue morphogenesis	1,5E-05
tissue regeneration	1,4E-02
transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	4,4E-02
tube development	3,2E-05
tube morphogenesis	2,6E-03
urogenital system development	4,1E-04
vasculature development	5,0E-04
vesicle lumen	2,2E-02

voltage-gated cation channel activity	1,4E-02
wound healing	7,5E-04

GO-Analyse der mit einem Benjamini-Yekutieli korrigiertem p-Wert von $\leq 0,05$ als Grenzwert.
 ECM/Fibrosierung, Differenzierung und Adhäsion/Cytoskelett assoziierte Begriffe farblich
 gekennzeichnet

Appendix VII: Input-Liste für Microarray-Analysen TGF β Weg

GeneSymbol	Description
ADAM12	Homo sapiens ADAM metallopeptidase domain 12 (ADAM12), transcript variant 2, mRNA [NM_021641]
BAMBI	Homo sapiens BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (<i>Xenopus laevis</i>) (BAMBI), mRNA [NM_012342]
BMP4	Homo sapiens bone morphogenetic protein 4 (BMP4), transcript variant 1, mRNA [NM_001202]
CDH2	Homo sapiens cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal) (CDH2), mRNA [NM_001792]
CDKN1A	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A), transcript variant 2, mRNA [NM_078467]
CDKN2B	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4) (CDKN2B), transcript variant 1, mRNA [NM_004936]
CITED1	Homo sapiens Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1 (CITED1), transcript variant 1, mRNA [NM_004143]
CITED2	Homo sapiens Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2 (CITED2), transcript variant 1, mRNA [NM_006079]
CREBBP	Homo sapiens CREB binding protein (CREBBP), transcript variant 1, mRNA [NM_004380]
CTNNB1	Homo sapiens catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa (CTNNB1), transcript variant 1, mRNA [NM_001904]
EGF	Homo sapiens epidermal growth factor (EGF), transcript variant 1, mRNA [NM_001963]
ENG	Homo sapiens endoglin (ENG), transcript variant 2, mRNA [NM_000118]
EP300	Homo sapiens E1A binding protein p300 (EP300), mRNA [NM_001429]
FKBP1A	Homo sapiens FK506 binding protein 1A, 12kDa (FKBP1A), transcript variant 2, mRNA [NM_054014]
FOS	Homo sapiens FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS), mRNA [NM_005252]
FOSB	Homo sapiens FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B (FOSB), transcript variant 1, mRNA [NM_006732]
FOSL1	Homo sapiens FOS-like antigen 1 (FOSL1), mRNA [NM_005438]
FOSL2	Homo sapiens FOS-like antigen 2 (FOSL2), mRNA [NM_005253]
FOXH1	Homo sapiens forkhead box H1 (FOXH1), mRNA [NM_003923]
FST	Homo sapiens follistatin (FST), transcript variant FST344, mRNA [NM_013409]
HRAS	Homo sapiens v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog (HRAS), transcript variant 1, mRNA [NM_005343]
ID1	Homo sapiens inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein (ID1), transcript variant 1, mRNA [NM_002165]
ID2	Homo sapiens inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein (ID2), mRNA [NM_002166]
ID2	Homo sapiens inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein (ID2), mRNA [NM_002166]
ID3	Homo sapiens inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein (ID3), mRNA [NM_002167]
ID4	Homo sapiens inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein (ID4), mRNA [NM_001546]
IFNG	Homo sapiens interferon, gamma (IFNG), mRNA [NM_000619]
INHBA	Homo sapiens inhibin, beta A (INHBA), mRNA [NM_002192]
ITGB6	Homo sapiens integrin, beta 6 (ITGB6), mRNA [NM_000888]
JAK1	Homo sapiens Janus kinase 1 (JAK1), mRNA [NM_002227]
JUNB	Homo sapiens jun B proto-oncogene (JUNB), mRNA [NM_002229]
KLF10	Homo sapiens Kruppel-like factor 10 (KLF10), transcript variant 1, mRNA [NM_005655]
LEF1	Homo sapiens lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF1), transcript variant 1, mRNA [NM_016269]
LEFTY1	Homo sapiens left-right determination factor 1 (LEFTY1), mRNA [NM_020997]
LEFTY2	Homo sapiens left-right determination factor 2 (LEFTY2), transcript variant 1, mRNA [NM_003240]
LIF	Homo sapiens leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor) (LIF), mRNA [NM_002309]
LTBP1	Homo sapiens latent transforming growth factor beta binding protein 1 (LTBP1), transcript variant 1, mRNA [NM_206943]
MAPK3	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3), transcript variant 1, mRNA [NM_002746]

MAPK9	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 9 (MAPK9), transcript variant JNK2-a2, mRNA [NM_002752]
MYC	Homo sapiens v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (MYC), mRNA [NM_002467]
NFKB1	Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (NFKB1), transcript variant 1, mRNA [NM_003998]
NOG	Homo sapiens noggin (NOG), mRNA [NM_005450]
RHOA	ras homolog gene family, member A [Source:HGNC Symbol;Acc:667] [ENST00000265538]
RUNX2	Homo sapiens runt-related transcription factor 2 (RUNX2), transcript variant 3, mRNA [NM_004348]
RUNX3	Homo sapiens runt-related transcription factor 3 (RUNX3), transcript variant 1, mRNA [NM_001031680]
SKI	Homo sapiens v-ski sarcoma viral oncogene homolog (avian) (SKI), mRNA [NM_003036]
SKIL	Homo sapiens SKI-like oncogene (SKIL), transcript variant 1, mRNA [NM_005414]
SMAD1	Homo sapiens SMAD family member 1 (SMAD1), transcript variant 1, mRNA [NM_005900]
SMAD2	Homo sapiens SMAD family member 2 (SMAD2), transcript variant 2, mRNA [NM_001003652]
SMAD3	Homo sapiens SMAD family member 3 (SMAD3), transcript variant 1, mRNA [NM_005902]
SMAD4	Homo sapiens SMAD family member 4 (SMAD4), mRNA [NM_005359]
SMAD5	Homo sapiens SMAD family member 5 (SMAD5), transcript variant 2, mRNA [NM_001001419]
SMAD6	Homo sapiens SMAD family member 6 (SMAD6), transcript variant 1, mRNA [NM_005585]
SMAD7	Homo sapiens SMAD family member 7 (SMAD7), transcript variant 1, mRNA [NM_005904]
SMAD9	Homo sapiens SMAD family member 9 (SMAD9), transcript variant b, mRNA [NM_005905]
SMURF1	Homo sapiens SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1 (SMURF1), transcript variant 1, mRNA [NM_020429]
SMURF2	Homo sapiens SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 (SMURF2), mRNA [NM_022739]
SNAI1	Homo sapiens snail homolog 1 (Drosophila) (SNAI1), mRNA [NM_005985]
SNAI2	Homo sapiens snail homolog 2 (Drosophila) (SNAI2), mRNA [NM_003068]
SNIP1	Homo sapiens Smad nuclear interacting protein 1 (SNIP1), mRNA [NM_024700]
SPP1	Homo sapiens secreted phosphoprotein 1 (SPP1), transcript variant 1, mRNA [NM_001040058]
STAT3	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor) (STAT3), transcript variant 3, mRNA [NM_213662]
TFE3	Homo sapiens transcription factor binding to IGHM enhancer 3 (TFE3), mRNA [NM_006521]
TGFB1	Homo sapiens transforming growth factor, beta 1 (TGFB1), mRNA [NM_000660]
TGFB2	Homo sapiens transforming growth factor, beta 2 (TGFB2), transcript variant 2, mRNA [NM_003238]
TGFB3	Homo sapiens transforming growth factor, beta 3 (TGFB3), mRNA [NM_003239]
TGFB1	Homo sapiens transforming growth factor, beta-induced, 68kDa (TGFB1), mRNA [NM_000358]
TGFBR1	Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor 1 (TGFBR1), transcript variant 1, mRNA [NM_004612]
TGFBR2	Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (TGFBR2), transcript variant 1, mRNA [NM_001024847]
TGFBR3	Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor III (TGFBR3), transcript variant 1, mRNA [NM_003243]
TGIF1	TGFB-induced factor homeobox 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:11776] [ENST00000551557]
TGIF2	Homo sapiens TGFB-induced factor homeobox 2 (TGIF2), transcript variant 2, mRNA [NM_021809]
THBS1	Homo sapiens thrombospondin 1 (THBS1), mRNA [NM_003246]
WNT1	Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family, member 1 (WNT1), mRNA [NM_005430]
ZEB1	Homo sapiens zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1), transcript variant 1, mRNA [NM_001128128]
ZEB2	Homo sapiens zinc finger E-box binding homeobox 2 (ZEB2), transcript variant 1, mRNA [NM_014795]
ZFYVE9	Homo sapiens zinc finger, FYVE domain containing 9 (ZFYVE9), transcript variant 2, mRNA [NM_007323]
ZNF423	Homo sapiens zinc finger protein 423 (ZNF423), mRNA [NM_015069]
ZYX	Homo sapiens zyxin (ZYX), transcript variant 1, mRNA [NM_003461]

Appendix VIII: Input Liste für Microarray-Analysen ECM-Moleküle

Gene Symbol	Description
ACTA1	Homo sapiens actin, alpha 1, skeletal muscle (ACTA1), mRNA [NM_001100]
ACTA2	Homo sapiens actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (ACTA2), transcript variant 2, mRNA [NM_001613]

AHNAK	Homo sapiens AHNAK nucleoprotein (AHNAK), transcript variant 2, mRNA [NM_024060]
CALD1	Homo sapiens caldesmon 1 (CALD1), transcript variant 1, mRNA [NM_033138]
CAMK2N1	Homo sapiens calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1 (CAMK2N1), mRNA [NM_018584]
CAV2	Homo sapiens caveolin 2 (CAV2), transcript variant 1, mRNA [NM_001233]
CDH1	Homo sapiens cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial) (CDH1), mRNA [NM_004360]
CDH2	Homo sapiens cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal) (CDH2), mRNA [NM_001792]
CEBPB	Homo sapiens CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta (CEBPB), mRNA [NM_005194]
CLDN1	Homo sapiens claudin 1 (CLDN1), mRNA [NM_021101]
COL1A1	Homo sapiens collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA [NM_000088]
COL1A2	Homo sapiens collagen, type I, alpha 2 (COL1A2), mRNA [NM_000089]
COL3A1	Homo sapiens collagen, type III, alpha 1 (COL3A1), mRNA [NM_000090]
COL4A1	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 1 (COL4A1), mRNA [NM_001845]
COL4A2	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 2 (COL4A2), mRNA [NM_001846]
COL4A3	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) (COL4A3), mRNA [NM_000091]
COL4A4	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 4 (COL4A4), mRNA [NM_000092]
COL5A1	Homo sapiens collagen, type V, alpha 1 (COL5A1), mRNA [NM_000093]
COL5A2	Homo sapiens collagen, type V, alpha 2 (COL5A2), mRNA [NM_000393]
COL5A3	Homo sapiens collagen, type V, alpha 3 (COL5A3), mRNA [NM_015719]
CREBBP	Homo sapiens CREB binding protein (CREBBP), transcript variant 1, mRNA [NM_004380]
CTGF	Homo sapiens connective tissue growth factor (CTGF), mRNA [NM_001901]
DSP	Homo sapiens desmoplakin (DSP), transcript variant 1, mRNA [NM_004415]
ELN	Homo sapiens elastin (ELN), transcript variant 1, mRNA [NM_000501]
FN1	Homo sapiens fibronectin 1 (FN1), transcript variant 7, mRNA [NM_054034]
FOXH1	Homo sapiens forkhead box H1 (FOXH1), mRNA [NM_003923]
HS3ST3A1	Homo sapiens heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1 (HS3ST3A1), mRNA [NM_006042]
HS6ST1	Homo sapiens heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1 (HS6ST1), mRNA [NM_004807]
HSPG2	Homo sapiens heparan sulfate proteoglycan 2 (HSPG2), mRNA [NM_005529]
ITGA1	Homo sapiens integrin, alpha 1 (ITGA1), mRNA [NM_181501]
ITGB1	Homo sapiens integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12) (ITGB1), transcript variant 1E, mRNA [NM_133376]
ITGB5	Homo sapiens integrin, beta 5 (ITGB5), mRNA [NM_002213]
ITGB6	Homo sapiens integrin, beta 6 (ITGB6), mRNA [NM_000888]
LAMB1	Homo sapiens laminin, beta 1 (LAMB1), mRNA [NM_002291]
LAMC1	Homo sapiens laminin, gamma 1 (formerly LAMB2) (LAMC1), mRNA [NM_002293]
LEF1	Homo sapiens lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF1), transcript variant 1, mRNA [NM_016269]
LOX	Homo sapiens lysyl oxidase (LOX), transcript variant 1, mRNA [NM_002317]
LOXL2	Homo sapiens lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), mRNA [NM_002318]
MMP1	Homo sapiens matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) (MMP1), transcript variant 1, mRNA [NM_002421]
MMP11	Homo sapiens matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3) (MMP11), mRNA [NM_005940]
MMP13	Homo sapiens matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) (MMP13), mRNA [NM_002427]
MMP14	Homo sapiens matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted) (MMP14), mRNA [NM_004995]
MMP2	Homo sapiens matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase) (MMP2), transcript variant 1, mRNA [NM_004530]
MMP3	Homo sapiens matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase) (MMP3), mRNA [NM_002422]
MMP9	Homo sapiens matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase) (MMP9), mRNA [NM_004994]
MSN	Homo sapiens moesin (MSN), mRNA [NM_002444]
NKX2-1	Homo sapiens NK2 homeobox 1 (NKX2-1), transcript variant 2, mRNA [NM_003317]
NKX2-2	Homo sapiens NK2 homeobox 2 (NKX2-2), mRNA [NM_002509]
OCLN	Homo sapiens occludin (OCLN), transcript variant 1, mRNA [NM_002538]
PLAT	Homo sapiens plasminogen activator, tissue (PLAT), transcript variant 1, mRNA [NM_000930]
PLAU	Homo sapiens plasminogen activator, urokinase (PLAU), transcript variant 1, mRNA [NM_002658]
PLG	Homo sapiens plasminogen (PLG), transcript variant 1, mRNA [NM_000301]
PXN	Homo sapiens paxillin (PXN), transcript variant 3, mRNA [NM_001243756]

SERBP1	Homo sapiens SERPINE1 mRNA binding protein 1 (SERBP1), transcript variant 1, mRNA [NM_001018067]
SERPIN H1	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1) (SERPINH1), transcript variant 1, mRNA [NM_001207014]
SNAI1	Homo sapiens snail homolog 1 (Drosophila) (SNAI1), mRNA [NM_005985]
SNAI2	Homo sapiens snail homolog 2 (Drosophila) (SNAI2), mRNA [NM_003068]
TCF4	Homo sapiens transcription factor 4 (TCF4), transcript variant 2, mRNA [NM_003199]
TIMP1	Homo sapiens TIMP metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP1), mRNA [NM_003254]
TIMP2	Homo sapiens TIMP metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP2), mRNA [NM_003255]
TIMP3	Homo sapiens TIMP metalloproteinase inhibitor 3 (TIMP3), mRNA [NM_000362]
TIMP4	Homo sapiens TIMP metalloproteinase inhibitor 4 (TIMP4), mRNA [NM_003256]
TJP1	Homo sapiens tight junction protein 1 (zona occludens 1) (TJP1), transcript variant 1, mRNA [NM_003257]
TJP2	Homo sapiens tight junction protein 2 (zona occludens 2) (TJP2), transcript variant 2, mRNA [NM_201629]
TJP3	Homo sapiens tight junction protein 3 (zona occludens 3) (TJP3), mRNA [NM_014428]
TLN1	talin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:11845] [ENST00000378192]
VEGFA	Homo sapiens vascular endothelial growth factor A (VEGFA), transcript variant 6, mRNA [NM_001025370]
VEGFB	Homo sapiens vascular endothelial growth factor B (VEGFB), transcript variant VEGFB-186, mRNA [NM_003377]
VEGFC	Homo sapiens vascular endothelial growth factor C (VEGFC), mRNA [NM_005429]
VIM	Homo sapiens vimentin (VIM), mRNA [NM_003380]
ZEB1	Homo sapiens zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1), transcript variant 1, mRNA [NM_001128128]
COL7A1	Homo sapiens collagen, type VII, alpha 1 (COL7A1), mRNA [NM_000094]
COL10A 1	Homo sapiens collagen, type X, alpha 1 (COL10A1), mRNA [NM_000493]
COL22A 1	Homo sapiens collagen, type XXII, alpha 1 (COL22A1), mRNA [NM_152888]
COL4A6	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 6 (COL4A6), transcript variant B, mRNA [NM_033641]
COL7A1	Homo sapiens collagen, type VII, alpha 1 (COL7A1), mRNA [NM_000094]
VTN	Homo sapiens vitronectin (VTN), mRNA [NM_000638]
PTK2	Homo sapiens PTK2 protein tyrosine kinase 2 (PTK2), transcript variant 1, mRNA [NM_153831]
PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:9611] [ENST00000342207]
CSK	Homo sapiens c-src tyrosine kinase (CSK), transcript variant 1, mRNA [NM_004383]
DSP	Homo sapiens desmoplakin (DSP), transcript variant 1, mRNA [NM_004415]
KLF8	Homo sapiens Kruppel-like factor 8 (KLF8), transcript variant 1, mRNA [NM_007250]
ZEB2	Homo sapiens zinc finger E-box binding homeobox 2 (ZEB2), transcript variant 1, mRNA [NM_014795]
ELF3	Homo sapiens E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific) (ELF3), transcript variant 1, mRNA [NM_004433]
ELF5	Homo sapiens E74-like factor 5 (ets domain transcription factor) (ELF5), transcript variant 1, mRNA [NM_198381]
RHOA	Homo sapiens ras homolog gene family, member A (RHOA), mRNA [NM_001664]
SOX4	Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-box 4 (SOX4), mRNA [NM_003107]
MUC1	Homo sapiens mucin 1, cell surface associated (MUC1), transcript variant 1, mRNA [NM_002456]
CTNNB1	Homo sapiens catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa (CTNNB1), transcript variant 3, mRNA [NM_001098210]

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachtes Schema des kanonischen TGF β Signalwegs und seiner Kreuzkommunikation (nach Moustakas & Heldin 2009 sowie Xu et al., 2009).....	13
Abbildung 2: Mögliche Ursprünge kollagenproduzierender Myofibroblasten in der IPF (nach Willis et al., 2006; Kasai et al., 2005; Kim et al., 2007).	15
Abbildung 3: Herstellung histologischer Schnittpräparate.....	26
Abbildung 4: Die Expression der TGF β -Signalwegsmediatoren im tumorfreien Lungengewebe.	52
Abbildung 5: Verteilung der Expressionsmuster des TGF β -Signalwegs in Abhängigkeit von Zelltyp und Erkrankung.	55
Abbildung 6: Kein signifikanter Unterschied in der Gewichtsabnahme der <i>Bambi</i> ^{-/-} -Tiere verglichen mit Wt-Tieren im Verlauf des Bleomycin-Versuches.....	56
Abbildung 7: Der Knockout von <i>Bambi</i> zeigt keinen Unterschied im Bleomycin-Modell der Lungenfibrose auf histomorphologischer Ebene.	58
Abbildung 8: Einfluss der Bleomycin-Applikationsmenge auf die Mortalität sowie die Schwere der Fibrosierung.....	59
Abbildung 9: Der Knockout von <i>Bambi</i> zeigt keinen Unterschied in dem zellulären Anteil der BAL im Bleomycin-Modell der Lungenfibrose unabhängig von dem Applikationsprotokoll.	60
Abbildung 10: Der Knockout von <i>Bambi</i> bedingt keinen signifikanten Unterschied bei Lungenvolumen und TGF β 1 in der BALF unabhängig vom Applikationsprotokoll.	61
Abbildung 11: Die TGF β 1-induzierte Expression von Kollagen 1A1 ist signifikant erhöht in den Lungen von <i>Bambi</i> ^{-/-} -Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.	62
Abbildung 12: Die transiente Überexpression von BAMBI in A549-Zellen bedingt eine geringere Vitalität sowie eine Resistenz gegen den antiproliferativen Effekt von TGF β	63
Abbildung 13: Der TGF β -Signalweg moduliert das Aktin-Zytoskelett-Remodelling in humanen, primären AECII.	65
Abbildung 14: Einfluss ansteigender Konzentration von TGF β auf das Zytoskelett-Remodelling von AECII.	66
Abbildung 15: Der TGF β -Signalweg kontrolliert die Expression epithelialer und mesenchymaler Marker von primären humanen Alveolären Epithelzellen Typ II.....	68
Abbildung 16: Die Kollagen 1A1-Expression von humanen AECII ist TGF β abhängig	69
Abbildung 17: TGF β 1 beeinflusst die Kollagensynthese und Vimentin-Expression in primären AECII..	70
Abbildung 18: Induktion der Kollagensynthese durch TGF β 1.....	71
Abbildung 19: Signifikant differenziell regulierte Gene des TGF β -Signalwegs in AECII durch TGF β und SB431542 Stimulation nach 48 h.	72
Abbildung 20: Der TGF β -Signalweg reguliert epitheliale und mesenchymale Marker sowie Kollagene in AECII.	74
Abbildung 21: Modulationsmöglichkeiten in der AECII-Kultur.....	75
Abbildung 22: Exemplarische Darstellung der TGF β -Signalwegsmoleküle in humanem Gewebematerial.	77

Abbildung 23: Zusammenfassende Balkengrafik der beobachteten Expression im untersuchten Kollektiv von 157 Lungenkrebsgeweben und 23 tumorfreien Lungen in Abhängigkeit des Färbescores.....	78
Abbildung 24: Unterschiedliche Expression der Signalwegsmediatoren zwischen Lungenkrebs und AECII.	80
Abbildung 25: Darstellung des TGF β -Signalwegs in immortalisierten Lungenkrebszelllinien.	81
Abbildung 26: Differenzielle Genexpression des TGF β -Signalwegs bei Lungenkrebs und tumor-freier Lunge.....	85
Abbildung 27: Signifikant differenziell exprimierte Gene des TGF β -Signalwegs zwischen Tumor-freier Lunge, Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom.	86
Abbildung 28: Darstellung des TGF β -Signalwegs auf Genexpressionsebene im Vergleich von Lungenkrebs und tumor-freier Lunge.	87
Abbildung 29: Keine Expression von BAMBI auf Protein-Ebene im Karzinoid.	89
Abbildung 30: Differenzielle epigenetische Modifikationen des TGF β -Signalwegs bei Lungenkrebs und Tumor-freier Lunge.....	90
Abbildung 31: Unterscheidung von Tumor-freier Lunge und Tumorgewebe aufgrund des Methylierungsgrades von BAMBI.	91
Abbildung 32: BAMBI-exprimierende A549-Zellen zeigen eine Reduktion der Ki67-Expression..	93
Abbildung 33: Die Expression von BAMBI in A549-Zellen führt zu Apoptose.	94
Abbildung 34: Einfluss der retroviralen Transfektion von <i>BAMBI</i> mit Doxycyclin-induzierbaren Konstrukten auf Proliferation (A) und SMAD-Phosphorylierung (B).	95
Abbildung 35: Expression signifikant regulierter, EMT-assoziierte Gene im Lungenkrebs.....	98
Abbildung 36: BAMBI wird in 50% der EGFR-mutierten Lungentumoren exprimiert.....	100
Abbildung 37: TGF β -abhängige EMT in primären, humanen AECII	110
Abbildung 38: Schema der Expression von BAMBI in Abhängigkeit der Malignität.....	117
Abbildung 39: Zusammenfassendes Schema der Rolle von BAMBI im gesunden Gewebe (A), Tumor (B) und bei forcierter Expression im Krebs (C).....	120

11. Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
AECI	<i>Alveolar epithelial cell Type I</i> ; Alveoläre Epithelzelle Typ I
AECII	<i>Alveolar epithelial cell Type II</i> ; Alveoläre Epithelzelle Typ II
AM	Alveolarmakrophage
APC	Allophycocyanin
BADJ	<i>Bronchoalveolar duct junctions</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	<i>Bronchoalveolar lavage fluid</i> ; Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
BAMBI	<i>BMP and activin mebrane-bound inhibitor</i>
BEP	Bronchialepithel
BME	beta-Mercaptoethanol
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
cDNA	<i>complimentary DNA</i>
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i> ; Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Cq	<i>Quantification cycle</i>
cRNA	<i>complimentary RNA</i>
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DPLD	<i>diffuse parenchymal lung diseases</i>
ECM	<i>Extra cellular matrix</i> ; Extrazelluläre Matrix
EGFR	<i>Epidermal growth factor</i>
EMT	<i>Epithelial mesenchymal transition</i> ; Epithelial-Mesenchymale-Transition
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FC	Fold Change
FCS	Fetal calf serum, Fötales Kälberserum
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded; Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GDF	<i>Growth and differentiation factor</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GITC	Guanidinisothiocyanat
GO	<i>Gene ontology</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIER	<i>Heat-Induced Epitope-Retrieval</i>
HOPE	Hepes-glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect
HSP47	<i>Heat shock protein 47</i>
intraperitoneal	i.p.
IPF	Idiopathische pulmonale Fibrose
I-Smad	Inhibitorisches-Smad
KO	<i>Knockout</i>
LAP	<i>Latency-associated peptide</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTBP	<i>Latent TGFβ binding protein</i>

MACS	<i>Magnet-activated cell sorting</i> ; Magnet-aktivierte Zell-Sortierung
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MG	Masson-Goldner
MMP	<i>Matrix metalloprotease</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i> ; Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
nt	Nukleotide
PAH	Pulmonale Arterielle Hypertension
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> ; Phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PFA	para-Formaldehyd
PI3K	Phosphoinositol-3 Kinase
PS	Phosphatidylserin
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transkription Time PCR</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
R-Smad	Rezeptor-Smad
RT	Raumtemperatur
SNP	<i>Small nucleotide polymorphisms</i>
TGF β	Transforming growth factor beta
TGF β RI	TGF β Rezeptor I
TGF β RII	TGF β Rezeptor II
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
TTF1	<i>Thyroid transcription factor 1</i>
U	<i>Units</i> ; Aktivitätseinheiten
U/min.	Umdrehungen pro Minute
Wt	Wildtyp

12. Publikationsverzeichnis

12.1. Peer-reviewed articles

Gleichberechtigte Erstautorschaften fett markiert.

Marwitz S, Depner S, Lucarelli P, Dvornikov D, Ammerpohl O, Siebert R, Rabe K, Kugler C, Vollmer E, Szaszak M, Reck M, Goldmann T, Klingmüller U. The TGF β Pseudoreceptor Bambi as a possible tumorsuppressor in lung cancer. *J Exp Med. Manuscript in preparation*

Marwitz S, Kolarova J, Reck M, Reinmuth N, Kugler C, Zabel P, Siebert R, Goldmann T, Ammerpohl O. The tissue is the issue: Improved methylome analysis from paraffin-embedded tissues by application of the HOPE-technique. *Lab Invest. Under revision*

Lang DS, Marwitz S, Kugler C, Reinmuth N, Vollmer E, Zabel P, Reck M, Goldmann T. Double homeobox protein DUX4 in the human lung: expression under normal and pathological conditions. *Global J. Pathol. Microbiol. Accepted*

Lang DS, **Marwitz S**; Heilenkötter U, Schumm W, Behrens O, Simon R, Reck M, Vollmer E, Goldmann T. Transforming Growth Factor-Beta signaling leads to uPA/PAI-1 activation and metastasis: A study on human breast cancer tissues. *Pathol Oncol Res. Accepted*

Jäger J, **Marwitz S**, Tiefenau J, Rasch J, Shevchuk O, Kugler C, Goldmann T, Steinert M. Human lung tissue explants reveal novel interactions during *Legionella pneumophila* infections. *Infect Immun.* 2014 ;82(1):275-85;

Heinbockel L, Sánchez-Gómez S, Martínez de Tejada G, Dömming S, Brandenburg J, Kaconis Y, Hornef M, Dupont A, Marwitz S, Goldmann T, Ernst M, Gutschmann T, Schürholz T, Brandenburg K: Preclinical Investigations Reveal the Broad Spectrum Neutralizing Activity of Peptide Pep19-2.5 on Bacterial Pathogenicity Factors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(3):1480-7

Goldmann T, Pedersen F, Seehase S, Marwitz M, Lang DS, Kirsten AM, Zabel P, Vollmer E, Magnussen H, Rabe KF, Watz H: The effect of dithiothreitol on the transcriptome of induced sputum cells. *Respiration* 2013; 86(3):262-3

Pedersen F, Marwitz S, Seehase S, Kirsten AM, Zabel P, Vollmer E, Rabe KF, Magnussen H, Watz H, Goldmann T: HOPE-preservation of paraffin-embedded sputum samples-A new way of bioprofiling in COPD. *Respir Med.* 2013; 107(4):587-95

Schultz H, Marwitz S, Baron-Lühr B, Zissel G, Kugler C, Rabe KF, Zabel P, Vollmer E, Gerdes J, Goldmann T: Generation and evaluation of a monoclonal antibody designated MAdL as a new specific marker for adenocarcinomas of the lung. *Br J of Cancer* 2011;105(5):673-81

Marwitz S, Abdullah M, Vock C, Fine JS, Visvanathan S, Gaede KI, Hauber HP, Zabel P, Goldmann T: HOPE-BAL: Improved Molecular Diagnostics By Application Of A Novel Technique For Fixation And Paraffin-Embedding. *J Histochem Cytochem* 2011; 59(6):601-14

Abdullah M, Marwitz S, Kähler D, Schultz H, Kugler C, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T: Pulmonary haptoglobin: a new marker for adenocarcinomas of the lung? *Pathology*. 2011; 43(1):70-2

Drömann D, Rupp J, Rohmann K, Osbahr S, Ulmer AJ, Marwitz S, Röschmann K, Abdullah M, Schultz H, Vollmer E, Zabel P, Dalhoff K, Goldmann T: The TGF-beta-pseudoreceptor BAMBI is strongly expressed in COPD lungs and regulated by nontypeable Haemophilus influenza. *Respir Res*. 2010; 31;11:67.

Marwitz S, Zeiser T, Schultz H, Kähler D, Abdullah M, Hauber HP, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T: The human placenta releases substances that drive lung cancer into apoptosis. *Diagn Pathol*. 2009 ;21;4:27.

Goldmann T, Drömann D, Radtke J, Marwitz S, Lang DS, Schultz H, Vollmer E: CXCR7 transcription in human non-small cell lung cancer and tumor-free lung tissues; possible regulation upon chemotherapy. *Virchows Arch*. 2008 ;452(3):347-8.

12.2. Poster-Präsentationen & Vorträge auf Kongressen:

Marwitz S, Jäger J, Steinert M, Goldmann T. Legionella lesions in the lung: A novel ex vivo system to characterize Legionella infections in human lung tissues. Norddeutsche Immunologen Tagung 2013 (Vortrag)

Marwitz S, Gaede K, Vollmer E, Zabel P, Goldmann T. HOPE-BAL: A novel tool to expand the methodological capabilities in pulmonary research. European Respiratory Society, Wien 2012 (Poster-Präsentation)

Marwitz S, Drömann D, Rupp J, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T. Hope for Omics: A Comprehensive Approach For Biomarker Discovery. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Kyoto 2012 (Poster-Präsentation)

Marwitz S: From bench to...?:Bambi as a novel player in lung diseases. Molecular Biology and Medicine of the Lung (MBML) 2012; Eingeladener ARCN Vertreter

Marwitz S, Pedersen F, Watz H, Vollmer E, Zabel P, Goldmann T. HOPE-BAL: A novel promising tool for research and diagnostics. UGMLC Symposium "Remodeling, Repair and Regeneration in Lung Diseases", Marburg 2012 (Poster-Präsentation)

Marwitz S, Droemann D, Rupp J, Rohmann K, Osbahr S, Ulmer AJ, Röschmann K, Abdullah M, Schultz H, Vollmer E, Zabel P, Dalhoff K, Goldmann T. BAMBI – A TGF- β pseudoreceptor with possible functional involvement in COPD and NTHI infection. European Respiratory Society, Amsterdam 2011 (Poster-Präsentation)

Marwitz S, Goldmann T, Vollmer E, Burmester T. Molekularbiologische Analyse von Entzündungsmediatoren in humaner Lunge, Herbsttagung der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, Borstel 2009 (Vortrag)

13. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die hier vorliegende Doktorarbeit eigenständig angefertigt, die inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und keine anderen als die in der Arbeit angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen. Diese Arbeit wurde noch nie in derselben oder einer ähnlichen Fassung, auch nicht in Teilen, in einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht oder veröffentlicht.

Ich bin damit einverstanden, dass diese Doktorarbeit veröffentlicht wird.

Borstel im März, 2014

Sebastian Alexander Marwitz

14. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Bearbeitung und Anfertigung dieser Dissertation begleitet und mir geholfen haben.

Die durchgeführten Arbeiten wurden hauptsächlich in der Klinischen & Experimentellen Pathologie am Forschungszentrum Borstel durchgeführt. Herrn Prof. Ekkehard Vollmer als Leiter der Forschungsgruppe möchte ich dafür danken, die Arbeit in seiner Laborgruppe durchführen zu dürfen sowie für seine Diskussion und Anregungen zur Anfertigung des Manuskripts. Herrn Prof. Dr. Ulrich Schaible als Betreuer im Rahmen der BBRS Graduiertenschule sowie Herrn Prof. Dr. Jürgen Westermann als Zweitberichterstatler und Herrn Prof. Dr. Norbert Tautz als Prüfungsvorsitzenden möchte ich ebenso danken.

Ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Torsten Goldmann als Betreuer dieser Arbeit für sein Vertrauen, Unterstützung und die gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung dieses Themas über die Jahre hinweg. Von Anfang an wurde mir ein Arbeiten ermöglicht, das mich nicht nur bei meiner fachlichen sondern ebenso bei meiner persönlichen Entwicklung weit vorangebracht hat und alles andere als selbstverständlich war.

Für exzellente technische Unterstützung möchte ich im Folgenden Jasmin Tiebach, Steffi Fox, Kristin Wiczkowski, Maria Lammers, Bettina Baron-Lühr und Anna Schiller danken. Insgesamt gebührt allen Mitarbeitern der Laborgruppe ein großer Dank für das angenehme Klima, die Unterstützung als auch für die einen oder anderen Späße.

Für die umfangreiche Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche möchte ich mich herzlichst bei der gesamten Laborgruppe Experimentelle Pneumologie (Herr Prof. Dr. Fehrenbach) bedanken. Besonders Dr. Christina Vock, Franziska Beyersdorf und Jessica Hofmeister danke ich für Hilfe bei Planung und Durchführung der Tierversuchsvorhaben.

Bei Dr. Thomas Scholzen und Dr. Jochen Behrends möchte ich mich für die Hilfe bei der Durchflusszytometrie bedanken.

Am UKSH Lübeck gebührt besonders der Laborgruppe von Prof. Dr. Jan Rupp Dank, in deren Labors die ersten Zellkulturversuche durchgeführt wurden. Namentlich gebührt hier besonders Prof. Dr. Jan Rupp, Dr. Martha Szaszak und Anke Hellwig Dank für die unkomplizierte und effiziente Unterstützung bei meinen Experimenten. PD Dr. Daniel Drömann und Dorothee Wilpsbäumer danke ich für die Unterstützung bei der Analyse der Gewebekulturüberstände und der Fortführung des Bambi-Projektes.

Bei der Etablierung der AECII-Isolierung waren Prof. Dr. Gernot Zissel (Universitätsklinikum Freiburg) sowie Bettina Baron-Lühr und Jessica Hofmeister eine große Hilfe. Ihnen danke ich für die großartige Unterstützung.

Am CPC München möchte ich mich bei Prof. Dr. Oliver Eickelberg sowie Dr. Isis Fernandez für die Möglichkeit der Hospitanz und Hilfe bei dem Bleomycin-Modell bedanken.

Im Rahmen des Deutschen Zentrums für Lungenforschung möchte ich den Kollegen im ARCN, besonders Prof. Dr. Ole Ammerpohl, PD Dr. Henrik Watz, PD Dr. Martin Reck und Prof. Dr. Peter Zabel einen großen Dank aussprechen. Ebenso gilt der Laborgruppe Systembiologie der Signaltransduktion am DKFZ Heidelberg ein großes Dankeschön. Prof. Dr. Ursula Klingmüller und Dr. Sofia Depner haben ungemein geholfen das Projekt voranzutreiben. Insgesamt hat die Kooperation im DZL viel dazu beigetragen dieses Projekt zu verbessern und vielfältigen Input zu liefern.

Bei den Kollegen vor Ort sowie in der Graduiertenschule möchte ich mich besonders bei Dr. Daniel Kähler, Steffi Fox, Carlotta Ober-Blöbaum, Steffi Renk, Dr. Leyre Palacios-Chaves, Dr. Jochen Behrens und Dr. Bianca Schneider für ungenannte Hilfe sowie eine andauernde Freundschaft und eine wunderbare Zeit bedanken.

Zu guter letzt gilt mein tiefster Dank meinen Eltern, Heinz und Angelika Marwitz. Ohne ihre langjährige Unterstützung bei all meinen Bemühungen stünde ich heute nicht dort wo ich bin.