

Einfluss des Invasions-assoziierten
Proteins Shrew-1 auf die E-Cadherin-Expression
in epithelialen Endometriose-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften

der Goethe – Universität

in Frankfurt am Main

von

Hannah-Vanessa Janine Paul

aus Friedberg (Hessen)

Frankfurt am Main 2015

(D30)

Vom Fachbereich 15 der Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Meike Piepenbring

Gutachter: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz

Prof. Dr. Ernst Stelzer

Datum der Disputation: 18.12.2015

1	Einleitung	1
1.1	Epithelien und Adhärenzverbindungen	1
1.1.1	E-Cadherin und seine Rolle bei Krebserkrankungen.....	3
1.2	Endometriose.....	4
1.2.1	Invasiver Phänotyp von Endometriose-Zellen	8
1.2.2	Epigenetische Regulation der Gen-Expression über die Methylierung von Promotoren.....	9
1.2.3	Epigenetische Regulation der Gen-Expression über die Acetylierung von Histonen	10
1.2.4	Wnt-Signalweg.....	13
1.3	Shrew-1	15
1.3.1	Einfluss von Shrew-1 auf den invasiven Phänotyp von Zellen.....	16
1.4	Zielsetzung der Arbeit	18
2	Material.....	19
2.1	Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien.....	19
2.2	Chemikalien, Stammlösungen und Puffer	21
2.3	Größenstandard.....	25
2.4	Antikörper	25
2.5	Bakterienstamm und -medien	27
2.6	Eukaryotische Zelllinien, Zellkulturmedien, Lösungen und Zusätze	28
2.7	Plasmide.....	30
2.8	Oligonukleotide.....	30
2.9	Kits.....	32
2.10	Software.....	32
2.11	Internet-Quellen	33
3	Methoden	34
3.1	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	34
3.1.1	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung.....	34
3.1.2	RNA-Isolation, Reverse Transkription	34
3.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit cDNA-Proben	34
3.1.4	Gel-Elektrophorese	35
3.1.5	Quantitative PCR TaqMan.....	35
3.1.6	DNA-Extraktion, Bisulfit-Konvertierung, MSP	36
3.1.7	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP), qPCR SYBR Green	38
3.2	Arbeiten mit dem Bakterienstamm <i>E. coli</i> DH5 α	40
3.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α	40
3.2.2	Transformation kompetenter Bakterien.....	40
3.2.3	Mini-Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> DH5 α	40

3.3	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	40
3.3.1	Kultivierung adhärenter Zellen	40
3.3.2	Auftauen und Wegfrieren von Zellen	41
3.3.3	Bestimmung der Zellzahl.....	41
3.3.4	Herstellung lentiviraler Vektoren	41
3.3.5	Bestimmung des Virustiters.....	42
3.3.6	Lentivirale Transduktion von Zellen.....	42
3.3.7	Durchflusszytometrie.....	42
3.3.8	Herstellung von Immunfluoreszenz-Präparaten.....	42
3.3.9	Migrations- und Invasions-Versuche	43
3.4	Arbeiten mit Proteinen	44
3.4.1	Zellextraktion mit RIPA-Puffer	44
3.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	44
3.4.3	Oberflächenbiotinylierung.....	45
3.4.4	Co-Immunpräzipitation (CoIP)	45
3.5	Western Blot-Analyse	46
3.5.1	SDS-Polyacrylamide Gelelektrophorese	46
3.5.2	Proteintransfer (Western Blot)	46
3.5.3	Detektion von Proteinen.....	46
3.6	Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler und statistische Signifikanz	47
4	Ergebnisse	48
4.1	E-Cadherin-Expression in Abhängigkeit der Shrew-1 Herunterregulation in epithelialen Endometriose-Zelllinien.....	48
4.1.1	Herunterregulation von Shrew-1 in dem zellulären Endometriose-Modell 12Z.....	48
4.1.2	Einfluss der Shrew-1 Herunterregulation auf die E-Cadherin-Expression der 12Z-Zellen.....	50
4.1.3	Einfluss der Shrew-1 Herunterregulation in anderen Endometriose-Zelllinien	51
4.1.4	Assoziation von E-Cadherin mit den Adhärenzverbindungen in 12Z Shrew-1 KD-Zellen.....	53
4.1.5	Einfluss der Shrew-1 Herunterregulation auf weitere Bestandteile der Adhärenzverbindung und das Aktinzytoskelett.....	55
4.2	Auswirkung der E-Cadherin-Reexpression auf die Motilität und Invasivität der 12Z Shrew-1 KD-Zellen.....	58
4.3	Mechanismus der E-Cadherin-Reexpression in den 12Z-Zellen	60
4.3.1	Expression von E-Cadherin-Repressoren in den 12Z-Zellen	61
4.3.2	Einfluss der Herunterregulation von Shrew-1 auf die Methylierung des CDH1-Promotors..	62
4.3.3	Einfluss der HDAC-Inhibierung auf die E-Cadherin-Expression in 12Z-Zellen.....	64
4.3.4	Effekt der HDAC-Inhibierung auf andere Endometriose-Zelllinien.....	65
4.3.5	Einfluss der HDAC-Inhibierung auf das Aktinzytoskelett und Vinculin in den 12Z-Zellen	67

4.3.6	Beeinflussung der Histonen-Acetylierung am CDH1-Promotor durch Shrew-1	68
4.3.7	Einfluss der Herunterregulation von Shrew-1 auf den Wnt-Signalweg.....	72
5	Diskussion	74
5.1	Reexpression von E-Cadherin durch die Herunterregulation von Shrew-1.....	75
5.2	Das verminderte motile und invasive Verhalten der 12Z Shrew-1 KD-Zellen resultiert aus der Reexpression von E-Cadherin	80
5.3	Veränderte Vinculin-Lokalisation nach der Herunterregulation von Shrew-1	82
5.4	Shrew-1 beeinflusst die E-Cadherin-Expression der 12Z-Zellen über epigenetische Mechnismen	84
5.5	Shrew-1 scheint den Wnt-Signalweg in den 12Z-Zellen zu beeinflussen	89
6	Ausblick	92
7	Zusammenfassung	94
8	Referenzen	96
9	Abkürzungsverzeichnis.....	110
10	Anhang	113
11	Publikation	117
12	Lebenslauf	118
13	Danksagung.....	119
14	Erklärung.....	120

1 Einleitung

1.1 Epithelien und Adhärenzverbindungen

Die meisten Aushöhlungen und Organe eines Organismus sowie dessen Oberfläche werden von Epithelien umgeben, wodurch Barrieren zur Außenwelt geschaffen und physiologisch kontrollierte Kompartimente innerhalb eines multizellulären Organismus erzeugt werden. Epithelien können aus einer oder mehreren Zellschichten bestehen und sind durch die Basalmembran vom darunterliegenden Bindegewebe abgegrenzt. Epitheliale Zellen besitzen eine Polarität mit einer apikalen Seite, die nach außen oder zum Lumen gerichtet ist und einer basalen Seite, die in Kontakt mit der Basalmembran steht. Lateral interagieren Epithelzellen mit benachbarten Epithelzellen. Für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Architektur von Epithelien ist die Bildung stabiler, aber dennoch dynamischer Verbindungen einzelner Zellen mit ihren benachbarten Zellen und der umgebenden Basalmembran entscheidend (Hagios *et al.*, 1998; Le *et al.*, 1999). Die wichtigsten Verbindungen zwischen Zellen im Epithel sind Tight Junctions (*zona occludens*), Adhärenzverbindungen (*zona adhaerens*) und Desmosomen (Abbildung 1.1 a).

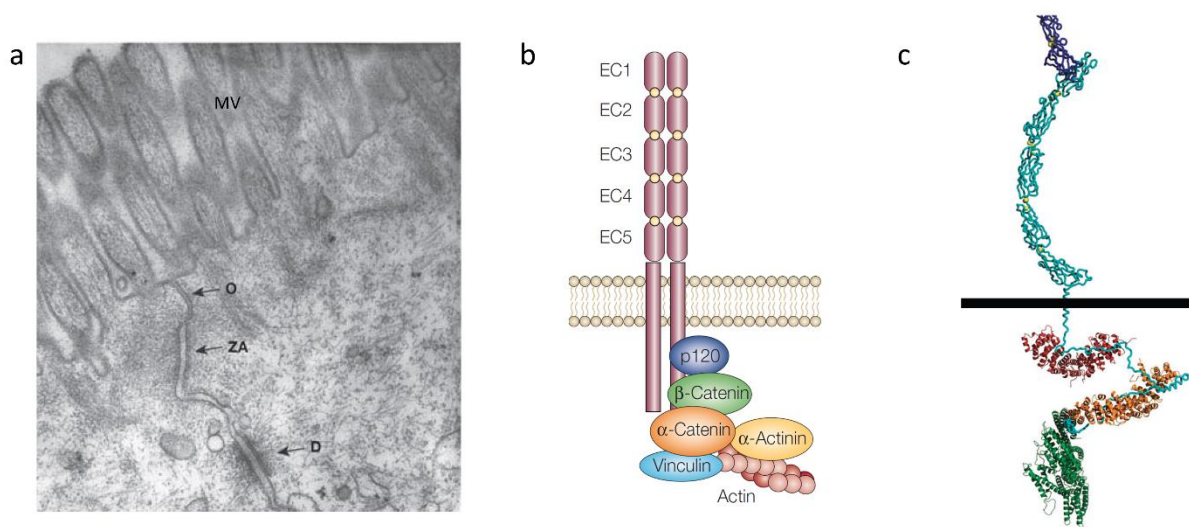


Abbildung 1.1 Adhärenzverbindungen in Epithelien

(a) Elektronen-mikroskopische Aufnahme der Adhärenzverbindung in Epithelien. Die Adhärenzverbindungen (ZA) liegen zwischen den Tight Junctions (O) und den Desmosomen (D) unterhalb der Mikrovilli (MV), die das apikale Ende der Zellen darstellen. Die Adhärenzverbindungen bilden mit dem assoziierten Aktinzytoskelett ein durchgängiges Band entlang der Plasmamembran. (b) Klassische Cadherine besitzen extrazellulär fünf Cadherin-(EC)-Domänen, zwischen denen Calciumionen (gelbe Punkte) gebunden sind. Intrazellulär lagern sich p120-Catenin und β -Catenin an die cytoplasmatische Domäne der Cadherine. α -Catenin stellt direkt oder über Aktinbindende Proteine wie Vinculin oder α -Actinin die Verbindung zum Aktinzytoskelett her. (c) Modell des Cadherin-Catenin-Komplexes anhand der Kristallstruktur von C-Cadherin. Zu sehen ist die leicht gebogene Struktur der extrazellulären Domänen von C-Cadherin (hellblau und dunkelblau), die entscheidend für die Trans-Dimerisierung ist. Intrazellulär sind p120-Catenin (rot), β -Catenin (orange) und α -Catenin (grün) mit cytoplasmatische Domäne des Cadherins assoziiert. (a) und (b) aus (Gumbiner, 2005) und (c) aus (Niessen *et al.*, 2011).

Tight Junctions bilden apikal ein verzweigtes Netz aus abdichtenden Proteinkomplexen, wodurch das Epithel zu einer Permeabilitätsbarriere wird. Desmosomen stellen punktartige Verbindungen zwischen Epithelzellen dar und stehen in Verbindung mit dem Intermediärfilament-Zytoskelett. Dadurch entsteht ein kontinuierliches Netz aus Intermediärfilamenten durch das gesamte Epithel, was diesem eine hohe Zugfestigkeit verleiht (Gumbiner, 1996, 2005; Giepmans & van Ijzendoorn, 2009). Die Adhärenzverbindungen sind für den starken Zusammenhalt von Epithelzellen verantwortlich. In polarisierten prismatischen Epithelzellen bilden die Adhärenzverbindungen zusammen mit dem assoziierten Aktinzytoskelett den durchgehenden Adhäsionsgürtel, der sich an der apikalen Seite der Zelle unterhalb der Tight Junctions befindet.

Cadherine sind die wichtigsten Proteine innerhalb der Adhärenzverbindung. Sie können eingeteilt werden in klassische und nicht-klassische Cadherine (desmosomale Cadherine, Protocadherine, Siebenpfad-Transmembran-Cadherine) (Wheelock & Johnson, 2003). Klassische Cadherine sind Typ I Transmembranproteine und besitzen extrazellulär fünf Wiederholungseinheiten aus etwa 110 Aminosäuren, die extrazelluläre Cadherin-Domänen (EC) genannt werden (Abbildung 1.1 b). Diese Domänen enthalten konservierte Aminosäuresequenzen (DRE, DXNDNXPXF und DXD) die für die Bindung von Calciumionen (Ca^{2+}) entscheidend sind. Diese sorgen dafür, dass die Cadherine die Form eines relativ starren, leicht gebogenen Stabs annehmen (Abbildung 1.1 c) (van Roy & Berx, 2008). Nur in dieser Konformation können Cadherine ihre adhäsive Funktion ausüben. Die distalen Cadherin-Domänen von zwei gegenüberliegenden Cadherin-Dimeren gehen eine homophile Interaktion miteinander ein (Trans-Dimerisierung) (Zhang *et al.*, 2009). Dabei interagiert wechselseitig die Seitenkette eines konservierten Tryptophans in der N-terminalen Cadherin-Domäne mit einer hydrophoben Tasche der distalen Cadherin-Domäne eines gegenüberliegenden Cadherins (Boggon *et al.*, 2002). Die Affinität dieser Bindung ist relativ niedrig und die Stärke der Adhärenzverbindungen entsteht erst durch die laterale Anreicherung vieler Cadherine an den Zell-Zell-Kontakten (Zhang *et al.*, 2009). Auf diese Weise kann die Adhärenzverbindung relativ einfach umstrukturiert werden, was zu der Dynamik dieser Verbindung beiträgt. Für die Anreicherung ist die konservierte juxtamembrane Domäne der Cadherine, sowie das daran assoziierte Protein p120-Catenin verantwortlich (Yap *et al.*, 1998; Thoreson *et al.*, 2000). Die Bindung von p120-Catenin erfolgt über dessen Armadillo-Wiederholungen an die membrannaher Region von E-Cadherin (epitheliales Cadherin) (Yap *et al.*, 1998). Darüber hinaus verhindert p120-Catenin, dass E-Cadherin in den abbauenden endozytotischen Weg eingeschleust wird (van Roy & Berx, 2008). Die cytoplasmatische Domäne der Cadherine ist indirekt über Adapter-Proteine mit dem Aktinzytoskelett verbunden (Wheelock & Johnson, 2003) (Abbildung 1.1 b). Die konservierte Catenin-Binde-Domäne interagiert direkt mit den zentralen Armadillo-Domänen der Catenine β -Catenin oder Plakoglobin. Diese gehen mit ihrer N-terminalen Domäne eine Bindung mit der N-terminalen Domäne von α -Catenin ein, wodurch eine Verbindung zum

Aktinzytoskelett geschaffen wird (Aberle *et al.*, 1994; Jou *et al.*, 1995; van Roy & Berx, 2008). Die Bindung von α -Catenin an das Aktinzytoskelett kann auch indirekt über die Bindung an die Aktinbindenden Proteine Vinculin oder α -Actinin erfolgen (Hazan *et al.*, 1997; Gumbiner, 2005).

Adhärenzverbindungen sind dynamische Strukturen, die fortwährend umorganisiert werden. E-Cadherin wird kontinuierlich internalisiert und wieder an die Membran transportiert aber auch lateral findet eine Bewegung der Cadherine statt. (Le *et al.*, 1999; Canel *et al.*, 2013). Diese Dynamik ist entscheidend für die adhäsive Funktion der Cadherine und ermöglicht es den Zellen, auf Veränderungen in der Umgebung zu reagieren (Canel *et al.*, 2013). Darüber hinaus ist sie wichtig für Prozesse wie der Zellsortierung während der Embryogenese, des Gewebeumbaus und der Migration (Wheelock & Johnson, 2003).

1.1.1 E-Cadherin und seine Rolle bei Krebserkrankungen

Zu den klassischen Cadherinen zählt E-Cadherin, das von zentraler Bedeutung für die Integrität von Epithelien ist und vor allem in epithelialem Gewebe exprimiert wird. Es wird kontinuierlich endozytiert und zum frühen Endosom transportiert. Von dort gelangt es über das Recycling-Endosom zurück zur Plasmamembran oder wird über das späte Endosom der Degradation durch das Lysosom zugeführt (van Roy & Berx, 2008).

Die meisten Tumore des Menschen sind Karzinome, die sich aus epithelialem Gewebe entwickelt haben (Berox & van Roy, 2009). Die Expression von E-Cadherin oder dessen Lokalisation an der Zelloberfläche ist in diesen Tumoren mit fortschreitender Malignität häufig zunehmend vermindert, aufgrund dessen E-Cadherin eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben wird (Frixen *et al.*, 1991; Batlle *et al.*, 2000; Cano *et al.*, 2000; Corn *et al.*, 2000; Nass *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003; Berx & van Roy, 2009; von Burstin *et al.*, 2009; Chao *et al.*, 2010; Canel *et al.*, 2013). Daraus resultiert eine Verminderung der Adhäsion zwischen epithelialen Zellen, wodurch es ihnen erleichtert wird, sich aus ihrem Zellverband zu lösen. Die Verminderung der E-Cadherin-Expression geht somit mit der Invasivität der Zellen einher und begünstigt die Bildung von sekundären Tumoren (Metastasen), an vom Ursprungstumor entfernten Stellen (Frixen *et al.*, 1991; Vleminckx *et al.*, 1991; van Roy & Berx, 2008). Die Wiederherstellung der E-Cadherin-Expression in Tumorzelllinien führt zur Verminderung deren invasiven Verhaltens (Vleminckx *et al.*, 1991; van Roy & Berx, 2008). Die Expression von E-Cadherin kann durch Mutation, Deletion, transkriptionale Repression (Promotor-Methylierung, Chromatin-Modifikation, Expression von Repressoren) und posttranslationale Modifikation beeinträchtigt sein (Wheelock & Johnson, 2003; Canel *et al.*, 2013).

Zu den translationalen Repressoren der E-Cadherin-Expression zählen die Zinkfinger-Proteine Snail, Slug und ZEB1 (*zinc finger E-box binding homeobox 1*) sowie der Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor Twist (Batlle *et al.*, 2000; Cano *et al.*, 2000; Bolós *et al.*, 2002; van Roy & Berx, 2008; Kalluri & Weinberg, 2009). Diese binden an drei konservierte Bereiche (E-Boxen) innerhalb des E-Cadherin-Promotors und können so die Transkription des E-Cadherin-Gens (CDH1) unterbinden. Diese Repressoren spielen eine entscheidende Rolle bei dem Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und werden in diesem Kontext häufig verstärkt exprimiert (Kalluri & Weinberg, 2009). Die EMT ist ein Prozess, bei dem epitheliale Zellen, die gewöhnlich mit benachbarten Zellen sowie der Basalmembran interagieren, biochemische Veränderungen durchlaufen, wodurch sie Eigenschaften mesenchymaler Zellen annehmen, wie ein verstärktes motiles und invasives Verhalten, verstärkte Resistenz gegen apoptotische Prozesse und verstärkte Produktion von extrazellulären Matrix (EZM)-Komponenten (Kalluri & Weinberg, 2009). Im Zuge der EMT kommt es zur Verminderung der Expression epithelialer Marker-Proteine (z. B. E-Cadherin, Keratin, Laminin1) und zu einer verstärkten Expression mesenchymaler Marker (z. B. N-Cadherin, Vimentin, β -Catenin, Fibronectin), wodurch sich die Zellen aus ihrem Zellverband lösen können. Die EMT ist kein abrupter Vorgang, sondern vielmehr ein fließender Übergang hin zu einem mesenchymalen Zelltyp. Sie kann im Verlauf der Implantation, Embryogenese und Organentwicklung auftreten, sowie an der Wundheilung, Geweberegeneration und Bildung von Fibrosen beteiligt sein. Darüber hinaus scheint die EMT auch bei der Tumor- und Metastasenbildung eine Rolle zu spielen (Lee *et al.*, 2006; Kalluri & Weinberg, 2009).

An Orten, an denen sich Metastasen bilden, geht man davon aus, dass der Prozess der EMT wieder umgekehrt werden kann (mesenchymal-epitheliale-Transition, MET) und sich dadurch Metastasen etablieren, die dem ursprünglichen Tumor ähnlich sind (Chaffer *et al.*, 2006, 2007). Da sowohl die EMT als auch die MET reversibel zu sein scheinen und beide Prozesse miteinander in Verbindung stehen, wird auch der Begriff epithelial-mesenchymale-Plastizität (EMP) verwendet (Thompson & Haviv, 2011).

1.2 Endometriose

Die Endometriose ist eine gutartige gynäkologische Erkrankung, die jedoch chronisch verläuft. Dabei bilden endometriale Epithel- und Stromazellen außerhalb des Uterus Läsionen, die der Struktur des Endometriums ähnlich sind. Diese Endometriose-Läsionen befinden sich meist im Bereich des Beckens, können jedoch auch den Darm, das Zwerchfell, den Bauchnabel und das Brustfell befallen (Giudice & Kao, 2004; Hickey *et al.*, 2014). Befinden sich die Läsionen in der Muskelschicht des Uterus (Myometrium), werden diese als Adenomyose bezeichnet (Benagiano & Brosens, 2006). Weltweit sind

etwa 10 % der Frauen im reproduktionsfähigen Alter von dieser Erkrankung betroffen (Signorile & Baldi, 2010).

Das Endometrium ist die innere Schicht des Uterus und ist aus stromalen Zellen aufgebaut, in welche Drüsen aus epithelialen Zellen eingebettet sind (Abbildung 1.2 a und b). Zum Lumen des Uterus ist das Endometrium durch ein einschichtiges hochprismatisches Epithel begrenzt. Das Endometrium wird in das *Stratum funktionale* (Dicke ca. 5-8 mm), welches zum Lumen des Uterus weist und das *Stratum basale* (Dicke ca. 1 mm) eingeteilt. Endometriose-Läsionen sind ähnlich aufgebaut. Sie enthalten Drüsenstrukturen aus epithelialen Zellen die von stromalen Zellen umgeben sind (Abbildung 1.2 c). Die Läsionen können in drei verschiedene Subtypen untergliedert werden: oberflächliche Läsionen, tiefinfiltrierende Läsionen, die in die befallen Struktur eindringen und Zysten (Schokoladenzysten, Einstülpungen des ovarialen Oberflächenepithels, welche endometriales Gewebe und Blut enthalten), welche meist die Eierstöcke befallen (Hickey *et al.*, 2014).

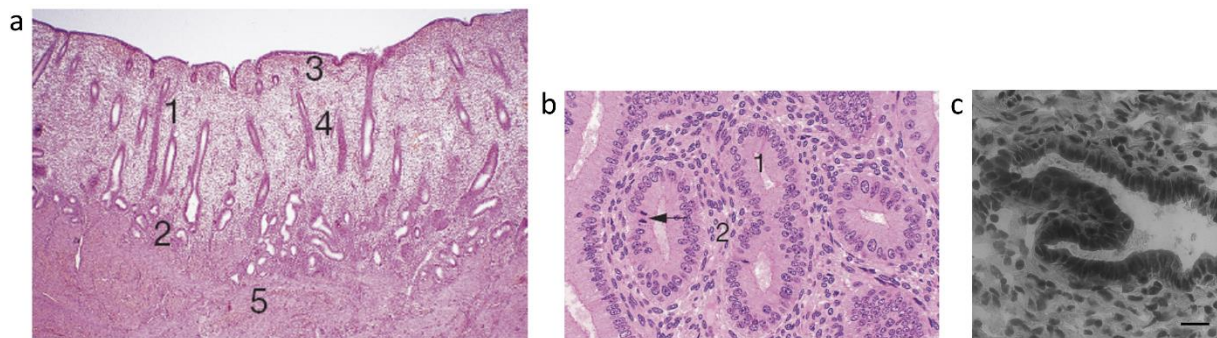


Abbildung 1.2 Aufbau des Endometriums und von Endometriose-Läsionen

(a) Schnitt durch das humane Endometrium während der Proliferationsphase. Das Endometrium wird in das *Stratum funktionale* (1) und das *Stratum basale* (2) eingeteilt. Das *Stratum funktionale* weist zum Lumen des Uterus und wird während der Menstruationsphase abgestoßen. Das *Stratum funktionale* wird weiter in das *Stratum compactum* (3) und *Stratum spongiosum* (4) untergliedert. Unter dem *Stratum basale* liegt eine ca. 2 cm dicke Muskelschicht (Myometrium, 5). Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 20 fache Vergrößerung. (b) Schräg und quer angeschnittene Drüsen (1) während der Proliferationsphase. Diese sind in das umliegende Stroma eingebettet (2). In dieser Zyklusphase bilden sich die Drüsen von *Stratum basale* aus, weswegen zahlreiche mitotische Vorgänge beobachtet werden können (Pfeil). Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 200 fache Vergrößerung. (c) Gefrierschnitt (10 μm) durch eine tiefinfiltrierenden rektovaginalen Endometriose-Läsion. Zusehen ist ein Drüsenschlauch aus epithelialen Zellen, der von stromalen Zellen umgeben ist. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop TCS SP5 (Leica) angefertigt (von Hannah-Vanessa Paul, 2010). Hämatoxylin-Färbung, 400 fache Vergrößerung, Maßstab 20 μm . (a) und (b) aus (Welsch & Deller, 2010).

Die Symptome einer Endometriose sind vielfältig. Meist kommt es zu Schmerzen vor und während der Menstruation (Dysmenorrhoe), während des Geschlechtsverkehrs (Dyspareunie), in der Blase und dem Darm, sowie zu chronischen Schmerzen im Bereich des Beckens (Hickey *et al.*, 2014). Endometriose ist mit verminderter Fruchtbarkeit und Unfruchtbarkeit assoziiert und bei vielen sonst symptomfreien

Frauen wird die Erkrankung erst im Zuge der Untersuchung ihrer Unfruchtbarkeit entdeckt (Hickey *et al.*, 2014). Bei 25 - 50 % der Frauen, die an Unfruchtbarkeit leiden, kann Endometriose diagnostiziert werden, und 30 - 50 % aller Frauen mit Endometriose leiden an Unfruchtbarkeit (Hickey *et al.*, 2014). Auf welche Weise die Endometriose zur Unfruchtbarkeit führt ist kaum verstanden. Durch die Läsionen oder Fibrosen kann es zu einem Verkleben der Eileiter kommen, sowie zu einer Beeinträchtigung der Ovarien, wodurch es zu einer Beeinflussung der Eizellen kommen kann. Des Weiteren kann die Funktion der Eileiter und des eutopen Endometriums gestört sein (Hickey *et al.*, 2014).

Die eindeutige Diagnose einer Endometriose ist zurzeit nur durch einen laparoskopischen Eingriff mit anschließender histologischer Untersuchung der Läsionen möglich. In nicht-invasiven Eingriffen wie Ultraschalluntersuchungen und Magnetresonanztomographien (MRT) können kleine und tiefinfiltrierende Läsionen nicht zuverlässig entdeckt werden. Auch die Suche nach Biomarkern für die Endometriose in Blut und Peritonealflüssigkeit blieb bislang erfolglos (Hickey *et al.*, 2014).

Anhand der Befunde eines laparoskopischen Eingriffs kann die Krankheit nach Richtlinien der Amerikanischen Gesellschaft für reproduktive Medizin (ASRM) als minimal, mild, moderat oder schwer klassifiziert werden. Diese Einteilung korreliert jedoch nur schwach mit den klinischen Symptomen (Hickey *et al.*, 2014). Die laparoskopische Entfernung der Läsionen bringt in den meisten Fällen nur einen vorübergehenden Rückgang der Läsionen und Symptome. In 75 % der Fälle treten die Symptome innerhalb von zwei Jahren erneut auf (Giudice & Kao, 2004). Die medikamentöse Behandlung kann mit hormonellen Kontrazeptiva, Gestagenen, Gonadotropin Releasing-Hormon-Analoga und Aromatase-Inhibitoren erfolgen (Giudice & Kao, 2004; Hickey *et al.*, 2014). Diese zielen darauf ab, die Konzentration der Estrogene zu reduzieren. Estrogene haben einen proliferativen Effekt auf das Endometrium und sind in der ersten Zyklusphase für dessen Aufbau verantwortlich (Jabbour *et al.*, 2006). Auch die Zellen in Endometriose-Läsionen werden in ihrer Proliferation durch Estrogene gefördert (Giudice & Kao, 2004; Hickey *et al.*, 2014). Auf Grund von unerwünschten Nebeneffekten, wie z. B. irreversibler Demineralisierung der Knochen kann eine solche Behandlung jedoch nicht dauerhaft erfolgen (Hickey *et al.*, 2014).

Die Ätiologie und Pathogenese der Endometriose sind bisher unklar. Die am meisten akzeptierte Theorie zur Entstehung der Endometriose-Läsionen ist die Transplantationstheorie nach John Sampson. Diese besagt, dass während der Menstruation Blut mit endometrialem Gewebe durch die intakten Eileiter in die Bauchhöhle gelangt (retrograde Menstruation) (Sampson, 1927; Giudice & Kao, 2004). Dies wird bestätigt durch die Beobachtung, dass Endometriose-Patientinnen zum Zeitpunkt der Menstruation mehr Blut und endometriales Gewebe in der Bauchhöhle aufweisen als Frauen ohne diese Erkrankung (Halme *et al.*, 1984; Giudice & Kao, 2004). Sind die Eileiter verschlossen, kann nur in etwa 15 % der Fälle Blut in der Bauchhöhle nachgewiesen werden (Halme *et al.*, 1984). Des Weiteren

konnte bei Endometriose-Patientinnen eine veränderte myometriale Kontraktion festgestellt werden, die vom Cervix in Richtung Fundus gerichtet ist, welche wiederum die retrograde Menstruation begünstigt (Salamanca & Beltrán, 1995). Auch konnte gezeigt werden, dass Frauen die stärker, länger und häufiger menstruieren und somit verstärkt einer retrograden Menstruation ausgesetzt sind, ein höheres Risiko zur Entwicklung der Endometriose haben (Rock & Markham, 1992). In Pavianen kann die intraperitoneale Injektion von eigenen endometrialen Fragmenten Endometriose-ähnliche Läsionen erzeugen (D'Hooghe *et al.*, 1995). Humane Endometrium-Fragmente können in Nacktmäusen Endometriose-Läsionen induzieren (Zamah *et al.*, 1984; Nisolle *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass endometriales Gewebe für die Etablierung von Endometriose-Läsionen verantwortlich ist.

Weiterhin wird angenommen, dass das Endometrium von Frauen mit Endometriose Veränderungen aufweist, welche die Entstehung von ektopen Läsionen begünstigen (Giudice & Kao, 2004). Bei 90 % aller Frauen können zum Zeitpunkt der Menstruation Blut und endometriales Gewebe in der Bauchhöhle gefunden werden (Halme *et al.*, 1984), jedoch entwickeln nur etwa 10 % persistierende Endometriose-Läsionen (Giudice & Kao, 2004). Da die retrograde Menstruation somit ein gewöhnlicher Vorgang zu sein scheint, die Prävalenz jedoch deutlich geringer ist, kamen Koninckx *et al.* zu der Überlegung, dass die Endometriose ein normaler Zustand ist und abzugrenzen ist von der Krankheit Endometriose, mit persistenten Läsionen (Koninckx *et al.*, 1994).

Neben dem Vorhandensein der retrograden Menstruation sind somit weitere Umstände nötig, die zur Entwicklung und Persistenz der Läsionen beitragen. Da es unter Verwandten zu einer Häufung von Endometriose-Erkrankungen kommt, geht man von einer genetischen Komponente bei dieser Erkrankung aus (Stefansson *et al.*, 2002; Giudice & Kao, 2004). Des Weiteren werden Veränderungen im Immunsystem (Lebovic *et al.*, 2001; Berkkanoglu & Arici, 2003; Giudice & Kao, 2004), bei apoptotischen Vorgängen (Meresman *et al.*, 2000; Dmowski *et al.*, 2001; Agic *et al.*, 2009), EMT-Prozessen (Matsuzaki & Darcha, 2012; Montserrat *et al.*, 2012), sowie epigenetische Veränderungen (Guo, 2009; Nasu *et al.*, 2014) und veränderte Bedingungen in der Bauchhöhle (Taylor *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2006) diskutiert. Der Einfluss von Umweltfaktoren wie Dioxin wird für die Entstehung von Endometriose-Läsionen ebenfalls in Erwägung gezogen (Rier *et al.*, 1993; Giudice & Kao, 2004; Martinez-Zamora *et al.*, 2015). Liu und Lang gehen davon aus, dass das Endometrium von Frauen mit Endometriose bereits Veränderungen aufweist, die dann dazu führen, dass retrograd in die Bauchhöhle gelangtes Endometrium Läsionen hervorrufen kann (Liu & Lang, 2011). Dabei gehen sie vor allem von gestörten Vorgängen im Immunsystem und der Apoptose aus. Auch eine veränderte Expression von Cadherinen und Integrinen könnte zu Bildung von Endometriose-Läsionen beitragen (van der Linden *et al.*, 1994; Scotti *et al.*, 2000).

In seltenen Fällen sind Endometriose-Läsionen auch außerhalb der Bauchhöhle, wie z. B. in der Lunge, den Lymphknoten und der Brust, lokalisiert (Signorile & Baldi, 2010). Das Vorkommen von Läsionen außerhalb der Bauchhöhle kann durch die Transplantationstheorie nicht erklärt werden. Nach der Transplantationstheorie wären die Läsionen Autotransplantate, welche ihrem Ursprungsgewebe ähnlich sein sollten. Redwine kam jedoch zu dem Schluss, dass die Läsionen keine Autotransplantate sind, da diese sich zu stark von eutopem Endometrium unterscheiden und die Ursache für die Läsionen somit nicht die retrograde Menstruation sein kann (Redwine, 2002).

Eine weitere Theorie besagt, dass sich Endometriose-Läsionen spontan aus pluripotem Coelom-Epithel bilden können (Metaplasie), wobei Faktoren in der Umgebung der Läsionen eine Rolle zu spielen scheinen (Baldi *et al.*, 2008). Durch diese Theorie kann die Bildung von Läsionen auch außerhalb der Bauchhöhle begründet werden (Witz, 2002). Die Präsenz von Läsionen bei Frauen ohne funktionelles Endometrium (Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndrom) oder bei Männern kann durch diese Theorie ebenfalls erklärt werden (Witz, 2002; Mok-Lin *et al.*, 2010; Troncon *et al.*, 2014).

1.2.1 Invasiver Phänotyp von Endometriose-Zellen

Obwohl Endometriose als gutartige Erkrankung beschrieben ist, gibt es Eigenschaften, die Zellen aus Läsionen mit denen aus Tumoren gemeinsam haben (Vlahos *et al.*, 2010). Endometriose-Zellen bilden Läsionen an ektopen Stellen, können sich dort anhaften, überleben und in das benachbarte Gewebe einwandern und dieses so schädigen (Starzinski-Powitz *et al.*, 2001; Vlahos *et al.*, 2010). Des Weiteren können sie wie Krebszellen „Metastasen“ an weiter entfernten Stellen, außerhalb der Bauchhöhle, bilden. Auch kommt es zur Vaskularisierung der Läsionen. Für Endometriose-Patientinnen konnte ein etwa zweifach erhöhtes Risiko identifiziert werden, an ovarialen Karzinomen zu erkranken (Vlahos *et al.*, 2010). Ein erhöhtes Risiko besteht auch für die Entwicklung von Brustkrebs. Dabei stellt sich die Frage, ob die Tumore direkt aus Endometriose-Zellen hervor gehen oder ob sich beide Erkrankungen unabhängig voneinander entwickeln und die Endometriose die Tumorentstehung nur begünstigt.

Der Tumorsuppressor E-Cadherin scheint auch im Kontext der Endometriose eine Rolle zu spielen. In Endometriose-Läsionen sind einzelne E-Cadherin-negative epitheliale Zellen detektierbar (Abbildung 1.3), die im Endometrium nicht nachgewiesen werden können (Gaetje *et al.*, 1997; Scotti *et al.*, 2000; Bartley *et al.*, 2014). Diese Zellen zeigen *in vitro* ein motiles und invasives Verhalten (Gaetje *et al.*, 1997; Zeitvogel *et al.*, 2001). Generierte Zelllinien aus diesen Zellen können gemeinsam mit stromalen Endometriose-Zellen Endometriose-ähnliche Läsionen in immunsupprimierten Mäusen hervorrufen (Banu *et al.*, 2009). Dies lässt vermuten, dass E-Cadherin bei der Ätiologie und Pathogenese der Endometriose bedeutend ist.

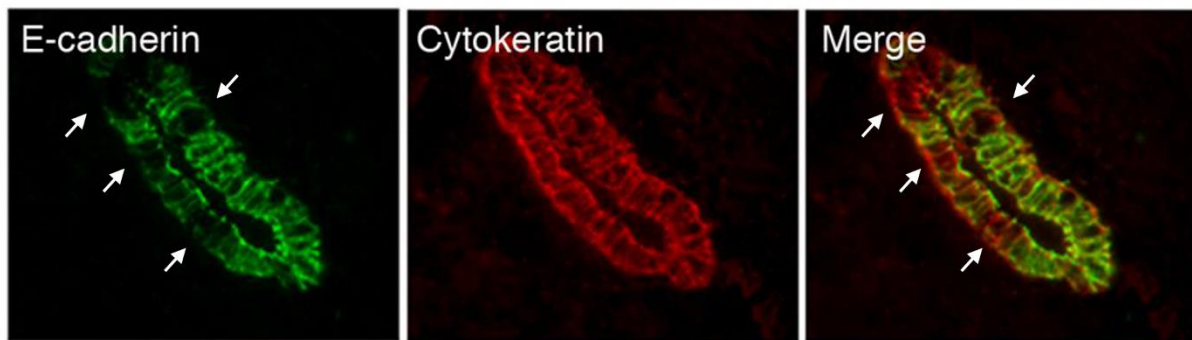


Abbildung 1.3 E-Cadherin-negative epitheliale Zellen in Endometriose-Läsionen

Endometriose-Läsionen enthalten glanduläre Epithelzellen, denen die Expression von E-Cadherin fehlt (Pfeile). Diesen Zellen wird eine zentrale Rolle bei der Bildung oberflächlicher Läsionen zugeschrieben (Starzinski-Powitz *et al.*, 2001; Matsuzaki & Darcha, 2012). Entnommen und modifiziert aus (Klemmt & Starzinski-Powitz, 2012).

1.2.2 Epigenetische Regulation der Gen-Expression über die Methylierung von Promotoren

Epigenetik ist die stabile und vererbare Veränderung in der Genexpression, ohne Veränderungen in der DNA-Sequenz (Goldberg *et al.*, 2007). Die epigenetische Information wird von einer Generation zur nächsten weitergeleitet, ohne dass diese Information in der DNA-Sequenz enthalten ist (Nasu *et al.*, 2011). Diese Weitergabe kann auf der zellulären Ebene oder auf der Ebene von ganzen Organismen stattfinden (Nasu *et al.*, 2011). Die epigenetische Information kann über Prozesse im Zellkern wie DNA-Methylierung, Chromatin-Modifikationen (Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung, Biotinylierung) und microRNAs übertragen werden (Nasu *et al.*, 2011).

Die Methylierung der DNA erfolgt durch DNA-Methyltransferasen (DNMT), welche eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin an die Kohlenstoff-Position 5 in Pyrimidin-Ringen von Cytosinen in Cytosin-Guanosin-Dinukleotiden (CpG) übertragen (Jin & Robertson, 2013). Dadurch entsteht 5-Methylcytosin, das weiterhin eine Basenpaarung mit Guanosin eingeht. Etwa 1 bis 2 % des Säuger-genoms besteht aus CpG-Dinukleotiden, wobei diese in den Promotorregionen von Genen konzentriert sind (CpG-Inseln). CpGs sind größtenteils methyliert. In CpG-Inseln von Genen, die transkribiert werden, sind sie jedoch unmethyliert (Abbildung 1.4). Die Methylierung von CpG-Inseln ist mit der Stilllegung der entsprechenden Gene assoziiert, da regulatorische Proteine, die an methylierte DNA binden, sich von denen unterscheiden, die an unmethylierte DNA binden (Goldberg *et al.*, 2007; Nasu *et al.*, 2011). Die Methylierung von CpG-Inseln ist sehr stabil und wird während der Replikation von der DNMT1 aufrecht erhalten (Jin & Robertson, 2013). DNMT1 bindet an hemimethylierte DNA und lokalisiert an Orten der aktiven DNA-Replikation in der S-Phase (Hermann *et al.*, 2004; Nasu *et al.*, 2011). DNMT3A und DNMT3B übernehmen die *de novo* Methylierung von CpGs und sind entscheidend an der Etablierung von Methylierungsmustern während der Embryonalentwicklung beteiligt (Okano *et al.*, 1999). Die

Vorgänge der Demethylierung genomischer DNA sind zum größten Teil unbekannt (Goldberg *et al.*, 2007; Nasu *et al.*, 2011). Die Methylierung von CpG-Inseln spielt im Rahmen von Krebserkrankungen eine große Rolle, jedoch konnten auch veränderte Methylierungsmuster im Kontext der Endometriose identifiziert werden (Nasu *et al.*, 2011).

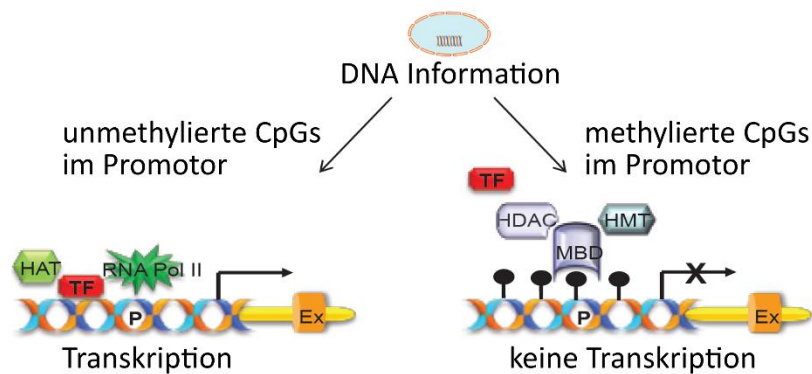


Abbildung 1.4 Auswirkung der Promotor-Methylierung auf die Transkription

Gene, die aktiv transkribiert werden, sind unmethyliert und zugänglich für die Bindung von Transkriptionsfaktoren (TF) und der RNA-Polymerase II (RNA Pol II). Histoneacetyltransferasen (HAT) sind ebenfalls beteiligt, indem Promotoren über die Auflockerung des Chromatins zugänglich für die Transkriptionsmaschinerie gehalten werden. Durch DNA-Methyltransferasen können Cytosine in CpG-Inseln in Promotoren methyliert werden. Diese Markierungen werden von Protein mit Methyl-CpG-Binde-Domänen (MBD) erkannt, welche anschließend Histondeacetylasen (HDAC) und Histonmethyltransferasen (HMT) rekrutieren können, die eine Verdichtung des Chromatins bewirken. Auf diese Weise werden methylierte Promotoren unzugänglich für Transkriptionsfaktoren und die Transkriptionsmaschinerie gemacht. Es erfolgt keine Transkription des betroffenen Gens. P = Promotor, Ex = Exon. Verändert nach (Ahmed, 2012).

1.2.3 Epigenetische Regulation der Gen-Expression über die Acetylierung von Histonen

Die DNA ist im Nukleus mit Proteinen, vor allem Histonen assoziiert, welche zur Organisation des Chromatins beitragen. Die Grundeinheit des Chromatins ist das Nukleosom, welches aus 146 DNA-Basenpaaren, die um ein Histonoktamer gewickelt sind, besteht. Ein Histonoktamer besteht jeweils aus zwei Kopien der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 (Wang *et al.*, 2007). Durch die Lysinreste der Histone haben diese eine positive Ladung, wodurch es zu einer Anlagerung der DNA, die durch das Phosphatrückgrat negativ geladen ist, an die Histonoktamere kommt (Wang *et al.*, 2007). Die Histone können kovalent modifiziert werden. Zu diesen Modifizierungen gehören unter anderem die Acetylierung von Lysinen, die Methylierung von Lysinen und Argininen, die Phosphorylierung von Serinen und Threoninen und die Ubiquitinierung von Lysinen (Wang *et al.*, 2007).

Der Acetylierungszustand der Histone wird durch die Aktivität von Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) bestimmt (Abbildung 1.5). HATs übertragen unspezifisch Acetylreste von Acetyl-Coenzym A auf Lysinreste der Histone (Wang *et al.*, 2007). So wird die positive Ladung der Lysine überdeckt, wodurch die Bindung an die negativ geladene DNA abgeschwächt wird, und es so zu einer Auflockerung des Chromatins kommt. Neben der Auflockerung des Chromatins führt die Histonacetylierung auch zu der Rekrutierung von Transkriptions-Co-Aktivatoren, die über eine Bromodomäne verfügen, über welche sie die Acetylierung von Lysinen erkennen (Wang *et al.*, 2007). Dadurch wird die Transkription in diesen Bereichen begünstigt, indem der Transkriptionsmaschinerie der Zugang zu den Promotoren erleichtert wird (Chuang *et al.*, 2009; Witt *et al.*, 2009). HDACs können diese Acetylgruppen wieder entfernen. Dadurch wird die positive Ladung der Lysine, die vorher durch die Acetylgruppe überdeckt war, wieder frei, wodurch es zu einer verstärkten Bindung an die DNA kommt (Chuang *et al.*, 2009; Witt *et al.*, 2009). In diesen kondensierten Bereichen des Chromatins ist die Transkription gehemmt. Durch die Wirkung von HDACs und HATs kann somit die Transkription einzelner Gene reguliert werden. Durch ein Ungleichgewicht zwischen diesen Enzymen kann es zu Veränderungen der Genexpression kommen, welche mit Krankheiten wie Krebs oder Alzheimer in Verbindung gebracht werden können (Wang *et al.*, 2007; Witt *et al.*, 2009).

HDACs können in vier Klassen eingeteilt werden. Die Klassen I (HDAC1, 2, 3 und 8), II (HDAC4, 5, 6, 7, 9 und 10) und IV (HDAC11) enthalten die klassischen HDACs, welche für ihre katalytische Aktivität ein Zn^{2+} Ion benötigen. Die Mitglieder der Klasse III heißen Sirtuine und benötigen NAD^+ als Kofaktor (de Ruijter *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007; Witt *et al.*, 2009). Die Aktivität der HDACs kann durch die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren unterdrückt werden, wodurch es zur Auflockerung des Chromatins kommt (Abbildung 1.5) (Chuang *et al.*, 2009). Die meisten HDAC-Inhibitoren wirken unspezifisch auf alle HDACs, wie zum Beispiel Trichostatin A (TSA) und Vorinostat. Valproinsäure und Depsipeptide (z. B. Romidepsin) wirken dagegen spezifischer gegen Klasse I HDACs (Witt *et al.*, 2009).

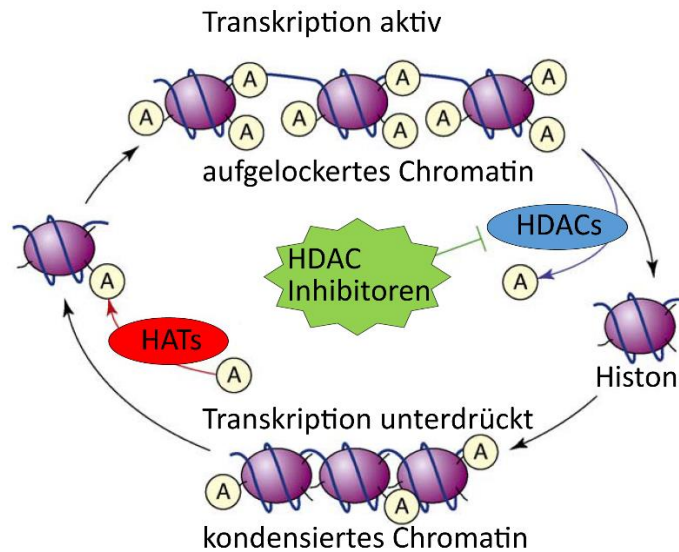


Abbildung 1.5 Auswirkung der Histonacetylierung auf den Zustand des Chromatins und die Transkription

Die Acetylierung von Lysinen in Histonen wird durch die Aktivität von Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) bestimmt. HATs übertragen unspezifisch Acetylreste von Acetyl-Coenzym A auf Lysine. Dies führt zur Auflockerung des Chromatins, wodurch die Transkription möglich wird. HDACs können diese Acetylierungen wieder entfernen. Es kommt zur Kondensierung des Chromatins im entsprechenden Bereich, wodurch die Transkription unterdrückt wird. Diesen Prozess können HDAC-Inhibitoren unterdrücken. Das Acetylierungslevel der Histone nimmt zu, wodurch die Transkription gefördert wird. Im Kontext von Tumorerkrankungen kann die Expression von Tumorsuppressoren durch die Wirkung von HDACs unterbunden sein, weswegen HDAC-Inhibitoren mögliche Wirkstoffe zur Behandlung von Tumorerkrankungen sind. Verändert nach (Chuang *et al.*, 2009).

Die verschiedenen HDACs scheinen keine Spezifität für bestimmte Acetylierungen oder Gene zu haben. Die Entfernung spezifischer Acetylgruppen erfolgt durch die Wechselwirkung von HDACs mit interagierenden Proteinen (Wang *et al.*, 2007). Aus diesem Grund sind HDACs, vor allem HDAC1, HDAC2 und HDAC3, meist Teil von großen nukleären Multiproteinkomplexen, welche an der Regulation der Transkription beteiligt sind (Witt *et al.*, 2009). HDAC1 und HDAC2 können Teil der Transkriptionsrepressor-Komplexe Co-REST (*co-repressor for element-1-silencing transcription factor*), Sin3 oder NuRD (*Nucleosome Remodeling Deacetylase complex*) sein (de Ruijter *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007; Witt *et al.*, 2009). Diese Komplexe enthalten Proteine, welche die Aktivität der HDACs modulieren und wichtig für die Bindung an Promotoren von Genen sind (de Ruijter *et al.*, 2003). Die Rekrutierung der HDAC-Komplexe erfolgt unter anderem durch die Wechselwirkung mit Proteinen, die an methylierte CpG-Dinukleotide binden, wie z. B. Methyl-CpG-Binde-Proteine oder Proteine, die eine Methyl-CpG-Binde-Domäne enthalten oder auch über DNA-Methyltransferasen (de Ruijter *et al.*, 2003). HDACs befinden sich hauptsächlich im Zellkern (de Ruijter *et al.*, 2003). Die Lokalisation erfolgt über ein Kernlokalisierungssignal (NLS) oder die Interaktion mit anderen nukleären Proteinen (de Ruijter *et al.*, 2003). HDAC1 und HDAC2 befinden sich ausschließlich im Nukleus, während HDAC3 auch im Cytoplasma lokalisiert sein kann, da es über eine Kernexport-Sequenz verfügt (Yang *et al.*, 2002).

Im Verlauf des Menstruations-Zyklus kommt es zu Veränderungen in der HDAC-Expression und der Histonacetylierung (H2AK5, H3K9, H4K8 und H3K14/18) (Krusche *et al.*, 2007; Munro *et al.*, 2010). Auch bei der Entstehung und Pathogenese der Endometriose scheint die Chromatin-Modifikation über die Acetylierung von Histonen eine Rolle zu spielen (Liu & Guo, 2008; Liu *et al.*, 2012b). In Mäusen und Ratten, bei denen durch Autotransplantation endometrialer Fragmente Endometriose-ähnliche Läsionen induziert wurden, verminderte Inhibierung von HDACs (TSA und Valproinsäure) die Größe der Läsionen (Lu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012a). In Endometriose- und Adenomyose-Zellen konnte eine erhöhte Expression der Klasse I HDACs HDAC1, HDAC2 und HDAC3 gezeigt werden (Colón-Díaz *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012b; Samartzis *et al.*, 2013). Dies lässt vermuten, dass HDACs an der Entwicklung und dem Fortbestehen von Endometriose-Läsionen beteiligt sind.

1.2.4 Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt, wie der Proliferation, Differenzierung während der Embryonalentwicklung sowie der Gewebemöostase und kann bei zahlreichen Erkrankungen, wie Krebs oder neurodegenerativen Erkrankungen, dereguliert sein (Wang *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013). β -Catenin ist neben seiner Rolle in den Adhärenzverbindungen entscheidend am Wnt-Signalweg beteiligt. Freies cytoplasmatisches β -Catenin wird kontinuierlich durch einen Proteinkomplex aus Axin, Adenomatous Polyposis Coli (APC) und Glykogensynthase-Kinase 3β (GSK3 β) phosphoryliert, was zu dessen Ubiquitinierung und dem Abbau durch das Proteasom führt (Abbildung 1.6). Durch die Bindung von Wnt-Liganden an den Rezeptor Frizzled und den Co-Rezeptor LRP6 (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) kommt es zu einer Auflösung des Komplexes aus Axin, APC und GSK3 β . β -Catenin wird nicht mehr phosphoryliert und reichert sich im Zytoplasma an (Kim *et al.*, 2013). β -Catenin kann in den Zellkern eintreten und bindet dort an die Transkriptionsfaktoren TCF (*T-cell factor*)/LEF (*lymphoid enhancer factor*) und aktiviert die Transkription von Wnt-Zielgenen, wie c-Myc (He *et al.*, 1998) und Cyclin D1 (Shtutman *et al.*, 1999).

Ist der Wnt-Signalweg inaktiv, wird die Transkription der Zielgene durch die Bindung von TCF/LEF1 und des transkriptionalen Co-Repressors Groucho/TLE (*transducin-like enhancer of split*) an die Promotoren unterdrückt, was auch durch die Rekrutierung von HDACs erfolgt (Billin *et al.*, 2000; Arce *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2013). Durch die Aktivierung des Wnt-Signalweges kommt es zu einer Verdrängung von Groucho/TLE aus dem Komplex mit TCF/LEF1 durch β -Catenin und zu einer Rekrutierung von Transkriptionsaktivatoren, wie der Histonacetyltransferase CBP (Kim *et al.*, 2013). Außerdem vermindert β -Catenin die Aktivität von HDAC1 (Billin *et al.*, 2000). Die Zielgene des Wnt-Signalweges sind involviert in Prozesse wie Proliferation, Überleben, Migration und Zelladhäsion

(Wang *et al.*, 2010). Unter den Zielgenen befinden sich auch die E-Cadherin-Repressoren Snail, Slug, Twist und ZEB1, welche die Expression von E-Cadherin vermindern können (Conacci-Sorrell *et al.*, 2003; Yook *et al.*, 2005; Saydam *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012; Cong *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2014).

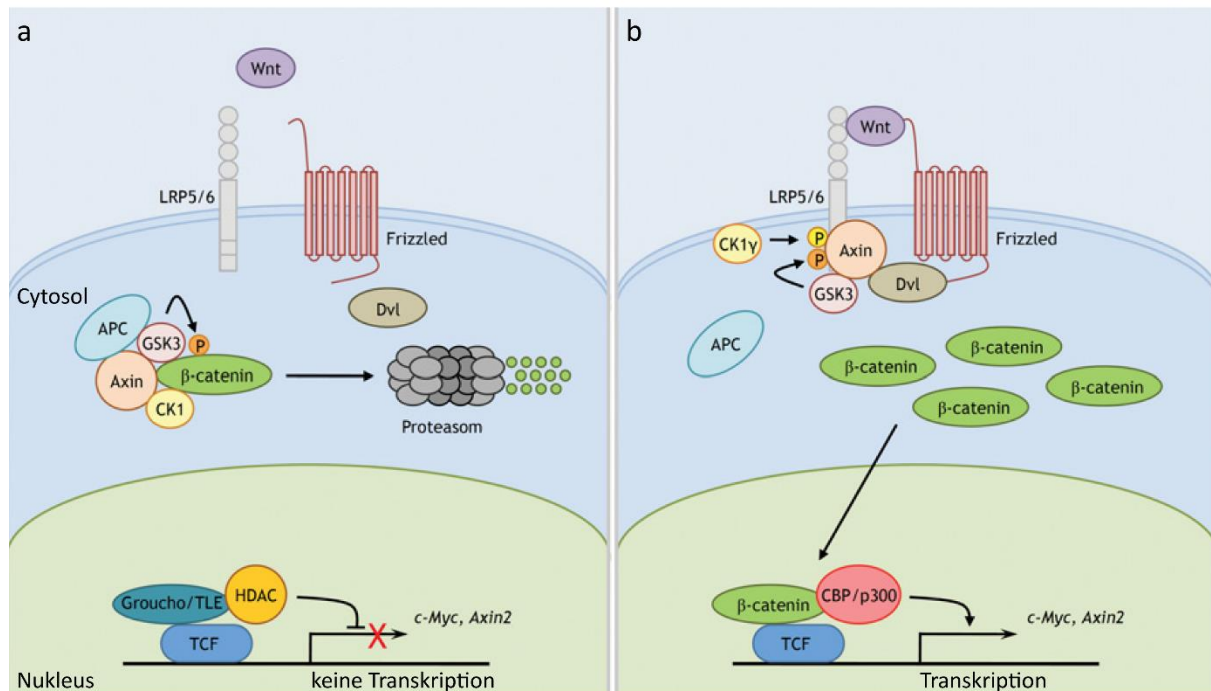


Abbildung 1.6 Einfluss des Wnt-Signalweges auf die Transkription

(a) Sind Wnt-Liganden abwesend, wird cytosolisches β-Catenin kontinuierlich durch einen Komplex aus APC, GSK3β, Casein Kinase 1 (CK1) und Axin phosphoryliert. Die E3 Ligase β-TrCP erkennt phosphoryliertes β-Catenin und führt es dem Ubiquitin-abhängigen Abbau durch das Proteasom zu. Im Kern sind die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF mit dem transkriptionalen Repressor Groucho/TLE verbunden, wodurch die Transkription inhibiert wird. (b) In der Anwesenheit von Wnt-Liganden binden diese an den Rezeptor Frizzled und den Co-Rezeptor LRP6. Dies induziert die Phosphorylierung von LRP5/6 durch die GSK3β und CK1. Dies führt zur Bindung von Axin an phosphoryliertes LRP5/6, wodurch der β-Catenin Phosphorylierungskomplex aufgelöst wird. Es kommt zu einer Anreicherung von cytoplasmatischem β-Catenin, das in den Kern gelangen kann. Dort interagiert es mit TCF/LEF und induziert die Transkription von Wnt-Zielgenen, wie z. B. *c-Myc*, *Axin*, *MMP3*, *MMP7*, *Twist*, *Slug* und *Cyclin D1*. Verändert nach (Heuberger & Birchmeier, 2010; Kim *et al.*, 2013)

Der Wnt-Signalweg spielt auch im Endometrium im Verlauf des Zyklus eine Rolle. Eine Anreicherung von β-Catenin im Zellkern kann in der proliferativen Phase beobachtet werden, während es in der sekretorischen Phase hauptsächlich an der Membran lokalisiert ist (Nei *et al.*, 1999). In Mäusen führt die Aktivierung des Wnt-Signalweges mit Lithiumchlorid zu einer verstärkten Proliferation und Hyperplasien im Endometrium (Gunin *et al.*, 2004; Polotsky *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte die Beteiligung des Wnt-Signalweges an Fibrosen im Kontext von Endometriose gezeigt werden (Matsuzaki & Darcha, 2013b).

1.3 Shrew-1

Die Endometriose teilt sich einige Eigenschaften mit Krebserkrankungen und kann als gutartige invasive Erkrankung gesehen werden (Starzinski-Powitz *et al.*, 2001; Vlahos *et al.*, 2010). Bei beiden Erkrankungen nimmt das Adhäsionsprotein E-Cadherin eine zentrale Rolle ein. In Endometriose-Läsionen können epitheliale Zellen identifiziert werden (Cytokeratin-positiv), die E-Cadherin nicht exprimieren und *in vitro* ein invasives Verhalten zeigen (Gaetje *et al.*, 1997; Zeitvogel *et al.*, 2001). In der epithelialen Zelllinie EEC145T, die aus E-Cadherin-negativen epithelialen Endometriose-Zellen generiert wurde, konnte beobachtet werden, dass sich dieses invasive Verhalten im Laufe der Kultivierung abschwächt (Bharti *et al.*, 2004). In Differential-Display Reverse Transkriptase-PCRs konnte eine mRNA identifiziert werden, die in der invasiven Passage (Passage 17) der EEC145T-Zellen exprimiert wird, jedoch in der späteren, nicht-invasiven Passage (Passage 33) nicht mehr nachweisbar ist. Das Gen, welches auf dem kurzen Arm des Chromosom 1 lokalisiert ist (Chr.1p36.32; NCBI Zugangsnummer AY282806), und das dazugehörige Protein wurden Shrew-1 genannt (Bharti *et al.*, 2004), jedoch wird auch die Bezeichnung *adherens junctions associated protein 1* (AJAP1) verwendet (Zeng *et al.*, 2014).

In Maus (*Mus*) und Zebrafisch (*Danio*), jedoch nicht in *Drosophila* oder *Caenorhabditis elegans*, wurden orthologe Proteine gefunden, was nahelegt, dass Shrew-1 ein Vertebraten-spezifisches Protein ist (Bharti *et al.*, 2004). Das kürzlich entdeckte Protein LEDA-1 (*liver endothelial differentiation-associated protein-1*) weist Homologien zu Shrew-1 auf (Géraud *et al.*, 2010; Evdokimov *et al.*, 2013). Endogen konnte die Expression von Shrew-1 in Lysaten aus Uterus- und Pankreasgewebe gezeigt werden (Bharti *et al.*, 2004). Im humanem Endometrium und der Brustdrüse wird Shrew-1 in epithelialen Zellen exprimiert und colokalisiert mit E-Cadherin und β -Catenin an der Plasmamembran (Abbildung 1.7) (Jakob *et al.*, 2006; Gross *et al.*, 2009).

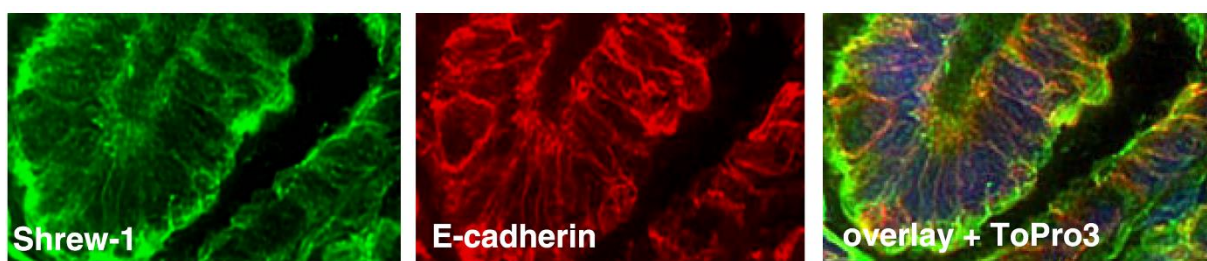


Abbildung 1.7 Expression von Shrew-1 im humanen Endometrium

In Gefrierschnitten aus Biopsien von gesundem, humanem Endometrium kann die Expression von Shrew-1 (grün) in den epithelialen Zellen detektiert werden. Shrew-1 wird somit *in vivo* in endometrialen Zellen exprimiert. Shrew-1 ist in diesen Zellen an der Plasmamembran lokalisiert und colokalisiert dort mit E-Cadherin (rot) und β -Catenin (nicht gezeigt). Die Zellkerne sind in blau dargestellt (ToPro3-Färbung). Entnommen und verändert nach (Jakob *et al.*, 2006).

Das Protein Shrew-1 besteht aus 411 Aminosäuren (AS) und besitzt ein langes Signalpeptid (43 AS) am N-Terminus (Bharti *et al.*, 2004), das für den Transport von Shrew-1 an die Zellmembran verantwortlich ist (Resch *et al.*, 2008). Von den AS 283 bis 303 erstreckt sich eine Transmembrandomäne, die gleichzeitig eine Stopp-Sequenz für die Translation in das endoplasmatische Retikulum enthält (Bharti *et al.*, 2004; Resch *et al.*, 2008). Dieser Aufbau sowie Immunfluoreszenz-Färbungen an permeabilisierten und unpermeabilisierten Zellen deuten darauf hin, dass es sich bei Shrew-1 um ein Typ I Transmembranprotein handelt (Bharti *et al.*, 2004; Resch *et al.*, 2008). In epithelialen Zellen ist exogen überexprimiertes Shrew-1 an der Zellmembran vorwiegend in Bereichen der Zell-Zell-Kontakte lokalisiert und in Co-Immunpräzipitationen konnte eine Interaktion mit E-Cadherin und β -Catenin gezeigt werden (Bharti *et al.*, 2004). Dies legt nahe, dass Shrew-1 Teil der Adhärenzverbindungen ist. In *in vitro* Pull-Down-Versuchen konnte eine direkte Interaktion der cytoplasmatischen Domäne von Shrew-1 mit β -Catenin gezeigt werden. Für die basolaterale Sortierung von Shrew-1 sind drei Tyrosine und ein Dileucin-Motiv in der cytoplasmatischen Domäne verantwortlich (Jakob *et al.*, 2006). Darüber hinaus ist die Interaktion mit der Untereinheit μ 1B des Adapterproteins AP-1B für die basolaterale Sortierung notwendig (Jakob *et al.*, 2006).

Shrew-1 existiert in drei bekannten Isoformen. Isoform 2 besitzt aufgrund der Verwendung eines alternativen Exons im Vergleich zu Isoform 1 ein N-terminal um 11 Aminosäuren verkürztes Signalpeptid (Dissertation Resch, 2011). Dieses Signalpeptid überführt Shrew-1 mit einer geringeren Effizienz in das ER, weswegen dieser Isoform ein modulatorischer Effekt zugesprochen wird. Kürzlich konnte eine weitere Isoform identifiziert werden (Isoform 3), der das gesamte Exon 2 fehlt. Durch die Nutzung eines weiteren Startcodons in der Transmembran-Domäne (Exon 3) entsteht eine verkürzte Shrew-1 Variante, der die extrazelluläre Domäne fehlt (Dissertation Resch, 2011). Es ist möglich, dass die Isoform 3 intrazellulär die gleichen Interaktionen wie Isoform 1 und 2 eingehen und daher die Funktion von Shrew-1 regulieren kann.

1.3.1 Einfluss von Shrew-1 auf den invasiven Phänotyp von Zellen

In MCF7- und HeLa-Zellen führt die Herunterregulation von Shrew-1 zu einem reduzierten motilen Verhalten (Schreiner *et al.*, 2007; Gross *et al.*, 2009). In HT1080 Fibrosarkom-Zellen führt die exogene Überexpression von Shrew-1 zu einer Verstärkung des invasiven Verhaltens (Schreiner *et al.*, 2007), wohingegen die Herunterregulation diesen Phänotyp in HeLa-Zellen abmildert (Schreiner *et al.*, 2007). In HT1080-Zellen konnte eine Interaktion von Shrew-1 mit CD147 (EMMPRIN) nachgewiesen werden, welches die Aktivität von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) induziert. In diesen Zellen führte die Überexpression von Shrew-1 zu einer verstärkten Expression von MMP9 (Schreiner *et al.*, 2007), die

für das invasive Verhalten der Zellen mitverantwortlich sein können. Die Überexpression von Shrew-1 in MCF7-Zellen führt zur verstärkten Internalisierung von E-Cadherin nach dessen funktioneller Blockierung (DECMA1) oder Stimulation mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF), wohingegen die Herunterregulation den gegenteiligen Effekt hat (Gross *et al.*, 2009). In Shrew-1 überexprimierenden MCF7-Zellen kann die Vorformierung eines Signalkomplexes aus Her2, Src, E-Cadherin und Shrew-1 beobachtet werden und die Behandlung mit EGF führt zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERK1/2 (Gross *et al.*, 2009). Dies deutet darauf hin, dass Shrew-1 einen fördernden Einfluss auf das motile und invasive Verhalten von Endometriose- als auch Karzinom- und Sarkomzellen hat. Gleichzeitig lokalisiert Shrew-1 jedoch in den Adhärenzverbindungen (Bharti *et al.*, 2004; Schreiner *et al.*, 2007; Gross *et al.*, 2009). Invasivität und die Anwesenheit von stabilen Zell-Zell-Kontakten scheinen sich zu widersprechen. Daher wird angenommen, dass Shrew-1 einen modulatorischen Effekt auf die Dynamik von Adhärenzverbindung haben könnte (Gross *et al.*, 2009).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Endometriose ist eine gutartige gynäkologische Erkrankung, die sich in Bezug auf das zelluläre Verhalten jedoch Eigenschaften mit Tumorerkrankungen teilt. Dazu zählt unter anderem die Invasivität in ektope Strukturen, vor allem in der Bauchhöhle. Dabei scheinen epitheliale Zellen, denen die Expression des Adhäsionsproteins E-Cadherin fehlt, eine entscheidende Rolle zu spielen. Aus solchen Zellen wurde das Zellkulturmodell 12Z zur Erforschung der Endometriose abgeleitet.

Im Kontext invasiver epithelialer Endometriose-Zellen wurde das Transmembranprotein Shrew-1 entdeckt. Shrew-1 hat einen fördernden Einfluss auf die Motilität und Invasivität diverser Tumorzelllinien und moduliert die Internalisierung von E-Cadherin in Brustkrebszellen (MCF7). In der Endometriose-Zelllinie 12Z führt die Herunterregulation von Shrew-1 zur Reexpression von E-Cadherin. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu analysieren, auf welche Weise Shrew-1 einen Einfluss auf die E-Cadherin-Expression nimmt und ob die Herunterregulation von Shrew-1 weitere Veränderungen induziert.

2 Material

2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Abdichtefolie	Parafilm „M“, Pechiney Plastic
Agarose-Elektrophoresekammern	40-0708, 40-0911, 40-1214, Peqlab Biotechnologie
Autoklav	Bioclav, Schütt
Zellkultureinsätze	BioCoat Matrigel™, 8 µm Poren, 354480, BD Biosciences; ThinCert™, 8µm Poren, 662638, Greiner Bio-One
Blotting-Apparatur (semi-dry)	Peqlab Biotechnologie
CO ₂ -Inkubator	Heracell™ 240i, Thermo Scientific
Chemikalienschrank	Düpperthal
Deckgläschen	22 x 22 mm, Roth
Dokumentationssystem für Agarosegele	Image Master VDS, Pharmacia Biotech
Dokumentationssystem	GenoPlex, VWR
Drehrad	VWR
Durchflusszytometer	FACSCanto, BD Biosciences
Einschweißgerät	Petra Electric Vacuplus, VWR
Elektrophoresekammer (SDS-PAGE)	45-1010i, 45-1614i, Peqlab Biotechnologie
Filter	Filtropur 0,22 µm , 0,45 µM, Sarstedt
Gefrierschränke	-20°C, Liebherr, Heraeus; -80°C, New Brunswick Scientific
Gel-Blotting-Papier	Schlucher & Schuell
Glaswaren	Schott
Heizblöcke	Dri-Block DB-3, Techne
Inkubator	MaxQ™ 6000, Thermo Scientific
Kühlschränke	Liebherr
Real-Time PCR System	LightCycler® 480, Roche; StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems; CFX-96 Cycler, Biorad
Magnetrührer	Ikamag Reo, Janke & Kunkel

Bezeichnung	Hersteller
Mikroskope	Axiovert 100 und 135, Zeiss; TCS SP5, Leica; BZ9000, Keyence
Mikrowelle	Dimension 4, Panasonic
Netzgeräte	Consort E143, Consort E835, Consort
Nitrozellulosemembran	Amersham™ Protran™ (0,45 µm), Amersham Biosciences
Objektträger	Thermo Scientific, Roth
PCR-Arbeitsstation	Peqlab
pH-Meter	SevenEasy, Mettler Toledo
Photometer	Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences
Pipetten und Pipettierhilfen	Pipetman P2, P10, P20, P200, P1000, Gilson; Acu-Jet, Brand; Research® plus, Eppendorf
Plastikware und Reaktionsgefäße	Sarstedt; Greiner, Eppendorf
Plattenlesegerät	Infinite® 200 PRO, Tecan
PVDF-Membran	Amersham Biosciences
Röntgenfilme	RP new 13 x 18 blue sensitive, CEA
Schüttler	Duorax 1030, Heidolph; KL2, Fisher Scientific
Sterilbänke	Lamin Air HB 2448, Heraeus; HERAsafe™ KSP 12, Thermo Scientific
Thermocycler	PeqSTAR, PeqLab
Thermostat	Thermomix MM, Braun
Ultraschall-System	Bioruptor, Diagenode
Vortex-Gerät	Vortex Genie 2, Bender & Hobein
Waagen	Laboratory LC 420, Laboratory LC 4200, BA 61, Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage	GenPure xCAD, TKA
Wasserbad	Thermocycler 60, Bio.med
Zählkammer	0.1 mm x 0.0025 mm ² , Marienfeld
Zentrifugen	Biofuge A, Biofuge 13, Biofuge 28 RS, Megafuge 1.0 R, Heraeus; Centrifuge 5415 D, Centrifuge MiniSpin®, Eppendorf

2.2 Chemikalien, Stammlösungen und Puffer

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka BioChemica (Steinheim), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Wässrige Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert. Nicht erhitzbare Lösungen wurden steril filtriert (0,22 µm Porengröße; Millipore). In Tabelle 2.2 sind alle verwendeten Chemikalien, Puffer und Lösungen aufgeführt.

Tabelle 2.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalien, Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Agarose	1,5 % bzw. 2,5 % Agarose [w/v] in TBE-Puffer 0,5x
Ammoniumpersulfat 10 %	10 % Ammoniumpersulfat (APS) [w/v] in ddH ₂ O Lagerung bei 4°C, lichtgeschützt
Biotin	0,5 mg EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) in 1 ml PBS 1x
Blockierungslösung (IF)	0,25 % Triton X-100 [v/v] 10% FCS „gold“ (PAA) [v/v] in PBS 1x
BSA 5 %	5 % BSA [w/v] in TBS-T
Bromphenolblau 0,2 %	0,2 % Bromphenolblau [w/v] in ddH ₂ O
Calciumchlorid 2,5 M	2,5 M CaCl ₂ in ddH ₂ O, steril filtrieren
ChIP Eluierungspuffer	1 % SDS [w/v] 100 mM NaHCO ₃
ChIP Lysepuffer	50 mM HEPES-KOH pH 7,5 140 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8 1% Triton X-100 [v/v] 0,1 % Natrium Desoxycholat [w/v] 0,4 % SDS [w/v], steril filtrieren
ChIP RIPA Puffer	150 mM NaCl 50 mM TRIS-HCl pH 8 0,5 % Natrium Desoxycholat [w/v] 1 % NP-40 [w/v] 2 mM EDTA pH 8, steril filtrieren

Chemikalien, Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
ChIP Waschpuffer I	150 mM NaCl 20 mM TRIS-HCl pH 8 1 % Triton X-100 [w/v] 2 mM EDTA pH 8 0,1 % SDS[w/v], steril filtrieren
ChIP Waschpuffer II	500 mM NaCl 20 mM TRIS-HCl pH 8 1 % Triton X-100 [w/v] 2 mM EDTA pH 8 0,1 % SDS[w/v],
CoIP Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8 150 NaCl 5 mM EDTA pH 8 60 mM N-Octylglucopyranisid 1 % Triton X-100 [v/v], steril filtrieren
DAPI Stammlösung	500 µg/ml in PBS 1x
DAPI Arbeitslösung	1 µg/ml in PBS 1x
Diethylpyrocarbonat (DEPC) H ₂ O	0,1 % DEPC in ddH ₂ O
DNA Ladepuffer 6x	80 % Glycerin [v/v] 0,1 % Xylencyanol [w/v] 0,1 % Bromphenolblau [w/v] in ddH ₂ O
ECL (<i>enhanced chemiluminescence</i>) Lösung	0,198 mM p-Cumarinsäure 1,25 mM Luminol 100 mM TRIS-HCl pH 8,5 in ddH ₂ O 0,5 µl/ml H ₂ O ₂ frisch zugeben
Ethylendiamintetraessigsäure 0,5 M pH 8;0	0,5 M EDTA [w/v] in ddH ₂ O pH mit 37 %iger HCl einstellen
Glycin 1 M	1 M Glycin ddH ₂ O
HBS 2x	280 mM NaCl 10 mM KCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 12 mM Glucose 50 mM HEPES pH mit 1M NaOH auf 7,2 eingestellt Lagerung bei 4°C
Hepes	1 M Hepes in ddH ₂ O, pH 7,2

Chemikalien, Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Luminol Stammlösung	250 mM Luminol in DMSO
Magermilchlösung 5 %	5 % Magermilchpulver [w/v] in TBS-T
Mowiol 4-88	6 g Glycerin (86 %) 2,4 g Mowiol 4-88 450 mg DABCO 12 ml 0,2 M Tris HCl pH 8,5 6 ml ddH ₂ O
Natriumazid 10 %	10 % NaN ₃ [w/v] in ddH ₂ O
Natriumchlorid 5 M	5 M NaCl in ddH ₂ O
Natriumhydrogencarbonat 1 M	1 M NaHCO ₃ in ddH ₂ O
NeutrAvidin Agarose Granulat	Thermo Scientific, 29200
Paraformaldehyd 4 %	4 % PFA [w/v] in PBS 1x
PBS 10x	1,37 M NaCl 26 mM KCL 81 mM Na ₂ HPO ₄ 15 mM KH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O
PBS 1x	10 % PBS 10x [v/v] in ddH ₂ O
p-Cumarinsäure Stammlösung	90 mM p-Cumarinsäure in DMSO
Protease-Inhibitor 25x	1 Tablette Complete™ Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche) in 2 ml ddH ₂ O lösen
Protein G Sepharose Granulat	Protein G Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare Life Science, 17-0618-01
RIPA (<i>radio immuno precipitation assay</i>)-Puffer	150 mM NaCl 50 mM TRIS-HCl pH 7,5 0,25 % Natrium Desoxycholat [w/v] 1 % NP-40 [w/v] 0,1 % SDS 1 mM EDTA, steril filtrieren
Saponin Puffer	50 mM Tris HCL pH 7,5 150 mM NaCl 5 mM EDTA pH 7,5 0,1 % Saponin [w/v] in ddH ₂ O, Puffer immer frisch ansetzen
SDS Elektrophoresepuffer 10x	250 mM Tris-HCl 1,9 M Glycin 1 % SDS [w/v]

Chemikalien, Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
SDS Elektrophoresepuffer 1x	10 % SDS 10x [v/v] in ddH ₂ O
SDS 2,5 %	2,5 % SDS in ddH ₂ O [w/v]
TBE-Puffer 10x	890 mM Tris 890 mM H ₃ BO ₄ 25 mM EDTA autoklavieren
TBE-Puffer 0,5x	5 % TBE 10x [v/v] in ddH ₂ O
TBS (Tris buffered saline)-Puffer 10x	1,5 M NaCl 100 mM Tris-HCl pH 7,5 in ddH ₂ O
TBS 1x	10 % TBS 10x [v/v] in ddH ₂ O
TBS-T (Tris buffered saline-Tween-20)	10 % TBS 10x [v/v] 0,05 % Tween-20 [v/v] in ddH ₂ O
TFB I Puffer	100 mM KCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM C ₂ H ₃ NaO ₂ 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin [v/v], steril filtriert
TFB II Puffer	10 mM MOPS 75mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15 % Glycerin [v/v] pH mit KOH auf 7 einstellen, steril filtriert
Transfer-Puffer Nitrocellulose	25 mM Tris-HCl pH 8,8 150 mM Glycin 10 % Methanol [v/v] nach dem Autoklavieren zufügen
Transfer Puffer PVDF	25 mM Tris-HCl pH 8,8 192 mM Glycin 20 % Methanol [v/v] nach dem Autoklavieren zufügen
TRIS HCl 0,62 M pH 6,9	0,62 M Tris [w/v] pH 6,9 mit 37 %iger HCl einstellen
TRIS HCl 1 M pH 7,5, pH 8, pH 8,5, pH 9,5	1 M Tris [w/v] pH mit 37 %iger HCl einstellen

Chemikalien, Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
TRIS HCl 1,88 M pH 8,8	1,88 M Tris [w/v] pH 8,8 mit 37 %iger HCl einstellen
Trypanblau	0,5 % Trypanblau [w/v] in PBS 1x

2.3 Größenstandard

Die verwendeten DNA- und Proteingrößenstandards sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

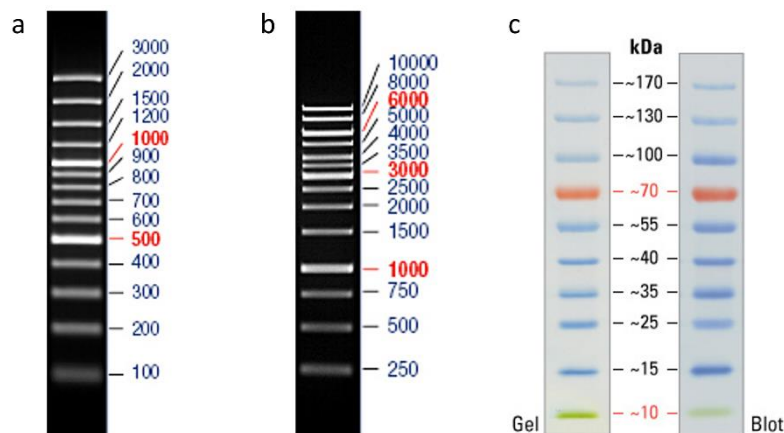


Abbildung 2.1 Größenstandards

(a) GeneRuler 1 kb DNA-Leiter und (b) GeneRuler 100 bp Plus DNA-Leiter (Thermo Scientific) aufgetrennt in einem 1 % bzw. 1.7 % Agarosegel. Die Bandengröße ist in Basenpaaren angegeben. (c) Abbildung der PageRuler prestained Protein-Leiter (Thermo Scientific) in einem Tris-Glycin Gel und nach dem Übertragen auf eine Membran mit Angabe der Bandengröße in Kilodalton (kDa).

2.4 Antikörper

In den Tabellen 2.3 und 2.4 sind die verwendeten Antikörper aufgelistet. Färbungen des Aktinzytoskelettes in Immunfluoreszenz-Präparaten erfolgten mit dem ActinGreen™ 488 / ActinRed™ 555 ReadyProbes® Reagenz (Life Technologies).

Tabelle 2.3 Primäre Antikörper

Liste der verwendeten primären Antikörper für Western Blot (WB)- und Immunfluoreszenz (IF)-Färbungen, sowie Co-Immunpräzipitationen (CoIP) und Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP). Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in Blockierungslösung für Immunfluoreszenz-Färbungen bzw. TBS-T für Western Blots (Zugabe von Magermilchpulver oder BSA wenn angegeben).

Antikörper (anti-)	Spezies	Hersteller / Referenz	Verdünnung
AJAP1 (Shrew-1) (ab121361)	Kaninchen	Abcam	WB 1:1000 (5 % Magermilch)
BP (Hybridom)	Maus	(Rüdiger <i>et al.</i> , 1997)	CoIP 10 µl WB 1:2000

Antikörper (anti-)	Spezies	Hersteller / Referenz	Verdünnung
β-Catenin (H102)	Kaninchen	Santa Cruz	CoIP 2 µg IF 1:100 WB 1:1000
E-Cadherin DECMA1 (Hybridom)	Ratte	(Vestweber & Kemler, 1985)	
E-Cadherin (cl 36)	Maus	BD Transduction Laboratories	IF 1:100 WB 1:500
GAPDH (cl 6C5)	Maus	Ambion	WB 1:10000
GFP (cl 7.1 + 13.1)	Maus	Roche	WB 1:1500
H3K9ac (ab10812)	Kaninchen	Abcam	ChIP 3µg
HDAC1 (cl 10E2)	Maus	Santa Cruz	ChIP 2 µg CoIP 2 µg WB 1:200 (5 % Magermilch)
HDAC2 (HDAC2-62)	Maus	Abcam	ChIP 4 µg CoIP 2 µg WB 1:5000
Keratin K8 (cl 8.7)	Maus	Progen	WB 1:500
N-Cadherin (cl 32)	Maus	BD Transductions Laboratories	WB 1:2500
Occludin	Kaninchen	Millipore	WB 1:5000
p120-Catenin (cl 98)	Maus	BD Transductions Laboratories	IF 1:100 WB 1:1000
RFP / mCherry (cl 5F8)	Ratte	Chromotek	WB 1:1000
RNA-Polymerase II (cl 4H8)	Maus	Abcam	ChIP 2,5 µg
Shrew-1 (Hybridom)	Maus	Nanotool	WB 1:500
Shrew-1/AJAP1 (murin)	Schaf	R&D Systems	WB 1:1000 (2 % Magermilch)
Shrew-1 (C14)	Ziege	Santa Cruz	WB 1:200 (5 % Magermilch)
Slug (C19G7)	Kaninchen	Cell Signaling	WB 1:1000
Snail (C15D3)	Kaninchen	Cell Signaling	WB 1:1000
Snail (H-130)	Kaninchen	Santa Cruz	WB 1:500
Twist (H-81)	Kaninchen	Santa Cruz	WB 1:500
Vimentin (cl3B4)	Maus	DAKO	WB 1:1250
Vinculin	Maus	Sigma	IF 1:100

Tabelle 2.4 Sekundäre Antikörper

Liste der verwendeten Antikörper als sekundäre Antikörper in Western Blot- und Immunfluoreszenz-Färbungen und als unspezifische Antikörper in Co-Immunpräzipitationen (CoIP) und Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP). HRP = Meerrettich-Peroxidase.

Antikörper (anti-)	Konjugation	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Maus IgG	HRP	Ziege	Biosource	1:7500
Maus IgG	Alexa Fluor 488 / 594 / 647	Ziege	Abcam	1:400
Maus IgG	-	Maus	Santa Cruz (sc-2025)	ChIP 4 µg
Maus IgG	-	Maus	Sigma	CoIP 2 µg
Kaninchen IgG	HRP	Ziege	Jackson Immuno Research	1:20000
Kaninchen IgG	Alexa Fluor 488 / 594 / 647	Ziege	Abcam	1:400
Kaninchen IgG	-	Kaninchen	Santa Cruz (sc-2027)	ChIP 4 µg
Kaninchen IgG	-	Kaninchen	Sigma	CoIP 2 µg
Ratte IgG	HRP	Ziege	Jackson Immuno Research	1:20000
Ratte IgG	Alexa Fluor 488 / 594	Ziege	Abcam	1:400
Ziege IgG	HRP	Esel	Santa Cruz (sc-2020)	1:1000 (5 % Magermilch)
Ziege IgG	Alexa Fluor 488 / 594	Esel	Abcam	1:400

2.5 Bakterienstamm und -medien

Für die Transformation und Plasmid-DNA-Amplifizierung wurde der Bakterienstamm *Escherischia coli* (*E. coli*) DH5α eingesetzt (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5 Bakterienstamm für die Plasmidtransformation und –amplifizierung

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherischia coli</i> DH5α	F ⁺ suppE44 ΔlacU 169 φ80lacZΔM15 hsdR17 recA1 ebdA1 gyrA96 thi-1 relA1	(Bachmann, 1983)

In Tabelle 2.6 sind die für den Bakterienstamm *E. coli* DH5 α verwendeten Medien und Antibiotika aufgelistet.

Tabelle 2.6 Bakterienmedien und Antibiotika

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ampicillin Stammlösung	100 mg/ml Ampicillin
Kanamycin Stammlösung	30 mg/ml Kanamycin
LB Agar	10 g Pepton aus Casein 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 18 g Agar in 1 l ddH ₂ O lösen, mit 5 N NaOH auf pH 7 einstellen, autoklavieren
LB Medium	10 g Pepton aus Casein 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl in 1 l ddH ₂ O lösen, mit 5 N NaOH auf pH 7 einstellen, autoklavieren
LB Ampicillin bzw. Kanamycin Agar	100 μ g/ml Ampicillin bzw. 30 μ g/ml Kanamycin in LB Agar
LB Ampicillin bzw. Kanamycin Medium	100 μ g/ml Ampicillin bzw. 30 μ g/ml Kanamycin in LB Medium

2.6 Eukaryotische Zelllinien, Zellkulturmedien, Lösungen und Zusätze

Die für die Experimente verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2.7 aufgezählt. In Tabelle 2.8 sind die Medien, Lösungen und Zusätze für die verwendeten eukaryotischen Zellen erfasst.

Tabelle 2.7 Verwendete eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Referenz
10Z	humane Endometriose-Läsion (epitheliale)	(Zeitvogel <i>et al.</i> , 2001)
12Z	humane Endometriose-Läsion (epitheliale)	(Zeitvogel <i>et al.</i> , 2001)
49Z	humane Endometriose-Läsion (epitheliale)	(Zeitvogel <i>et al.</i> , 2001)
17B	humane Endometriose-Läsion (stromal)	(Zeitvogel <i>et al.</i> , 2001)
18B	humane Endometriose-Läsion (stromal)	(Zeitvogel <i>et al.</i> , 2001)
22B	humane Endometriose-Läsion (stromal)	(Zeitvogel <i>et al.</i> , 2001)
HEK 293T	humane embryonale Niere	ATCC: CRL-11268
MCF7	humanes Adenokarzinom der Brustdrüse	ATCC: HTB-22
MDA-MB 435s	pleurale Metastase eines Melanoms (human)	ATCC:HTB-129

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Referenz
MCF10A	humane Brustdrüse (epithelial)	ATCC: CRL-10317
UO31	humanes Nierenkarzinom	National Cancer Institute

Tabelle 2.8 Medien, Lösungen und Zusätze für eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM-/-(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), high glucose	PAA Laboratories, Bestellnummer: E15-843 Lagerung bei 4°C
DMEM+/-	DMEM/- high glucose 10 % FCS [v/v] 1 % Penicillin/Streptomycin [v/v] Lagerung bei 4°C
DMEM/Ham's F12+/- (Debnath <i>et al.</i> , 2003)	5 % Pferdeserum [v/v] 20 ng/ml EGF 0,5 µg/ml Hydrocortison 100 ng/ml Cholera toxin 10 µg/ml Insulin 1 % Penicillin/Streptomycin [v/v]
FCS (Fötale Kälberserum)	Gibco (10270)
FCS, gold	PAA Laboratories (A15-101)
Penicillin/Streptomycin Lösung	PAA Laboratories (P11-010) 10'000 U/ml Penicillin 10'000 µg/ml Streptomycin Lagerung bei -20°C, geöffnet bei 4°C
Trypsin-Lösung	8 g NaCl 0,4 g KCl 1 g Glucose 1 g Trypsin 0,58 g NaHCO ₃ 0,2 g EDTA Mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen, steril filtrieren Lagerung bei -20°C, geöffnet bei 4°C

2.7 Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.9 aufgelistet und lagen zu Beginn der Arbeit vor. Die SEW- (Demaison *et al.*, 2002) und iC2 (Weber *et al.*, 2008) Vektoren eignen sich zur Herstellung selbstinaktivierender lentiviraler Viruspartikel.

Tabelle 2.9 Verwendete Plasmide

Vektor	Beschreibung
iC2	iC2-Leervektor, mCherry als Infektionsmarker
iC2 Shrew-1 BP	iC2-Leervektor mit Sequenz für humanes Shrew-1(Gen-Bank Nr. AY282806) mit BP (Birkenprofilin)-Tag (Rüdiger <i>et al.</i> , 1997)
SEW	SEW-Leervektor, GFP als Infektionsmarker
SEW Shrew-1 KD	SEW-Leervektor mit shRNA gegen humanes Shrew-1
p8.91	virales Verpackungsplasmid (Kapsidproteine und virale Enzyme)
pMD2 VSV-G	virales Verpackungsplasmid (Hüllproteine)

Für die Herunterregulation (Knockdown, KD) von Shrew-1 mit dem SEW-Vektor wurde die folgende shRNA-Sequenz verwendet (Schreiner *et al.*, 2007). Die Zielsequenzen sind in Klammern.

vorwärts: 5' GAT CCG [CGA GAC CCT GCA GTG TTC T]TT CAA GAG A[AG AAC ACT GCA GGG TCT CG]T TTT TTG GAA A 3'

rückwärts: 5' AGC TTT TCC AAA [CGA GAC CCT GCA GTG TTC T]TC TCT TGA A[AG AAC ACT GCA GGG TCT CG]C G 3'

Dies shRNA befindet sich im SEW-Vektor (*central polypurine tract (pSIN.cPPT)/ spleen focus forming virus (SFFV)/enhanced green fluorescent protein (EGFP)/woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE)*) unter Kontrolle des U5-Promotors (Demaison *et al.*, 2002). Die Expression des Infektionsmarkers GFP erfolgt für den unabhängigen SFFV-Promotor. Der iC2-Vektor besitzt vor der Sequenz für Shrew-1 BP einen SFFV-Promotor und die Expression von mCherry erfolgt über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) (Weber *et al.*, 2008).

2.8 Oligonukleotide

Die in Tabelle 2.10 aufgezählten Oligonukleotide dienen als Primer in der Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR), PCR und quantitativen PCR (qPCR) und wurden von der Firma Microsynth (Balgach, Schweiz) bezogen.

Tabelle 2.10 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotide (Primer) in vorwärts Orientierung sind mit einem „F“ gekennzeichnet. Oligonukleotide in rückwärts Orientierung sind mit einem „R“ gekennzeichnet.

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3' Richtung
Oligo (dT) Primer	GAC TCG AGT CGA CAT CGA TTT TTT TTT TTT TTT TT
F_BIP	TAC ACT TGG TAT TGA AAC TG
R_BIP	GGT GGC TTT CCA GCC ATT C
F_CDH1_ChIP_1	GGG GCA TCC GTA GAA ATA AAG GC
R_CDH1_ChIP_1	CAC TTT CCT TAG ACC GGG AAT GC
F_CDH1_ChIP_3	GAC TGG GAC CAC ATG AGA TGA AG
R_CDH1_ChIP_3	GAG ATT GAG GCC AAT GAG AGG TG
F_CPDEcad	CCG AAT TCC TTC GGA GGA GAG CGG TGG TC
R_CPDEcad	CGA GTC GAC CTA GTC GTC CTC GCC GCC TC
F_Ecad_CH3	GGT GAA TTT TTA GTT AAT TAG CGG TAC
R_Ecad_CH3	CAT AAC TAA CCG AAA ACG CCG
F_Ecad_UN	GGT AGG TGA ATT TTT AGT TAA TTA GTG GTA
R_Ecad_UN	ACC CAT AAC TAA CCA AAA ACA CCA
F_Ecad_M	TTA GGT TAG AGG GTT ATC GCG T
R_Ecad_M	TAA CTA AAA ATT CAC CTA CCG AC
F_Ecad_U	TAA TTT TAG GTT AGA GGG TTA TTG T
R_Ecad_U	CAC AAC CAA TCA ACA ACA CA
F_S1	TTT TGA TTT TAG GTT TTA GTG AGT TAT
R_S2	AAT ACC TAC AAC AAC AAC AAC AA
F_S3	TGT AGG TTT TAT AAT TTA TTT AGA TTT
R_S4	ACT CCA AAA ACC CAT AAC TAA C
F_GAPDH	TCT ATA AAT TGA GCC CGC AGC C
R_GAPDH	TAC GAC CAA ATC CGT TGA CTC C
F_Shrew-1	AAC CTC ACG GAC TTC CCC TCG
R_Shrew-1 3'UTR	GAG GTA AAA AAG ACT TCG GCC
F_Exon1_27mer	TCT GAG GCC CCG CTC CCC GAA ACG TGA
R_3'UTR_28mer	GGC GTC TGC CCT GCC CCC AGG AGG TAA A
F_Exon1a_29mer	ATC CGG AGC AGA TCT CAT TTC CCT GAG TA
R_Exon2_28mer	ACG AAG AGG CGA GGG AAG GGC TGG ATT T
F_Twist1	TTC TCA AGA GGT CGT GCC AAT C
R_Twist1	CAG GCC AGT TTG ATC CCA GTA T

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3' Richtung
F_ZEB1	GCA CCT GAA GAG GAC CAG AG
R_ZEB1	TGC ATC TGG TGT TCC ATT TT

2.9 Kits

Die verwendeten Kits sind in Tabelle 2.11 aufgeführt.

Tabelle 2.11 Die Kits wurden nach den Angaben der Hersteller verwendet

Bezeichnung	Hersteller
ChIP DNA Clean & Concentrator	Zymo Research
EpiTect Bisulfite Kit (59104)	Qiagen
GeneJET Genomic DNA Purification	Thermo Scientific
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel
pGEM-T Easy Vector System	Promega

2.10 Software

In Tabelle 2.12 sind die verwendeten Software-Programme angegeben.

Tabelle 2.12 Verwendete Software

Software	Firma
Adobe Acrobat X pro	Adobe Systems
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems
Clone Manager Professional Suite Version 8	Scientific & Educational Software
Fiji	Image J
Gimp2.8	Gimp
Image J	Image J
Imaris 6.2.1	Bitplane
Leica Application Suite Advanced Fluorescence 2.4.1 build 6384	Leica Microsystems
LightCycler 480 Software	Roche
Microsoft Office 2007 / 2013	Microsoft
OriginPro 2015G	OriginLab

2.11 Internet-Quellen

Folgende Internet-Quellen wurden während dieser Arbeit verwendet (Tabelle 2.13).

Tabelle 2.13 Internet-Quellen

National Center for Biotechnology Information (NCBI) und die dort verfügbaren Programme
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

UCSC Genome Bioinformatics (<https://genome-euro.ucsc.edu/index.html>)

Student's t-Test (<http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test.html>)

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Nucleinsäuren

3.1.1 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Proben erfolgte über die Messung der Absorption von 1:40 bis 1:100 verdünnten Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm. Als Referenz wurde das entsprechende Lösungsmittel verwendet. Die Konzentrationen wurden folgendermaßen ermittelt:

DNA-Konzentration [$\mu\text{g} / \mu\text{l}$] = Absorption_{260nm} x Verdünnungsfaktor x 0,05 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$

RNA-Konzentration [$\mu\text{g} / \mu\text{l}$] = Absorption_{260nm} x Verdünnungsfaktor x 0,04 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$

3.1.2 RNA-Isolation, Reverse Transkription

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem Kit NucleoSpin RNA II von Macherey-Nagel und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die isolierte RNA wurde in RNase-freiem ddH₂O eluiert und bei -80°C gelagert.

Aus der extrahierten Gesamt-RNA wurde anschließend die mRNA in cDNA umgeschrieben (Reverse Transkription). Dies erfolgte mit der Maxima Reversen Transkriptase (Thermo Scientific, #EP0741). Die Ansätze wurden auf Eis pipettiert.

Isolierte RNA	4 μg
Oligo (dT) Primer [100 μM]	1 μl
dNTP-Mix [je 10 mM]	1 μl
RNase-freies ddH ₂ O	auf 14,5 μl

Inkubation bei 65°C für 5 Minuten und Abkühlen der Proben auf Eis

RT Puffer 5x	4 μl
RiboLock RNase-Inhibitor (Thermo Scientific, #E00381)	1 μl
Maxima Reverse Transkriptase [200 U/ μl]	1 μl

Inkubation bei 50°C für 30 Minuten und anschließend bei 85°C für 5 Minuten. Die Lagerung der cDNA-Proben erfolgte bei -20°C.

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit cDNA-Proben

Fragmente der cDNA-Proben wurden in PCRs mit der Taq-Polymerase (DreamTaq Green DNA Polymerase, Thermo Scientific, #EP0711) vervielfältigt. Die Ansätze wurden auf Eis als Master-Mix

angefertigt. Schritte der PCR-Reaktion bei Verwendung der Primer F_Shrew-1 und R_Shrew-1 3'UTR. Die PCR erfolgte in 35 Zyklen (Schritt 2 bis 4). Bei der PCR mit den Primer F_BIP und R_BIP wurde die Elongation unter Schritt 4 auf 90 Sekunden erhöht. Die Verwendung der Primer F_CPDEcad und R_CPDEcad erfolgte die Primeranlagerung bei 61°C und die zyklische Elongation für 60 Sekunden.

DreamTaq Green Puffer 10x	2,5 µl
dNTP-Mix [je 10 mM]	0,5 µl
vorwärts Primer [10 µM]	1,25 µl
rückwärts Primer [10 µM]	1,25 µl
cDNA-Probe	1 µl
DreamTaq DNA Polymerase [5 U/µl]	0,25 µl
ddH ₂ O	18,25 µl

1. Schritt: Denaturierung	95°C	2 Minuten
2. Schritt: Denaturierung	95°C	30 Sekunden
3. Schritt: Primeranlagerung	56°C	30 Sekunden
4. Schritt: Elongation	72°C	30 Sekunden
5. Schritt: Elongation	72°C	10 Minuten

3.1.4 Gel-Elektrophorese

Für die Gel-Elektrophorese wurden PCR-Produkte auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen und unter elektrischer Spannung bis zur gewünschten Auftrennung separiert. Die Elektrophorese erfolgt in TBE-Puffer 0,5x. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurde der Agarose vor Gießen des Geles der DNA-Farbstoff Roti-Gel Stain (3865.1, Roth) zugesetzt. Nach der Auftrennung wurden die Banden unter UV-Licht detektiert.

3.1.5 Quantitative PCR TaqMan

Die quantitativen PCRs (qPCR) wurden mit in ddH₂O 1:10 verdünnten cDNA-Proben mit kommerziellen Primern und TaqMan-Sonden für E-Cadherin, Shrew-1, Snail, Slug, GAPDH und RPS13 (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Jede Probe wurde als Duplikat angesetzt und der Mittelwert berechnet. Für die qPCRs mit TaqMan-Sonden wurden das Real-Time PCR System von Applied Biosystems und Biorad verwendet. Die relative Quantifizierung erfolgte durch

den Bezug der gemessenen Ct-Werten (*cycle threshold*) auf die Haushaltsgene GAPDH oder RPS13 ($2^{\Delta\Delta Ct}$).

3.1.6 DNA-Extraktion, Bisulfit-Konvertierung, MSP

Für die Isolation genomischer DNA wurden die eukaryotischen Zellen mit Trypsin-Lösung von den Zellkulturschalen gelöst und nach der Zugabe von DMEM+/+ bei 1000xg für 3 Minuten pelletiert. Nach dem Resuspendieren in PBS 1x wurde die Zellzahl bestimmt und pro Zelllinie 2×10^6 Zellen abgenommen und bei 250xg für 5 Minuten pelletiert. Die Zellen wurden in 200 μ l PBS 1x aufgenommen. Die Isolation der genomischen DNA erfolgte mit dem Kit GeneJET Genomic DNA Purification (Thermo Scientific) nach den Angaben des Herstellers.

Für die Bisulfit-Konvertierung wurde pro Probe 1 μ g genomischer DNA eingesetzt. Die Konvertierung erfolgte mit dem Kit EpiTect Bisulfite (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

Die Analyse der Bisulfit-konvertierten DNA erfolgte über Methylierung-spezifische PCRs (MSP). Dazu wurde zuerst der Bereich des CDH1-Promotors von Position -277 bis 177 in einer PCR mit den Primern F_S1 und R_S2 (DreamTaq Green DNA Polymerase, Thermo Scientific, #EP0711) vervielfältigt. Diese PCRs dienen als Template für die folgenden MSPs. Die Primer-Paare F_Ecad_CH3 + R_Ecad_CH3 und F_Ecad_M + R_Ecad_M können nur an den Promotorbereich binden, wenn die enthaltenen CpGs methyliert und somit vor der Konvertierung zu Uracil geschützt waren. Die Primer Paare F_Ecad_UN + R_Ecad_UN und F_Ecad_U + R_Ecad_U können nur binden, wenn die enthaltenen CpGs nicht methyliert waren. Für die MSPs wurden die Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, #EP0601) verwendet. Alle PCR-Ansätze wurden auf Eis als Master-Mix pipettiert.

DreamTaq Green Puffer 10x	5 μ l
dNTP-Mix [je 10 mM]	1 μ l
F_S1 [10 μ M]	2,5 μ l
R_S2 [10 μ M]	2,5 μ l
cDNA-Probe	50 ng
DreamTaq DNA Polymerase [5 U/ μ l]	0,25 μ l
ddH ₂ O	auf 50 μ l

Die PCRs erfolgten in 35 Zyklen (Schritt 2 bis 4)

1. Schritt: Denaturierung	95°C	3 Minuten
2. Schritt: Denaturierung	95°C	30 Sekunden
3. Schritt: Primeranlagerung	55°C	30 Sekunden
4. Schritt: Elongation	72°C	45 Sekunden
5. Schritt: Elongation	72°C	10 Minuten

Maxima Hot Start Taq Puffer 10x	5 µl
dNTP-Mix [je 10 mM]	1 µl
vorwärts Primer [10 µM]	2,5 µl
rückwärts Primer [10 µM]	2,5 µl
MgCl ₂ [25mM]	3 µl
Template	1 µl
Maxima Hot Start DNA Polymerase [5 U/µl]	0,25 µl
ddH ₂ O	34,75 µl

Die PCRs erfolgten in 35 Zyklen (Schritt 2 bis 4). Bei Verwendung des Primer-Paars F_Ecad_U + R_Ecad_U erfolgte die Primeranlagerung bei 53°C.

1. Schritt: Denaturierung	95°C	4 Minuten
2. Schritt: Denaturierung	95°C	30 Sekunden
3. Schritt: Primeranlagerung	57°C	30 Sekunden
4. Schritt: Elongation	72°C	30 Sekunden
5. Schritt: Elongation	72°C	10 Minuten

Die MSP-Produkte wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und auf einem 2,5 % Agarosegel aufgetragen und analysiert.

Für die Sequenzierung der konvertierten DNA wurde aus der Ausgangs-PCR (Primern F_S1 und R_S2) eine weitere PCR mit dem Primer-Paar F_S3 und R_S4 durchgeführt. Diese amplifizierte den Bereich -211 bis 138 des CDH1-Promotors. Die PCR-Produkte wurden nach Angaben des Herstellers in das pGEM-T Easy Vector System (Promega) kloniert. Aus positiven Kolonien wurden über-Nacht-Kulturen bei 37°C und 220 U/min in LB-Ampicillin-Medium angezogen und die Plasmid DNA mit dem Kit NucleoSpin Plasmid (Thermo Scientific) auf gereinigt. Die Sequenzierung (SP6-Primer) erfolgte durch die Firma GATC Biotech (Köln).

DreamTaq Green Puffer 10x	5 µl
dNTP-Mix [je 10 mM]	1 µl
F_S3 [10 µM]	2,5 µl
R_S4 [10 µM]	2,5 µl
Template	1 µl
DreamTaq DNA Polymerase [5 U/µl]	0,25 µl
ddH ₂ O	37,75 µl

Die PCRs erfolgten in 30 Zyklen (Schritt 2 bis 4)

1. Schritt: Denaturierung	95°C	3 Minuten
2. Schritt: Denaturierung	95°C	30 Sekunden
3. Schritt: Primeranlagerung	54°C	30 Sekunden
4. Schritt: Elongation	72°C	45 Sekunden
5. Schritt: Elongation	72°C	10 Minuten

3.1.7 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP), qPCR SYBR Green

Zellen wurden mit Trypsin von den Zellkulturschalen gelöst. Nach Bestimmen der Zellzahl wurden 1×10^7 Zellen in 10 ml DMEM/-/ suspendiert. Durch die Zugabe von Formaldehyd in einer Endkonzentration von 0,75 % (203 µl 37% Formaldehyd) für 15 Minuten bei Raumtemperatur und langsamem Wippen erfolgte die Vernetzung von Proteinen und DNA (*cross-linking*). Nach der Zugabe von Glycin in einer Endkonzentration von 125 mM und langsamem Wippen für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS 1x gewaschen (5 Minuten, 1200 g, 4°C). Das Pellet wurde in 1 ml ChIP Lysepuffer mit 100x Protease-Inhibitor (Protease-Inhibitor Cocktail 5 MammCell/Tissue, Applichem, A7779,0001) für eine Stunde auf Eis lysiert. Die DNA in den Lysaten wurde mit dem Ultraschall-System Bioruptor (Diagenode) für 5 Minuten (konisches Zentrifugenröhrchen 15 ml, Intensität H, Intervall 30 Sekunden an/aus) zu einer durchschnittlichen Größe von 500 bis 1000 bp geschert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 4 Minuten bei 8000xg und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die DNA-Konzentration bestimmt. Die Proben wurden zu je 30 µg DNA aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Pro ChIP wurde eine Probe mit ChIP RIPA Puffer mit 100x Protease-Inhibitor auf 400 µl aufgefüllt und 20 µl magnetisches Protein G Granulat (NEB, S1430 S) sowie der entsprechende Antikörper zugegeben und über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Das magnetische Protein G Granulat (50µl) wurde durch folgende Waschschrirte vorbereitet: kurzes Waschen mit 300 µl ChIP RIPA Puffer, Inkubation mit

300 µl CHIP RIPA Puffer mit 30 µg Lachssperma DNA-Natriumsalz (Applichem, A2160,0001) für 30 Minuten, Inkubation mit 270 µl CHIP RIPA Puffer mit 30 µl Roti-Block (Roth, A151.1) für 45 Minuten bei 4°C, jeweils unter Rotation, kurzes Waschen in 300 µl CHIP RIPA Puffer und Aufnahme in 300 ml CHIP RIPA Puffer. Der Input Probe wurde ausschließlich 100x Protease-Inhibitor zugesetzt. Die Inkubation erfolgt bei 4°C ohne Rotation. Das Granulat wurde dreimal mit je 600 ml CHIP Waschpuffer I und dreimal mit je 600 ml CHIP Waschpuffer II gewaschen (10 Minuten bei 4°C unter Rotation). Die DNA wird in je 120 µl CHIP Eluierungspuffer für 30 Minuten bei 30°C und 1000 U/min eluiert. Durch die Inkubation mit 100 µg Proteinase K (Applichem, A4392,0005) für 5 Stunden bei 65°C und 700 U/min wurden die Proteine abgebaut. Die Input-Proben wurden mit CHIP Eluierungspuffer auf 120 µl aufgefüllt und ab dem Proteinase K-Verdau mitgeführt. Die DNA wurde mit dem DNA Clean & Concentrator columns Kit (Zymed) auf gereinigt und konnte bei 4°C gelagert werden.

Anschließend wurden qPCRs mit dem MESA BLUE qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec, RT-SY2X-03+WOUB) jeweils in Duplikaten (Input als Triplikat) auf Eis angesetzt und am LightCycler® 480 (Roche) mit 55 Zyklen (Schritt2 bis 5) durchgeführt. Aus den gemessenen Ct-Werten (*cycle threshold*) wurde die Anreicherung der immunpräzipitierten Proben in Bezug auf den Input ermittelt ($100 \times 2^{\Delta Ct}$).

ddH ₂ O	12,2 µl
vorwärts Primer [10 µM]	0,15 µl
rückwärts Primer [10 µM]	0,15 µl
CHIP DNA	1 µl
2x MESA BLUE qPCR MasterMix Plus	12,5 µl

1. Schritt: Denaturierung	95°C	10 Minuten
2. Schritt: Denaturierung	95°C	25 Sekunden
3. Schritt: Primeranlagerung	58°C	25 Sekunden
4. Schritt: Elongation	72°C	25 Sekunden
5. Fluoreszenzmessung	78°C	
6. Schritt: Schmelzkurve	60 – 97°C	

3.2 Arbeiten mit dem Bakterienstamm *E. coli* DH5 α

3.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli* DH5 α

Inkubation inkompetenter *E. coli* DH5 α (Glycerin-Stock, -80°C) in 5 ml LB-Medium in einem Reagenzglas über Nacht bei 37°C und 220 U/min. Animpfen von 99 ml frischem LB-Medium mit 1 ml der *E. coli* DH5 α -über Nacht-Kultur und Inkubation bei 37°C und 220 U/min bis zu einer OD von 0,4 bis 0,5. Zentrifugation der Zellen bei 3000xg und 4°C für 5 Minuten. Pellet in 30 ml eiskaltem TFB I Puffer resuspendieren und für 30 Minuten auf Eis inkubieren. Pelletieren der Zellen bei 3000xg und 4°C für 5 Minuten. Pellet in 4 ml eiskaltem TFB II Puffer resuspendieren und in 100 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefrieren. Lagerung der kompetenten *E. coli* DH5 α bei -80°C.

3.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Die Vervielfältigung der klonierten pGEM-T Easy Vektoren (Promega) erfolgte durch deren Einbringen in kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen. Dabei wurde, wie im Herstellerprotokoll angegeben, vorgegangen.

3.2.3 Mini-Plasmidpräparation aus *E. coli* DH5 α

Kolonien mit positiven pGEM-T Easy Vektoren wurden mit einer Pipettenspitze in 5 ml LB-Ampicillin-Medium übergeimpft. Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurden 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum mit deren Glycerin-Stocks angeimpft. Die Mini-Plasmidpräparation erfolgt mit dem Kit NucleoSpin Plasmid von Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers.

3.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

3.3.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in Kulturschalen (\varnothing 10 cm) in DMEM+/+ bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Endometriose-Zelllinien erhalten Medium mit FCS der Firma Gibco (Tabelle 2.8). Die restlichen verwendeten Zelllinien erhalten FCS „gold“ (PAA Laboratories). Die Zelllinie MCF10A wurde in DMEM/Ham's F12+/+ kultiviert (Debnath *et al.*, 2003).

Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert, indem diese mit PBS 1x gewaschen und anschließend mit Trypsin-Lösung von den Kulturschalen gelöst wurden. Die Zellen wurden in einer geeigneten Verdünnung (1:4 bis 1:6) in neue Zellkulturschalen propagiert.

3.3.2 Auftauen und Wegfrieren von Zellen

Zum längeren Aufbewahren der Zellen können diese in flüssigem Stickstoff weggefroren werden. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin-Lösung von ihrer Kulturschale gelöst und einmal mit 10 ml DMEM+/+ gewaschen und anschließend bei 900 U/min für 5 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde in 10 % DMSO in FCS (gold, PAA) resuspendiert und in Kryoröhrchen pipettiert (1 ml pro Kryoröhrchen). Die Röhrchen wurden bei -80°C gelagert oder zur längeren Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Kultivieren wurden weggefrorene Zellen in Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 14 ml DMEM-/- pipettiert. Die Zellen wurden bei 900 U/min für 5 Minuten pelletiert, in DMEM+/+ resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt.

3.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl einer Zellsuspension wurde nach dem Ablösen der Zellen mit Trypsin-Lösung mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Auf jede Seite der Zählkammer wurden 10 µl der Zellsuspension pipettiert. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen in den 8 Großquadraten unter dem Lichtmikroskop ermittelt und der Mittelwert gebildet. Dieser Wert wurde mit dem Faktor 10^4 multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten.

3.3.4 Herstellung lentiviraler Vektoren

Drei Tage vor der Transfektion wurden 1×10^6 HEK 293T-Zellen in eine T75-Zellkulturflasche ausgesät. Vor der Transfektion wurde frisches Medium zu den Zellen gegeben (10 ml DMEM+/+ mit 10 µM Chloroquine) und die Transfektionsansätze zugegeben. Für jeden Ansatz wurden 3,5 µg pMD2 VSV-G, 6,5 µg p8.91 und 10 µg SEW bzw. iC2-Plasmid vermischt und mit ddH₂O auf 450 µl aufgefüllt. Dazu wurden 50 µl 2,5M CaCl₂ gegeben. Während mit einer Pipettierhilfe Luft in den Transfektionsansatz gegeben wurde, wurden tropfenweise 500 µl HBS 2x zugegeben. Die Ansätze wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Am Tag nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt (10 ml DMEM+/+). Am Tag 2, 3 und 4 nach der Transfektion wurden die Überstände gesammelt und bei 4°C gelagert. Die Zellen wurden mit 10 ml frischem DMEM+/+ bedeckt. Um Zellrückstände zu entfernen, wurden die gesammelten Überstände durch einen 0,45 µm Filter gegeben, zu 1 ml aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.3.5 Bestimmung des Virustiters

Vormittags wurden 5×10^4 HEK 293T-Zellen in 24-Lochplatten ausgesät. Nachmittags wurden serielle Verdünnungen von 1:1 (unverdünnt) bis 1:100 000 in DMEM+/+ angefertigt. Pro Verdünnung wurden 500 μ l auf die Zellen gegeben und Polybrene in einer Endkonzentration von 8 μ g/ml zugegeben. Die Platte wurde bei 2000 U/min für 30 Minuten bei 32°C zentrifugiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Drei Tage nach der Transduktion wurde der Anteil der transduzierten Zellen anhand der Expression des Infektionsmarkers GFP bzw. mCherry unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

Der Virustiter T wurde mit folgender Formel berechnet

$$T = N \times P / V$$

N = Zellzahl zum Zeitpunkt der Transduktion
P = Anteil transduzierter Zellen
V = eingesetztes Volumen des Virusüberstandes

3.3.6 Lentivirale Transduktion von Zellen

Am Tag vor der Transduktion wurden jeweils 2 bis $2,5 \times 10^5$ 12Z-Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät. Zu den Zellen wurden die lentiviralen Vektoren in einer MOI (*multiplicity of infection*) von 5 (iC2) bzw. 20 (SEW) gegeben und pro Vertiefung mit 3 ml DMEM+/+ aufgefüllt. Polybrene wurde in einer Endkonzentration von 8 μ g/ml zugefügt. Die 6-Lochplatten wurden anschließend für 30 Minuten bei 2'000 U/min und 32°C zentrifugiert. Die Infektionseffizienz wurde durch Durchflusszytometrie bestimmt.

3.3.7 Durchflusszytometrie

Mittels der Durchflusszytometrie wurde die Effektivität der lentiviralen Transduktion der 12Z-Zellen begutachtet. Die Zellen wurden in 500 μ l 4 % Paraformaldehyd für 5 Minuten fixiert und bis zur Messung in 500 μ l PBS 1x bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Messung des Anteils an GFP-positiven Zellen erfolgte mit dem FACSCanto von BD Biosciences.

3.3.8 Herstellung von Immunfluoreszenz-Präparaten

Für Immunfluoreszenz-Färbungen wurden die Zellen auf Deckgläschen (22 x 22 mm) in 6-Lochplatten (\varnothing 3,5 cm) ausgesät. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit PBS 1x gewaschen, mit 4% PFA für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, mit PBS 1x gewaschen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur

mit Blockierungslösung permeabilisiert und blockiert. GFP- bzw. mCherry-exprimierende Zellen wurden während des gesamten Vorgangs vor Licht geschützt.

Die primären Antikörper wurden bei 4°C über Nacht auf die Proben gegeben. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern erfolgte für eine Stunde. Ab diesem Schritt wurden die Proben vor Licht geschützt. Die Färbungen des Aktinzytoskeletts erfolgten mit dem ActinGreen™ 488 / 555 ReadyProbes® Reagenz (life technologies) zeitgleich mit der Inkubation der sekundären Antikörper. Alle Antikörper wurden in Blockierungslösung verdünnt. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Zellen dreimal kurz und dreimal für je 5 Minuten mit PBS 1x gewaschen. Die Kerne wurden für 5 Minuten mit DAPI-Arbeitslösung angefärbt. Nach dreimaligem kurzem Waschen mit PBS 1x wurden die Zellen mit Mowiol-Lösung auf Objektträgern befestigt. Das Aushärten erfolgte bei Raumtemperatur für mindestens 12 Stunden. Die längere Lagerung der Präparate erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

Die Proben wurden mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop TCS SP5 (Leica Microsystems) (40x Objektiv, Öl) begutachtet und mit der zugehörigen Software Leica Application Suite Advanced Fluorescence 2.4.1 build 6384 aufgenommen (einzelne Ebenen). Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software Imaris 6.2.1 (Bitplane) oder Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

3.3.9 Migrations- und Invasions-Versuche

Vor Beginn der Invasionsversuche wurden die BioCoat Matrigel Zellkultureinsätze von -20°C auf Raumtemperatur aufgewärmt und die Matrigelschicht durch Zugabe von DMEM-/-für zwei Stunden bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ rehydriert.

Die verwendeten Zellen wurden aus einer subkonfluenten Schale mit Trypsinlösung abgelöst und einmal mit 10 ml DMEM+/+ und einmal mit 10 ml DMEM-/- gewaschen (900 U/min, 5 Minuten, RT). Das Zellpellet wurde in 3 ml serumfreiem DMEM mit 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

In die Vertiefungen einer 24-Lochplatte wurden je 750 µl DMEM+/+ pipettiert und in die Zellkultureinsätze serumfreies DMEM mit 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung vorgelegt, damit das Endvolumen nach Zugabe der Zellsuspension 500 µl betrug. Wenn angegeben, wurden zur funktionellen Blockierung der E-Cadherin Funktion 50 µg / ml DECMA1 Antikörper in den Zellkultureinsatz zugegeben. Pro Zellkultureinsatz wurden 3x10⁴ für 48 Stunden bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Pro Zelllinie wurden 2 Filtereinsätze verwendet.

Vor dem Fixieren der Zellen mit 4 % PFA für 10 Minuten wurden pro Zelllinie einmal die Zellen auf bzw. unter dem Filter mit einem trockenen Wattestäbchen entfernt. Dies wurde mit einem feuchten Wattestäbchen (DMEM-/-) wiederholt und die Filtereinsätze zweimal mit PBS 1x gewaschen. Die Zellen wurden mit 0,1 % Triton X-100 in PBS 1x für 10 Minuten permeabilisiert und anschließend erfolgte die Färbung der Zellkerne mit DAPI-Arbeitslösung für 5 Minuten. Die Filter wurden mit einem Skalpell aus den Einsätzen gelöst und auf einen Objektträger mit einem Tropfen Mowiol-Lösung gelegt. Dabei wurde die Membran so orientiert, dass die Zellen von dem Objektträger wegweisen. Auf die Filter wurde ein weiterer Tropfen Mowiol-Lösung gegeben und die Filter dann mit einem Deckgläschen fixiert.

Pro Membran wurden vier Bilder mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiophot 100 (Zeiss) bei 100 facher Vergrößerung aufgenommen und die Zellen bzw. Zellkerne ausgezählt (Zeitvogel *et al.*, 2001). Das Migrations- bzw. Invasionsverhalten wurde als Anteil der motilen bzw. invasiven Zellen an der Gesamtzellzahl angegeben.

3.4 Arbeiten mit Proteinen

3.4.1 Zellextraktion mit RIPA-Puffer

Zellen wurden frühestens nach zweitägiger Kultivierung in DMEM+/+ lysiert und gegebenenfalls zuvor mit TSA (T1952, Sigma Aldrich), 5-Azacytidin (A2385, Sigma Aldrich), LiCl, XAV939 (X3004, Sigma Aldrich) oder SB216763 (S3442, Sigma Aldrich) stimuliert. Dazu wurden die Zellen mit eiskaltem PBS 1x gewaschen und RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitor Cocktail 25x (04693116001, Roche) (75 µl pro Ø 3,5 cm Schale) für 30 Minuten bei 4°C lysiert. Nach dem Überführen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 12000 U/min für 10 Minuten bei 4°C entfernt. Die Lysate wurden bei -20°C oder bei -80°C für einen längeren Zeitraum gelagert

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mittels der Bradford-Protein-Messung bestimmt (Bradford, 1976). Dazu wurden pro Probe 200 µl Bradford-Reagenz (Roti-Quant, K015.2, Roth) mit 800 µl ddH₂O in einer Küvette vermischt und 1 µl Probe zugefügt. Nach 10 Minuten Inkubation erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm im Vergleich zur Referenz. Als Referenz wurde 1 µl des entsprechenden Lysepuffer in 200 µl Bradford-Reagenz und 800 µl ddH₂O gemessen. Anhand einer Eichkurve konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden.

3.4.3 Oberflächenbiotinylierung

Zellen in einer Kulturschale (\emptyset 3,5 cm) wurden mit eiskaltem PBS 1x gewaschen und mit 100 μ l EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (0,5 mg/ml PBS 1x) für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS 1x und einmal mit eiskaltem 25 mM Tris-HCl pH 8 gewaschen und mit 150 μ l RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitor Cocktail 25x lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt. 30 μ g des Lysates wurden als Input abgenommen und mit Proteinproben-Puffer 4x (Roti-Load 1, K929.1, Roth) versetzt. 160 μ g Proteinlysate wurden mit RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitor Cocktail 25x (Roche) auf eine Konzentration von 0,8 μ g / ml verdünnt und mit 30 μ l dreimal gewaschenem NeutrAvidin-Agarose-Granulat (50:50 slurry, Thermo Scientific) für 2 Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und deren Proteinkonzentration bestimmt. 30 μ g des Überstands wurden mit Proteinproben-Puffer 4x versetzt. Das Agarose-Granulat wurde dreimal mit eiskaltem RIPA Puffer gewaschen und anschließend 10 μ l Proteinproben-Puffer 4x zugefügt. Die Proben wurden in einer SDS-Polyacrylamide Gelelektrophorese aufgetrennt und per Western Blot analysiert.

3.4.4 Co-Immunpräzipitation (CoIP)

Zellen in einer Kulturschale (\emptyset 3,5 cm) wurden mit eiskaltem PBS 1x gewaschen mit 150 μ l CoIP Puffer mit Protease-Inhibitor Cocktail 25x (Roche) lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt. 30 μ g des Lysates wurden als Input abgenommen und mit Proteinproben-Puffer 4x (Roti-Load 1; Roth, K929.1) versetzt. 500 μ g Proteinlysate wurden mit CoIP Puffer mit Protease-Inhibitor Cocktail 25x (Roche) auf eine Konzentration von 2,5 μ g / μ l verdünnt und mit 30 μ l gewaschenem Protein G Sepharose Granulat (dreimal mit je 500 μ l CoIP Puffer, 12000 U/min, 3 Minuten) für 2 Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert (*Pre-Clearing*). Durch Zentrifugation wurde das Granulat pelletiert (1500 U/min, 4°C, 3 Minuten) und der Überstand abgenommen. Das Granulat wurde dreimal mit eiskaltem CoIP Puffer gewaschen und 10 μ l Proteinproben-Puffer 4x zugefügt. Zu den Überständen wurden 2 μ g Antikörper gegen das zu präzipitierende Protein zugegeben und die Ansätze über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Durch Zentrifugation wurde das Granulat pelletiert (1500 U/min, 4°C, 3 Minuten) und der Überstand abgenommen. 30 μ g des Überstandes wurden mit Proteinproben-Puffer 4x versetzt. Das Granulat wurde dreimal mit eiskaltem CoIP Puffer gewaschen und 10 μ l Proteinproben-Puffer 4x zugefügt. Die Proben wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot analysiert.

3.5 Western Blot-Analyse

3.5.1 SDS-Polyacrylamide Gelelektrophorese

Für die Analyse von Proteinen per Western Blot wurden diese durch eine SDS-Polyacrylamide Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrer molekularen Masse nach aufgetrennt. Die Proben wurden zuvor mit Proteinproben-Puffer 4x (Roti-Load 1; Roth, K929.1) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. An Granulat gebundene Proteine wurden für 10 Minuten aufgeköcht. Sofern nicht anders angegeben, wurde 30 µg Proteinlysate pro Spur eingesetzt. Die Gele (Tabelle 3.1) liefen bei einer Stromstärke von 30 bis 50 mA und einer maximalen Spannung von 160 V in 1x SDS-Elektrophoresepuffer bis die gewünschte Auftrennung erreicht wurde.

Tabelle 3.1 Zusammensetzung der Acrylamidgele

Dem Sammelgel kann zum Sichtbarmachen der Taschen 20 µl 0,2 % Bromphenolblau ([w/v] in ddH₂O) zugesetzt werden. Das Trenngel wird vor dem Sammelgel angesetzt und zwischen die Glasplatten pipettiert. Auf das polymerisierte Trenngel wird das Sammelgel gegossen, in welches durch einen Kamm die Probentaschen eingefügt werden.

Chemikalie	Trenngel 8,33 %	Sammelgel 5 %
Acrylamid 40 % (Rotiphorese® Gel 40 (29:1), 3030.1, Roth)	1,25 ml	500 µl
TRIS 1,88 M, pH 8,8	1,2 ml	-
TRIS 0,62 M, pH 6,9	-	800 µl
ddH ₂ O	3,25 ml	2,52 ml
2,5 % [w/v] in ddH ₂ O	250 µl	160 µl
Temed	5 µl	4 µl
10 % APS [w/v] in ddH ₂ O	30 µl	20 µl

3.5.2 Proteintransfer (Western Blot)

Nach dem Auftrennen der Proteinlysate wurden diese durch das Semi-Dry-Blotting-Verfahren auf Nitrozellulose-Membranen übertragen. Dazu wurden die Membran und das Gel-Blotting-Papier zuvor in Transferpuffer getränkt. Auf die Anode der Blottingapparatur wurde ein Gel-Blotting-Papier platziert, gefolgt von der Membran, dem Gel und einem weiteren Gel-Blotting-Papier. Darauf wurde die Kathodenplatte gelegt und fixiert. Der Proteintransfer erfolgte bei 1,5 mA pro cm² Fläche der Gel-Blotting-Papiere innerhalb 1,5 Stunden.

3.5.3 Detektion von Proteinen

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran kurz mit TBS-T gewaschen und für eine Stunde mit 5 % Magermilchpulver[w/v] (T145.2, Roth) in TBS-T inkubiert. Die Membran wurden mit den primären

Antikörpern, welche in TBS-T verdünnt wurden, für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal kurz und dreimal für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit den HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern erfolgte bei Raumtemperatur für 1 bis 2 Stunden. Nach erneutem Waschen erfolgte die Proteindetektion.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte über die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase (HRP), welche an den sekundären Antikörper gekoppelt ist. Dazu wurde die Membran für 2 Minuten mit ECL-Lösung (ca. 0,1 ml / cm²) inkubiert. Das Chemilumineszenzsignal wurde mit Röntgenfilmen (RP new, CEA) oder dem Dokumentationssystem GenoPlex (VWR) detektiert.

3.6 Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler und statistische Signifikanz

Zur Berechnung des Mittelwertes \bar{x} , der Standardabweichung s und des Standardfehlers s_n wurden die folgenden Formeln angewendet.

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

$$s = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$$

$$s_n = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

n	=	Anzahl der Messungen
s	=	Standardabweichung
s _n	=	Standardfehler
x	=	Messwert
\bar{x}	=	Mittelwert der Messung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte über den Student's t-Test (<http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test.html>).

4 Ergebnisse

4.1 E-Cadherin-Expression in Abhängigkeit der Shrew-1 Herunterregulation in epithelialen Endometriose-Zelllinien

4.1.1 Herunterregulation von Shrew-1 in dem zellulären Endometriose-Modell 12Z

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Herunterregulation von Shrew-1 (Shrew-1 Knockdown, KD) in der Zelllinie 12Z untersucht. Diese Zelllinie wurde aus isolierten epithelialen Zellen einer hellroten, aktiven Endometriose-Biopsie generiert und durch die exogene Expression des SV40 T-Antigens immortalisiert (Zeitvogel *et al.*, 2001). Die Zelllinie 12Z ist weitreichend charakterisiert und wird häufig als zelluläres Modell zur Untersuchung der Endometriose herangezogen (Banu *et al.*, 2008; Grund *et al.*, 2008; Adammek *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013). Obwohl die Zellen epithelialen Ursprungs sind, was durch die Expression des epithelialen Intermediärfilaments Keratin gezeigt werden konnte, wird der epitheliale Marker E-Cadherin nicht exprimiert und die Zellen weisen *in vitro* einen motilen und invasiven Phänotyp auf (Zeitvogel *et al.*, 2001; Diplomarbeit Paul, 2010). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Herunterregulation von Shrew-1 die Expression von E-Cadherin in den 12Z Zellen induziert (Diplomarbeit Paul, 2010).

Vor der Herunterregulation von Shrew-1 wurde dessen endogene Expression in diesem zellulären Kontext auf mRNA-Ebene sichergestellt (Abbildung 4.1 a). In Isoform-spezifischen PCR konnte die Expression von Isoform 1 und 3 gezeigt werden (Anhang Abbildung 10.1, Spur 1). Die Expression der Isoform 2 konnte nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Ein Nachweis der Expression auf Protein-Ebene war nicht möglich, da kein Antikörper gegen Shrew-1 existiert, der endogen exprimiertes Shrew-1 in den 12Z-Zellen und vielen weiteren humanen Zellkulturmodellen detektiert (Schreiner *et al.*, 2007). Auch durch den Einsatz von 150 µg Protein in Western Blot-Analysen konnte Shrew-1 in den 12Z-Zellen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In humanen Endothelzellen aus der Nabelvene (HUVEC) kann Shrew-1 jedoch auf Protein-Ebene detektiert werden (Masterarbeit Hötte, 2014).

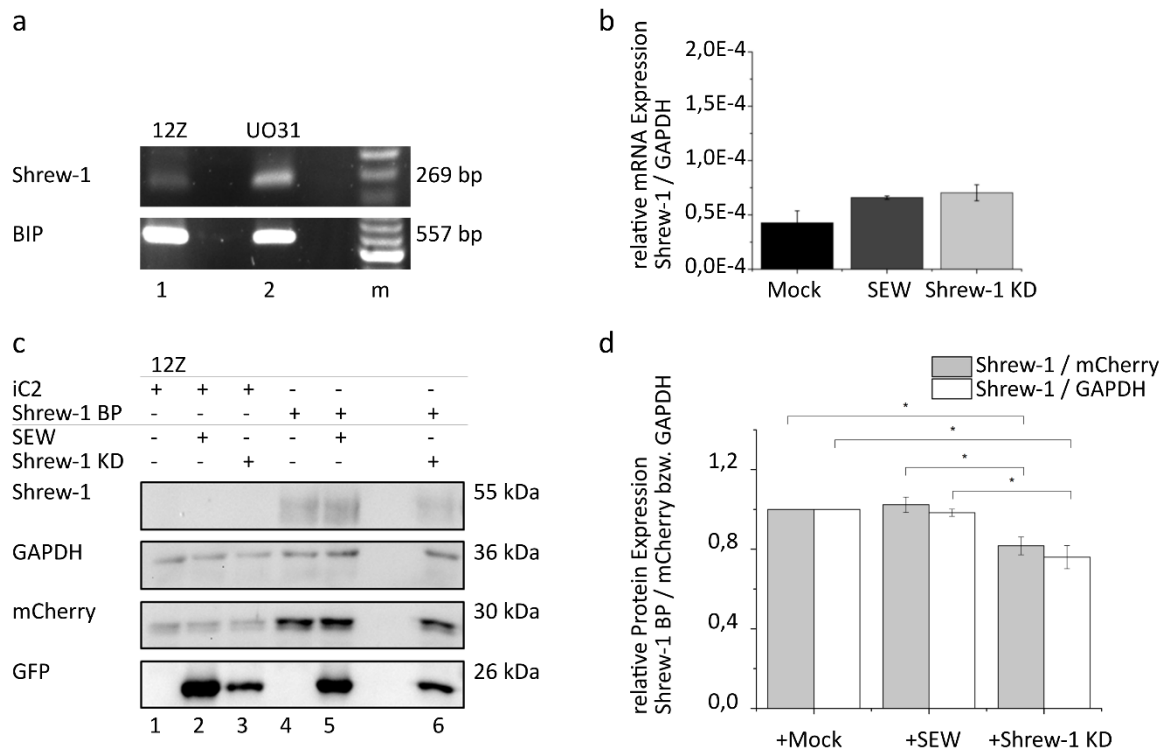


Abbildung 4.1 Expression und Herunterregulation von Shrew-1 in der Zelllinie 12Z

(a) Aus cDNA-Proben der humanen Endometriose-Zelllinie 12Z konnte mit den Primern F_Shrew-1 und R_Shrew-1 3'UTR ein Fragment der erwarteten Größe (269 bp) amplifiziert werden. Die Primer binden im Exon 4 bzw. 5 von Shrew-1 und amplifizieren somit alle bekannten Isoformen von Shrew-1. Von der Zelllinie UO31 ist bekannt, dass diese Shrew-1 exprimiert und diente daher als Positivkontrolle für die Shrew-1-Expression. Mit Exon-umspannenden BIP-Primern wurde die Umschreibung der mRNA in cDNA (Amplifikat, 557 bp) überprüft und eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen. m = DNA-Leiter. (b) 12Z-Zellen wurden mit lentiviralen Partikeln, die den SEW-Vektor mit der shRNA gegen Shrew-1 (SEW Shrew-1 KD) oder den entsprechenden Leervektor (SEW) enthalten, oder keinem Vektor transduziert (Mock). Die RNA dieser Zellen wurde isoliert und die mRNA in cDNA umgeschrieben. Diese diente als Matrize für anschließende qPCRs. In keiner der vier Shrew-1 KD-Zelllinien konnte eine Verminderung der Shrew-1 mRNA-Expression detektiert werden. Die verwendeten Primer binden in Exon 4 und 5 und binden somit an alle Shrew-1 Isoformen. Die Balken zeigen jeweils den Mittelwert der vier unabhängigen Zelllinien (n = 4). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. (c) Der Nachweis der Funktionalität der shRNA erfolgte über die lentivirale Überexpression von humanem Shrew-1 BP (iC2 Shrew-1 BP, MOI 5) und anschließender Transduktion mit der shRNA gegen Shrew-1 in einer MOI von 20. Die Expression von Shrew-1 BP wird durch die Shrew-1 shRNA auf Protein-Ebene reduziert (Spur 6). Shrew-1 BP wurde mit dem Antikörper gegen Shrew-1 (C14) detektiert. Pro Probe wurden 30 µg Protein geladen. GFP (SEW) und mCherry (iC2) werden als Transduktionsmarker in den Zellen exprimiert. Der Nachweis von GAPDH diente als Ladekontrolle. Rechts neben dem Blot sind die molekularen Massen der detektierten Proteine angegeben. m = Proteinleiter. (d) Densitometrische Auswertung der Shrew-1 Expression nach Überexpression von Shrew-1 BP und anschließender Transduktion mit den Vektoren SEW, Shrew-1 KD, bzw. Mock. Die Shrew-1 Expression wurde auf die Expression von mCherry und GAPDH bezogen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. n = 3. *: $p \leq 0,05$.

Die Herunterregulation von Shrew-1 (Shrew-1 KD) erfolgte viermal unabhängig voneinander mittels Transduktion mit dem selbstinaktivierenden lentiviralen Vektor SEW (Demaison *et al.*, 2002), der die Sequenz für eine shRNA gegen Shrew-1 codiert, die unter der Kontrolle des U6-Promotors steht. Die Effizienz der Transduktion wurde per Durchflusszytometrie über die Expression von GFP bestimmt,

dessen Expression über einen unabhängigen Promotor (SFFV) erfolgt. Jede Transduktion erzeugte über 67,4 % GFP-positive Zellen (Shrew-1 KD: 88,3 %, 67,4 %, 69,6 %, und 69,5 %). Bei den SEW-Leervektor transduzierten Zelllinien lag die Effizienz jeweils über 66,9 % (SEW: 94,5 %, 66,9 %, 87,1 % und 83,0 %) (Anhang Abbildung 10.2, jeweils eine Zelllinie wurde bereits generiert (Diplomarbeit Paul, 2010)). Die 12Z Mock-Zellen wurden nicht transduziert und exprimieren somit kein GFP. Eine verminderte Expression von Shrew-1 auf mRNA-Ebene konnte nach der Herunterregulation mit der shRNA gegen Shrew-1 in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen nicht gezeigt werden (Abbildung 4.1 b). In PCRs und qPCRs mit Isoform-spezifischen Primern konnte ebenfalls keine Reduktion der Isoform 1 oder 3 festgestellt werden (Anhang Abbildung 10.1 a und b). Da es keine verfügbaren Antikörper gegen endogenes Shrew-1 gibt, die in dem Zellkulturmodell 12Z funktionieren, erfolgte der Nachweis der Herunterregulation indirekt über die Überexpression von humanem Shrew-1 BP und anschließender Transduktion der shRNA gegen Shrew-1. Die exogene Expression von Shrew-1 BP konnte in den 12Z-Zellen mit dem Antikörper gegen Shrew-1 (C14, Santa Cruz) detektiert werden (Abbildung 4.1 c, Spur 4 und 5). Bei gleichzeitiger Expression der shRNA gegen Shrew-1 reduzierte sich die Expression von Shrew-1 BP (Abbildung 4.1 c, Spur 6). Die densitometrische Auswertung in Bezug auf die Expression des Transduktionsmarkers mCherry und GAPDH zeigte ebenfalls die verminderte der Shrew-1-Expression bei Verwendung der shRNA gegen Shrew-1 (Abbildung 4 d). Auf diese Weise kann die Funktionalität der shRNA in der Zelllinie 12Z bestätigt werden.

4.1.2 Einfluss der Shrew-1 Herunterregulation auf die E-Cadherin-Expression der 12Z-Zellen

In glandulären Zellen aus humanen Adenomyose-Biopsien kann beobachtet werden, dass sich die Expression von E-Cadherin und Shrew-1 scheinbar beeinflussen. In allen glandulären Epithelzellen des Endometriums kann eine punktartige Expression von Shrew-1 beobachtet werden (Dr. Petra Bernardi, persönliche Kommunikation). Diese Zellen weisen gleichzeitig die membranständige Expression von E-Cadherin auf. In den Adenomyose-Läsionen können, wie auch in Endometriose-Läsionen aus der Bauchhöhle (Gaetje *et al.*, 1997; Zeitvogel *et al.*, 2001; Bartley *et al.*, 2014), einzelne E-Cadherin-negative glanduläre Epithelzellen ausgemacht werden (Dr. Petra Bernardi, persönliche Kommunikation). Diese Zellen zeigen eine verstärkte Expression von Shrew-1, was auf eine Verbindung in der Expression dieser beiden Proteine hinweist. Des Weiteren ist die Expression von Shrew-1 mit der Invasivität von Epithelzellen assoziiert (Bharti *et al.*, 2004; Schreiner *et al.*, 2007; Gross *et al.*, 2009) wohingegen E-Cadherin einen gegenteiligen Effekt hat (Canel *et al.*, 2013). Außerdem hat die Expression von Shrew-1 einen Einfluss auf die EGF-vermittelte Internalisierung von E-Cadherin in MCF7-Zellen (Gross *et al.*, 2009). Daher wurde die Expression von E-Cadherin in den 12Z-Zelllinien analysiert. In allen 12Z Shrew-1 KD-Zelllinien, aber nicht in den 12Z-Kontrollzelllinien (Mock und SEW),

konnte E-Cadherin in Gesamtzelllysaten detektiert werden (Abbildung 4.2 a, Spur 7, 8 und 9 und (Diplomarbeit Paul, 2010)). Die Stärke der Expression des epithelialen Markers Keratin 8 sowie die der mesenchymalen Proteine Vimentin und N-Cadherin wurden durch die Herunterregulation von Shrew-1 nicht verändert (Abbildung 4.2 b).

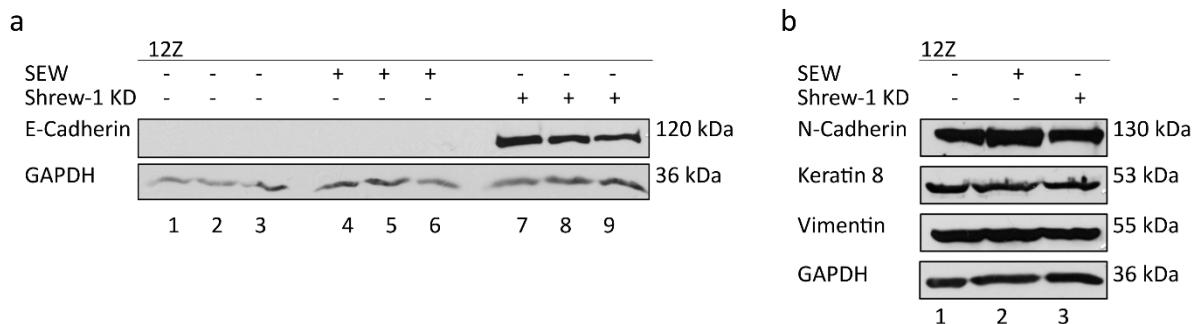


Abbildung 4.2: Inverse Expression von Shrew-1 und E-Cadherin in 12Z-Zellen

(a) E-Cadherin wird in den drei neu generierten 12Z Shrew-1 KD-Zellen exprimiert (Spur 7, 8 und 9), wohingegen die 12Z-Kontrollzellen kein E-Cadherin exprimieren (Spur 1 bis 6). (b) Die Expression von N-Cadherin, Vimentin und Keratin 8 bleibt unverändert. Die Detektion von Vimentin erfolgte auf einem anderen Blot mit den gleichen Lysaten. Für jede Zelllinie wurden 30 µg Gesamtproteinlysate geladen. Die Detektion von GAPDH dient der Kontrolle der gleichmäßigen Beladung. Rechts neben den Blots sind die molekularen Massen der detektierten Proteine angegeben. m = Proteinleiter.

4.1.3 Einfluss der Shrew-1 Herunterregulation in anderen Endometriose-Zelllinien

Als nächstes stellte sich die Frage, ob der Effekt auf die E-Cadherin-Expression durch die Herunterregulation von Shrew-1 nur in den 12Z-Zellen auftritt oder ob dies in weiteren Zelllinien, die aus Endometriose-Biopsien abgeleitet wurden, zu beobachten ist. Die beiden Zelllinien 10Z und 49Z stellen wie die Zelllinie 12Z ein *in vitro* Modell zur Untersuchung der Endometriose dar und wurden ebenfalls aus epithelialen Zellen aktiver Endometriose-Läsionen generiert, stammen jedoch von verschiedenen Patientinnen (Zeitvogel *et al.*, 2001). Sie exprimieren Cytokeratin, was auf ihren epithelialen Ursprung hinweist, jedoch kein E-Cadherin. Die Abwesenheit der E-Cadherin-Expression wurde vor den Versuchen erneut in Western Blot-Analysen bestätigt (Abbildung 4.3 a, Spur 1 und 2). Die Herunterregulation von Shrew-1 mittels shRNA führte in den 10Z-Zellen zu keiner detektierbaren E-Cadherin-Expression (Abbildung 4.3 b, Spur 2). In der epithelialen Zelllinie 49Z konnte nach der Herunterregulation von Shrew-1 in Western Blot-Analysen eine schwache E-Cadherin Bande detektiert werden (Abbildung 4.3 b, Spur 6).

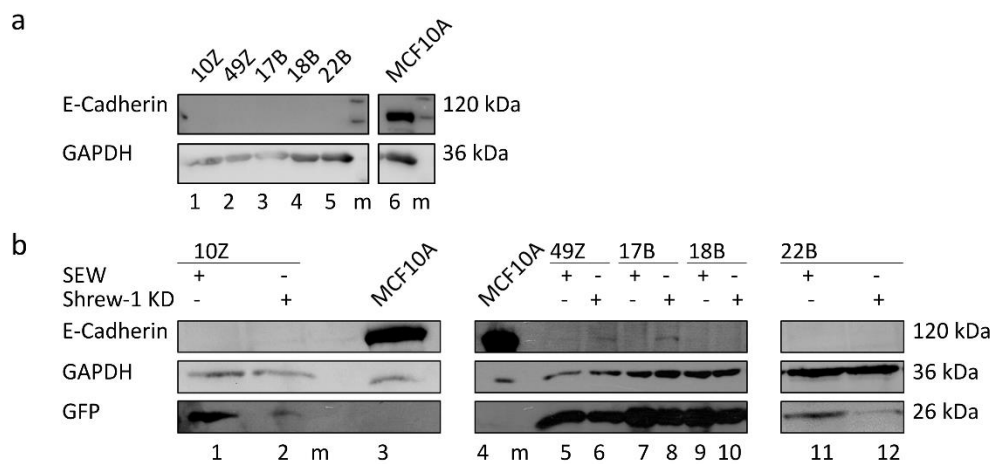


Abbildung 4.3 Herunterregulation von Shrew-1 und E-Cadherin-Expression in weiteren Endometriose-Zelllinien

(a) Die epithelialen Zelllinien 10Z (Spur 1) und 49Z (Spur 2) sowie die stromalen Zelllinien 17B (Spur 3), 18B (Spur 4) und 22B (Spur 5) exprimierten kein E-Cadherin in Western Blot-Versuchen. Die Zelllinie MCF10A (Spur 6) diente als Kontrolle für die Expression von E-Cadherin. Pro Zelllinie wurden 30 µg Gesamtproteinlysate geladen (MCF10A, 20 µg). Die Detektion von GAPDH diente der Kontrolle für die gleichmäßige Beladung. m = Proteinleiter. Rechts neben dem Blot sind die molekularen Massen der detektierten Proteine angegeben. (b) Pro Zelllinie wurde in zwei unabhängigen Ansätzen Shrew-1 mittels lentiviraler Transduktion (MOI 20) herunterreguliert (Shrew-1 KD). Die entsprechenden Kontrollzellen wurden ausschließlich mit dem Leervektor (SEW) transduziert. In den Zelllinien 10Z (Spur 3), 18B (Spur 10) und 22B (Spur 12) ist E-Cadherin auf Protein-Ebene nach der Herunterregulation von Shrew-1 weiterhin nicht nachweisbar. In den 49Z Shrew-1 KD-Zellen konnte E-Cadherin schwach detektiert werden (Spur 6). In den 17B Shrew-1 KD-Zellen konnte E-Cadherin in einer der beiden generierten Zelllinien schwach detektiert werden (Spur 8). Pro Zelllinie wurden 30 µg Proteinlysate geladen (MCF10A, 20 µg).

Neben epithelialen Zellen ohne E-Cadherin-Expression bestehen Endometriose-Läsionen auch aus stromalen Zellen, die ebenfalls kein E-Cadherin exprimieren (van der Linden *et al.*, 1994; Béliard *et al.*, 1997; Gaetje *et al.*, 1997; Zeitvogel *et al.*, 2001; Bartley *et al.*, 2014). Die Zelllinien 17B, 18B und 22B wurden aus stromalen Zellen (Cytokeratin- und E-Cadherin-negativ, Vimentin-positiv) aus verschiedenen Endometriose-Biopsien generiert (Zeitvogel *et al.*, 2001). Die Abwesenheit von E-Cadherin wurde in Gesamtzelllysaten bestätigt (Abbildung 4.3 a, Spur 3, 4 und 5). Die Herunterregulation von Shrew-1 mittels shRNA führte in den Zelllinien 18B und 22B nicht zur Expression von E-Cadherin (Abbildung 4.3 b, Spur 10 und 12). In den 17B Zellen konnte in einer der zwei generierten Shrew-1 KD-Zelllinien eine schwache E-Cadherin-Expression detektiert werden (Abbildung 4.3 b, Spur 8).

In humanen Adenomyose-Biopsien konnten epitheliale Zellen beobachtet werden, die eine verminderte E-Cadherin-Expressionsstärke aufweisen. In diesen Zellen ist zugleich eine erhöhte Shrew-1-Expression nachweisbar (Dr. Petra Bernardi, persönliche Kommunikation). In den entsprechenden Proben aus dem Endometrium konnten solche Zellen nicht nachgewiesen werden. In den stromalen Zellen wird E-Cadherin nicht exprimiert und die Expression von Shrew-1 ist ebenfalls nicht nachweisbar. Es besteht somit die Möglichkeit eines inversen Zusammenhangs zwischen der Expression von Shrew-1 und E-Cadherin in epithelialen Endometriose-Zellen.

4.1.4 Assoziation von E-Cadherin mit den Adhärenzverbindungen in 12Z Shrew-1 KD-Zellen

E-Cadherin ist ein essentieller Bestandteil der Adhärenzverbindung und muss für seine adhäsive Funktion an der Plasmamembran lokalisiert sein (Wheelock & Johnson, 2003). Um die Lokalisation von E-Cadherin in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen überprüfen zu können, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen mit Antikörpern gegen E-Cadherin angefertigt. In den 12Z Shrew-1 KD-Zellen, jedoch nicht in den 12Z-Kontrollzellenlinien, konnte E-Cadherin nachgewiesen werden, wobei das gesamte E-Cadherin an der Plasmamembran lokalisiert war (Abbildung 4.4, Pfeile). Dies war nur in transduzierten, GFP-positiven Zellen der Fall. Jedoch wird E-Cadherin nur in wenigen Zellen ausreichend stark exprimiert, um in einer Immunfluoreszenz-Färbung nachweisbar zu sein. Die Plasmamembran-Lokalisation von E-Cadherin in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen konnte ebenfalls durch Oberflächenbiotinylierungs-Experimente bestätigt werden (Diplomarbeit Paul, 2010). Die Plasmamembran-Lokalisation von E-Cadherin in den 12Z-Zellen nach der Herunterregulation von Shrew-1 lässt vermuten, dass E-Cadherin seine Funktion als Adhäsionsprotein als Teil der Adhärenzverbindungen ausüben kann.

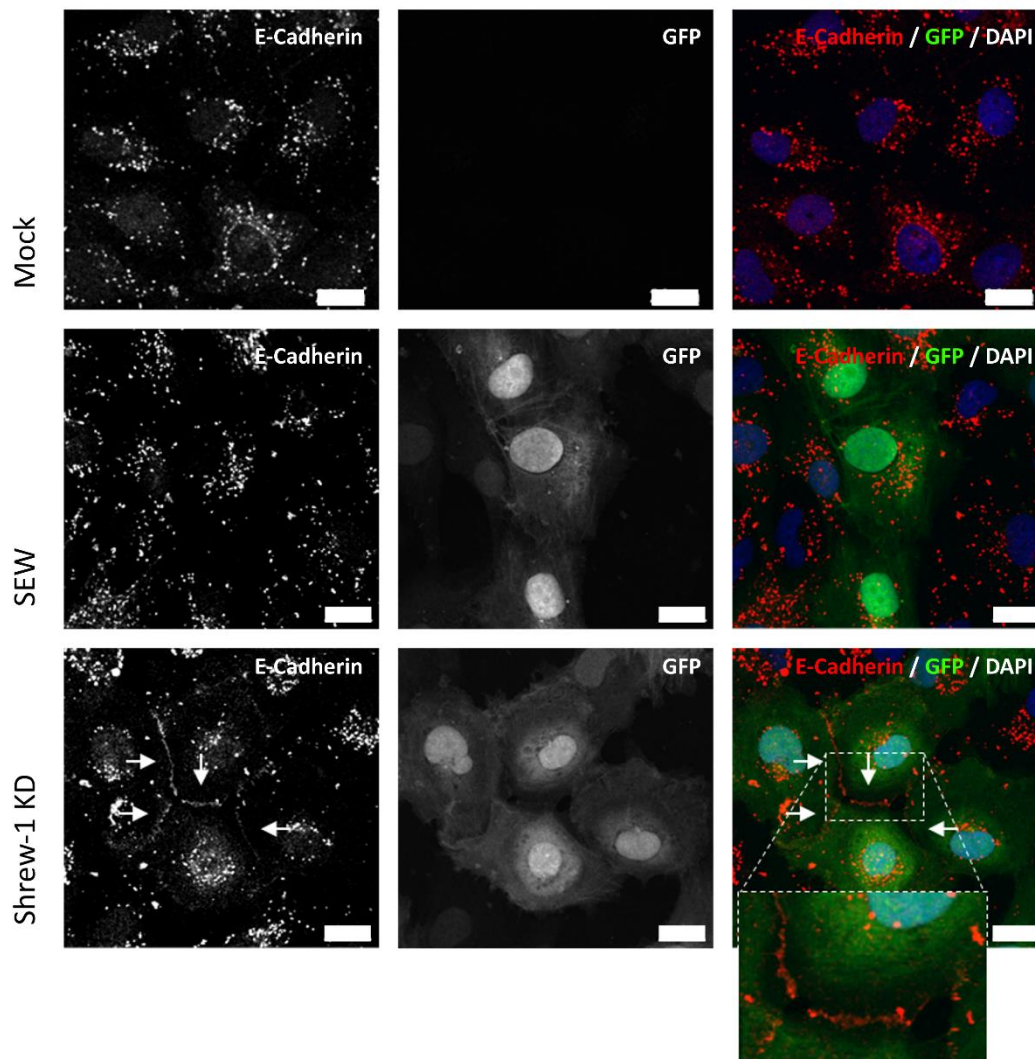


Abbildung 4.4 E-Cadherin ist in 12Z Shrew-1 KD-Zellen an der Plasmamembran lokalisiert

E-Cadherin wurde mit dem monoklonalen E-Cadherin Antikörper cl 36 (BD Transduction Laboratories) detektiert. Nur in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen konnte E-Cadherin (rot) detektiert werden, wobei E-Cadherin ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiert war (Pfeile und Vergrößerung). Die Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Die Punkte, die sowohl in den Kontrollzellen als auch in den Shrew-1 KD-Zellen bei der E-Cadherin Färbung zu sehen sind, werden durch eine unspezifische Bindung des E-Cadherin Antikörpers hervorgerufen. Gezeigt sind repräsentative Bilder der 12Z-Zelllinien. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laserscann-Mikroskop TCS SP5 (Leica) angefertigt. Maßstab 20 μm .

Um die Assoziation des reexprimierten E-Cadherins mit den Adhärenzverbindungen weiter zu überprüfen, wurden CoIPs gegen β -Catenin durchgeführt. In den 12Z Shrew-1 KD-Zellen wurde die gesamte Menge an E-Cadherin mit β -Catenin präzipitiert (Abbildung 4.5 c, IP, Spur 3). Es ist zu beobachten, dass in den 12Z-Kontrollzelllinien E-Cadherin nicht exprimiert wird (Abbildung 4.5 a und b, In, Spur 1) und folglich nicht präzipitiert werden konnte (IP, Spur 3). Reexprimiertes E-Cadherin interagiert somit in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen mit β -Catenin und ist folglich Teil des Adhärenzkomplexes. Eine Interaktion mit p120-Catenin konnte in keiner der 12Z-Zelllinien detektiert

werden. p120-Catenin kann an die Membran-nahe Region von E-Cadherin binden und so zu dessen lateraler Anreicherung in den Adhärenzkomplexen beitragen (Yap *et al.*, 1998; Thoreson *et al.*, 2000) und auf diese Weise zu einer starken Bindung zwischen benachbarten Zellen beitragen.

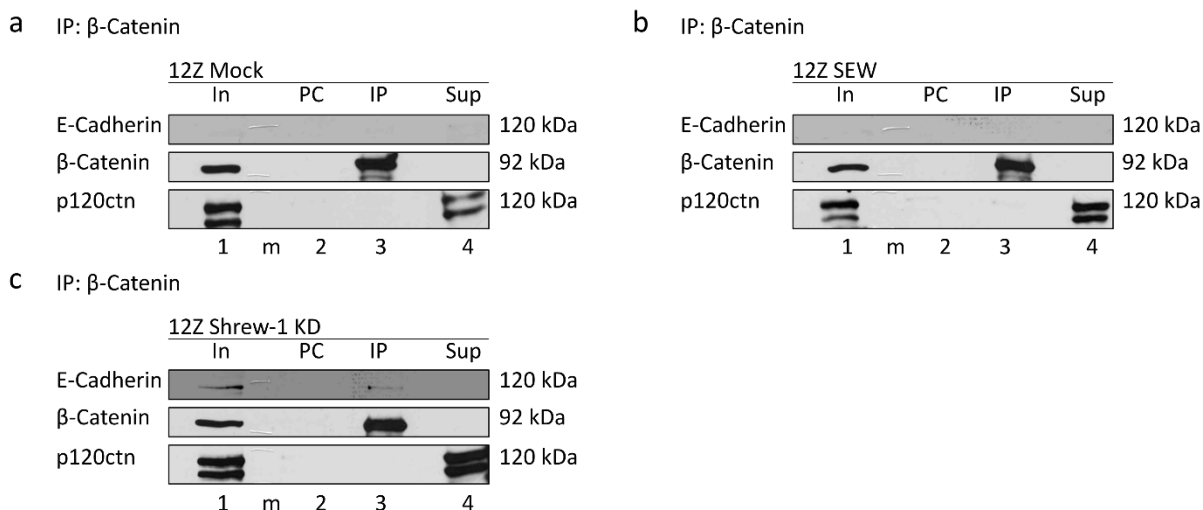


Abbildung 4.5 Interaktion von E-Cadherin mit β -Catenin nach der Herunterregulation von Shrew-1

Für Co-Immünpräzipitations-Experimente wurde der β -Catenin Antikörper H102 (Santa Cruz) verwendet. Die Effizienz der Präzipitation wurde durch die Detektion von β -Catenin in einem anschließenden Western Blot überprüft. In allen 12Z-Zelllinien wurde die gesamte Menge an β -Catenin präzipitiert (IP, Spur 3). In den 12Z Shrew-1 KD-Zellen (c) wurde die gesamte Menge an E-Cadherin mit β -Catenin co-präzipitiert (IP, Spur 3). In den 12Z-Kontrollzelllinien (a und b) konnte keine E-Cadherin Präzipitation detektiert werden. Durch das Durchführen eines Pre-Clearings (PC; Spur 2) konnte sichergestellt werden, dass die Präzipitation von E-Cadherin nicht durch unspezifische Bindungen an das verwendete Protein G-Sepharose Granulat verursacht wurde. In = Input, PC = Pre-Clearing, IP = Immunpräzipitation, Sup = Überstand, m = Proteinleiter, p120ctn = p120-Catenin. Rechts neben den Blots sind die molekularen Massen der detektierten Proteine angegeben.

4.1.5 Einfluss der Shrew-1 Herunterregulation auf weitere Bestandteile der Adhärenzverbindung und das Aktinzytoskelett

Obwohl keine Verbindung zu p120-Catenin besteht, könnte eine Reduktion der Shrew-1-Expression zu einer veränderten Lokalisation von p120-Catenin und auch β -Catenin führen. Es ist bekannt, dass die cytoplasmatische Domäne von Shrew-1 eine direkte Interaktion mit β -Catenin eingehen kann (Bharti *et al.*, 2004). Es kann daher vermutet werden, dass eine verminderte Expression von Shrew-1 einen Einfluss auf die Lokalisation β -Catenin nimmt. Eine veränderte Lokalisation von β -Catenin ist interessant, da dieses neben seiner Aufgabe in der Adhärenzverbindung ebenfalls eine Rolle im Nukleus im Rahmen des Wnt-Signalweges spielt (Kim *et al.*, 2013). Um die Lokalisation von β -Catenin in den 12Z-Zelllinien zu untersuchen, wurde dieses in Immunfluoreszenz-Färbungen angefärbt. In den Färbungen konnte keine veränderte Lokalisation von β -Catenin beobachtet werden (Abbildung 4.6). β -

Catenin befindet sich in allen 12Z-Zelllinien ausschließlich an der Plasmamembran. Auch p120-Catenin wird in seiner Lokalisation nicht beeinflusst. Hier ist jedoch neben der membranständigen Färbung ebenfalls eine Färbung im Nukleus zu erkennen. Wie β -Catenin kann auch p120-Catenin sowohl im Cytosol als auch im Nukleus vorhanden sein. Im Nukleus kann es eine Verbindung mit dem Transkriptionsfaktor Kasio eingehen und so dessen Aktivität beeinflussen (Daniel & Reynolds, 1999; Daniel, 2007). Durch die verminderte Expression von Shrew-1 wird jedoch auch die Lokalisation von p120-Catenin nicht beeinträchtigt. Auch die Co-Lokalisation von β -Catenin und p120-Catenin wird nicht verändert. Diese ist ausschließlich an der Plasmamembran zu detektieren. In den Färbungen ist jedoch gut zu erkennen, dass die Plasmamembranen der 12Z Shrew-1 KD-Zellen glatter sind als in den Kontrollzelllinien. Diese wirken gezackt und unregelmäßig. Dieser Effekt kann auf die Expression des Adhäsionsproteins E-Cadherin zurückgeführt werden, da dieses die Adhäsion zwischen Zellen stärkt (Canel *et al.*, 2013).

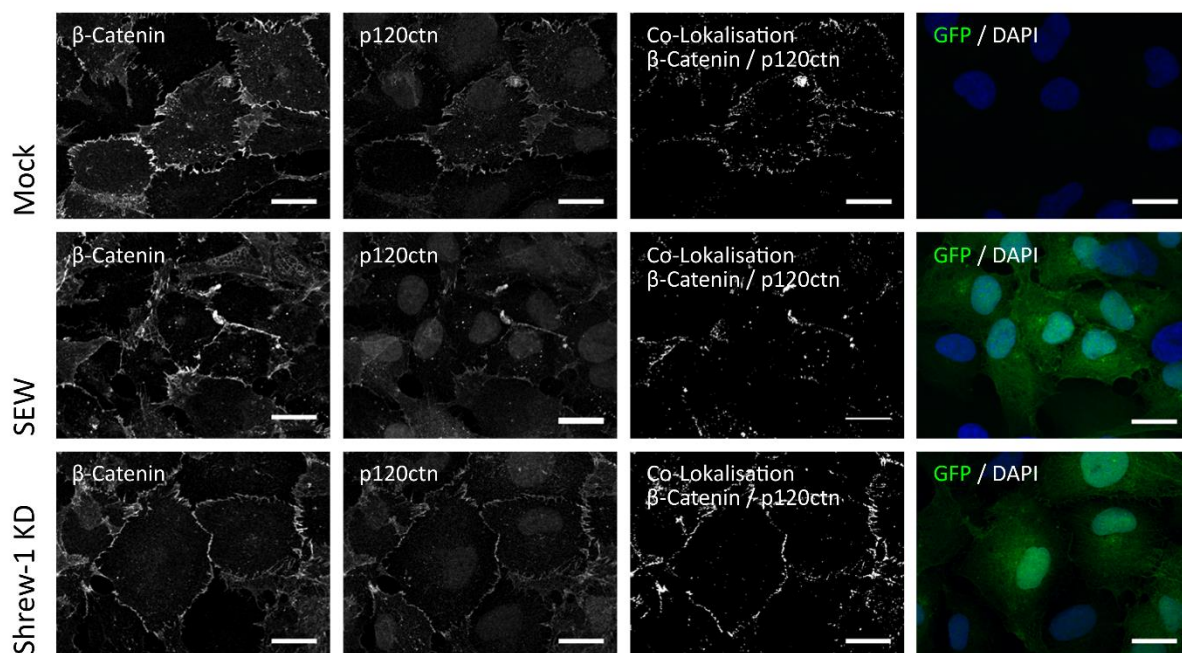


Abbildung 4.6: Lokalisation von β -Catenin und p120-Catenin in den 12Z-Zelllinien

Die Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen β -Catenin (H102, Santa Cruz) und p120-Catenin (cl 98, BD). Sowohl β -Catenin, als auch p120-Catenin, verändern ihre Lokalisation durch eine Herunterregulation von Shrew-1 in den 12Z-Zellen nicht. Der Co-Lokalisationskanal zeigt an, in welchen Bereichen p120 und β -Catenin gemeinsam lokalisiert sind (Image J). Dies ist in allen 12Z-Zelllinien ausschließlich an der Plasmamembran der Fall. Die membranständige Färbung von p120-Catenin und β -Catenin zeigt in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen deutlich, dass die Membran vor allem an den Zell-Zell-Kontakten regelmäßiger strukturiert ist. In allen 12Z-Zelllinien konnte kein nukleäres β -Catenin detektiert werden. Die Kerne wurden durch DAPI visualisiert (blau). Gezeigt sind repräsentative Bilder einer Ebene der Zelllinien. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop TCS SP5 (Leica) aufgenommen. Maßstab 20 μ m.

E-Cadherin kann indirekt über β -Catenin eine Verbindung zum Aktinzytoskelett aufbauen (Canel *et al.*, 2013), aufgrund dessen Fluoreszenzfärbungen des Aktinzytoskeletts und Vinculin in den 12Z-Zelllinien angefertigt wurden. Das Aktinzytoskelett ist in den 12Z-Zelllinien vorwiegend in Stressfasern angeordnet (Abbildung 4.7). In polarisierten Epithelzellen ist das Aktinzytoskelett mit den Adhärenzverbindungen verbunden und bildet ein durchgehendes Band innerhalb der Zellen (kortikaler Aktinring) (Gumbiner, 2005). Daher lag die Vermutung nahe, dass in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen durch die Expression von E-Cadherin die Aktinfilamente neben der Organisation in Stressfasern auch membranständig angeordnet ist, was jedoch nicht beobachtet werden konnte (Abbildung 4.7). Die membranständige Organisation von Aktin könnte auch mit der Zelldicke zusammenhängen. Die 12Z-Zellen polarisieren jedoch *in vitro*, auch in einer konfluenten Kultur, nicht. Mit zunehmender Zelldichte wachsen die 12Z-Zellen unregelmäßig übereinander.

Eine Veränderung ist jedoch für die Lokalisation von Vinculin zu beobachten. An den Enden der Aktin-Stressfasern in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen kann häufig die Lokalisation von Vinculin beobachtet werden (Abbildung 4.7, untere Reihe, Pfeile). In den 12Z-Kontrollzelllinien ist die Färbung von Vinculin nur recht schwach, jedoch auch an den Enden der Aktinfilamente detektierbar (Abbildung 4.7, obere und mittlere Reihe, Pfeile und Pfeilspitzen). Vinculin ist Teil der Fokalkontakte, die eine Verbindung der Zellen zur extrazellulären Matrix (EZM) herstellen. Neben ihrer verankernden Funktion spielen sie eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung aus der EZM. Auffällig ist, dass die Vinculin-Färbung nicht nur in Zellausstülpungen (Lammellipodien, Pfeile) zu sehen ist, sondern auch in Bereichen der Zell-Zell-Kontakte. Diese Färbung ist in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen stark vorhanden (Pfeilspitzen), in den Kontrollzellen jedoch nur schwach.

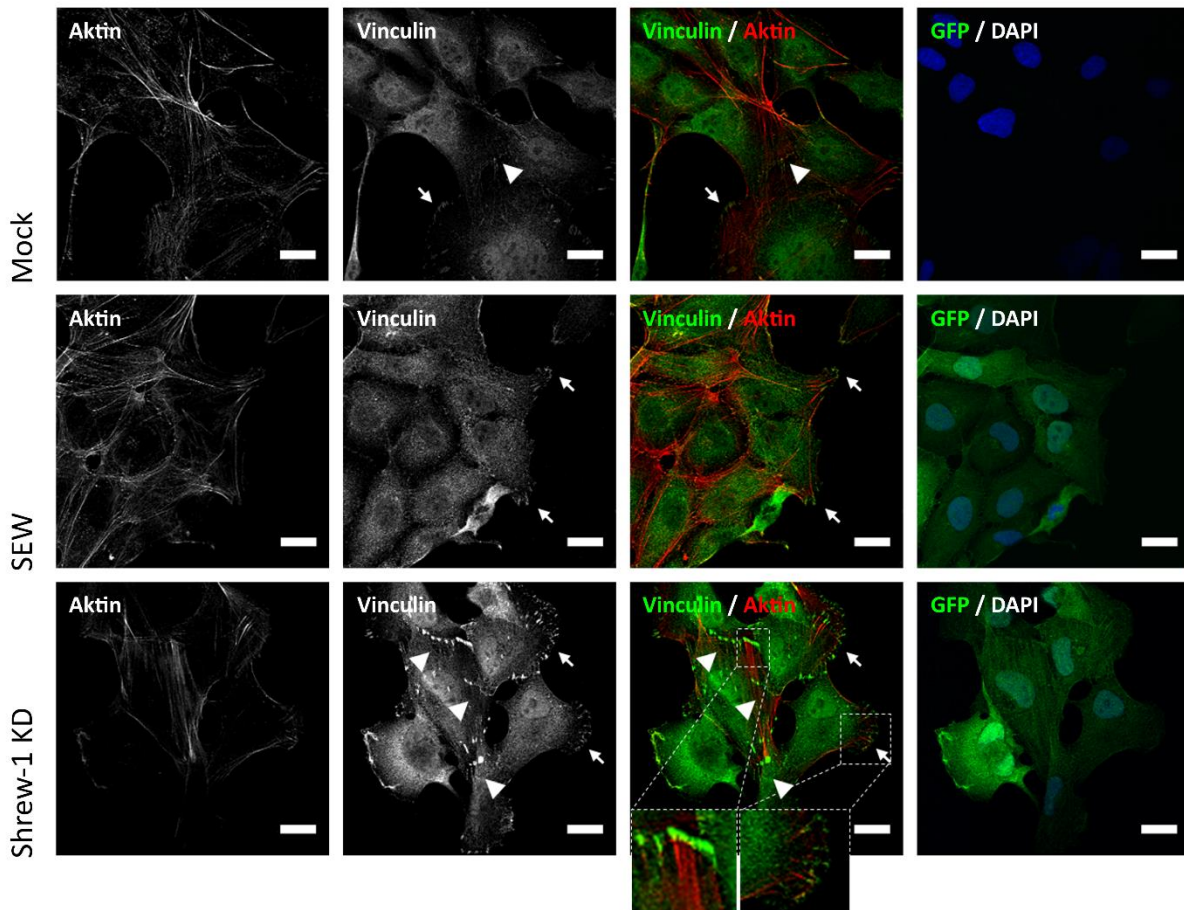


Abbildung 4.7 Lokalisation des Aktinzytoskeletts und Vinculin in den 12Z-Zellen

Das Aktinzytoskelett wird durch die Herunterregulation von Shrew-1 nicht verändert. Jedoch scheint es Veränderungen an den Fokalkontakten zu geben. An den Enden der Aktin-Stressfasern in den Shrew-1 KD-Zellen ist Vinculin angereichert sowohl in Lamellipodien (Pfeile) als auch in den Bereichen der Zell-Zell-Kontakte (Pfeilspitzen). Dies ist in den 12Z-Kontrollzelllinien nur schwach der Fall. Die Färbung von Vinculin erfolgte über Antikörper (Sigma), das Aktinzytoskelett wurde mit Phalloidin visualisiert. Die Kerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau). Gezeigt sind repräsentative Bilder einer Ebene der Zelllinien. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop TCS SP5 (Leica) aufgenommen. Maßstab 20 μm .

4.2 Auswirkung der E-Cadherin-Reexpression auf die Motilität und Invasivität der 12Z Shrew-1 KD-Zellen

In vorherigen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die 12Z Shrew-1 KD in *in vitro* Scratch-Versuchen einen verlangsamten Wundverschluss zeigen (Diplomarbeit Paul, 2010). Nach 24 Stunden betrug die Größe der Wunden der 12Z-Kontrollzelllinien noch 51 % (Mock) bzw. 47 % (SEW) der Anfangsgröße. Die Wunde der 12Z Shrew-1 KD-Zellen war mit 66 % signifikant größer ($p \leq 0,005$ bzw. $p \leq 0,001$). Nach 48 Stunden lag die Wundgröße der 12Z Mock Zellen bei 25 % und die der 12Z SEW Zellen bei 17 % und waren signifikant kleiner ($p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,001$), als die der 12Z Shrew-1 KD-Zellen (36 %). Diese Ergebnisse zeigen, dass die 12Z-Zellen nach der Herunterregulation von Shrew-1 ein reduziertes motiles Verhalten aufweisen (Diplomarbeit Paul, 2010). Um diese Ergebnisse zu

bestätigen, wurde die Motilität der Zellen mittels Transwell-Filter-Analysen bestimmt. Dabei konnte bestätigt werden, dass die 12Z-Zellen nach einer Herunterregulation von Shrew-1 einen signifikant geringeren Anteil an motilen Zellen aufweisen (23,9 %) im Vergleich zu den Kontrollzellen (Mock 30,2 % und SEW 39,0 %) (Abbildung 4.8 a).

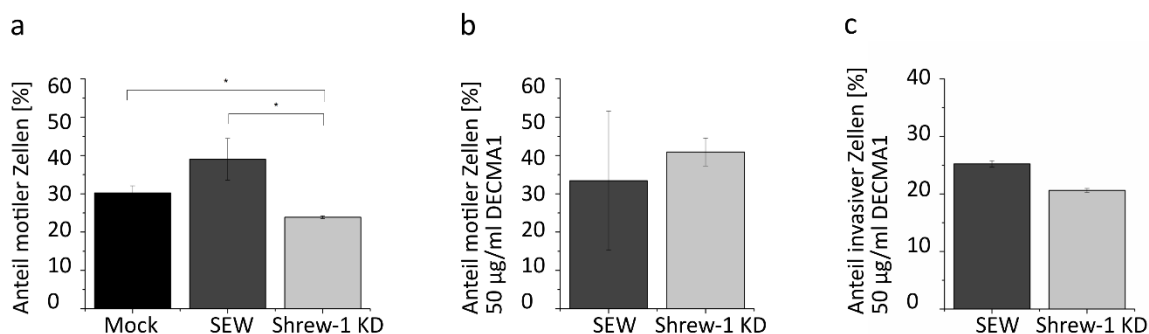


Abbildung 4.8: Motiles und invasives Verhalten der 12Z-Zellen

12Z-Zellen wurden auf Transwell-Filter mit einer Porengröße von 8,0 µm ausgesät. Nach 48 Stunden wurde der Anteil der motilen Zellen bestimmt. (a) Der Anteil an motilen Zellen ist nach der Herunterregulation von Shrew-1 (23,9 %) im Vergleich zu den Kontrollzellen (30,2 % bzw. 39,0 %) signifikant vermindert (n = 3). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. *: $p \leq 0,05$. (b) Die funktionelle Inaktivierung von E-Cadherin mit dem Antikörper DECMA1 (50 µg / ml) erhöhte den Anteil motiler 12Z Shrew-1 KD-Zellen (40,9 %) (n = 2). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. (c) 12Z-Zellen wurden auf Transwell-Invasions-Filter mit einer Porengröße von 8,0 µm ausgesät und E-Cadherin wurde funktionell durch die Stimulation mit dem Antikörper DECMA1 (50 µg / ml) inaktiviert. Der Anteil invasiver 12Z Shrew-1 KD-Zellen nach 48 Stunden wird durch die Blockierung von E-Cadherin nicht erhöht. n = 2. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Um die erzeugte Wunde in *in vitro* Scratch-Versuchen schließen zu können, müssen sich die Zellen aus ihrem Verband lösen und in die freie Fläche einwandern. Dazu müssen Zell-Zell-Kontakte aufgelöst werden wobei die Adhärenzverbindung eine zentrale Rolle spielt. In Transwell-Migrations-Versuchen werden die Zellen vereinzelt auf den Filter pipettiert und befinden sich zu Beginn des Versuches nicht in einem Verband. Um an die untere Seite der Filter zu gelangen, müssen die Zellen einzeln durch Poren migrieren, wobei die Ausbildung stabiler Adhärenzverbindungen hinderlich ist. Es ist möglich, dass die Motilität der 12Z Shrew-1 KD-Zellen aufgrund deren E-Cadherin-Expression verlangsamt ist. Um dies zu testen wurden Transwell-Migrations-Versuche durchgeführt, bei denen E-Cadherin mit dem Antikörper DECMA1 funktionell inaktiviert wurde. Die Stimulation mit DECMA1 führt in MCF7-Zellen innerhalb von acht Stunden zur Auflösung der Zell-Zell-Verbindungen (Gross *et al.*, 2009). Dies beruht auf der Beeinträchtigung der Dimerisierung von E-Cadherin Proteinen, wodurch die Ausbildung einer festen Zelladhäsion blockiert ist (Vestweber & Kemler, 1985; Ozawa *et al.*, 1990; Nakagawa *et al.*, 2001). Die Zugabe von DECMA1 zu den 12Z Shrew-1 KD-Zellen führte zu einer Erhöhung des Anteils an invasiven Zellen (Shrew-1 KD: 40,9 %) über den Wert der 12Z-Kontrollzellen (SEW: 33,4 %) (Abbildung

4.8 b). Somit kann das verminderte motile Verhalten der 12Z Shrew-1 KD-Zellen auf die Reexpression von E-Cadherin zurückgeführt werden

Die Herunterregulation von Shrew-1 beeinflusst auch das invasive Verhalten der 12Z-Zellen. In Transwell-Invasions-Versuchen ist der Anteil an invasiven Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen um etwa 10 % vermindert (Mock: 28 %, SEW: 30 %, Shrew-1 KD: 20 %) (Diplomarbeit Paul, 2010). In Bezug auf die 12Z SEW Zellen ist die Reduktion der Invasivität signifikant ($p \leq 0,05$). Um zu überprüfen, ob die verminderte Invasivität aus der E-Cadherin-Reexpression resultiert, wurden Transwell-Invasions-Versuche mit dem DECMA1-Antikörper durchgeführt. Dabei zeigt sich, dass der invasive Phänotyp, der 12Z Shrew-1 KD-Zellen durch die funktionelle Blockierung von E-Cadherin nicht erhöht wird (Shrew-1 KD: 20,6 %, SEW: 25,2 %) (Abbildung 4.8 c). Die verminderte Invasivität kann somit nicht alleine durch die Reexpression von E-Cadherin erklärt werden. Durch die Herunterregulation von Shrew-1 müssen weitere Charakteristika der 12Z-Zellen verändert werden, die ihnen die Fähigkeit verleihen, die Komponenten der extrazellulären Matrix abzubauen und sich durch sie zu bewegen.

4.3 Mechanismus der E-Cadherin-Reexpression in den 12Z-Zellen

Als nächstes stellte sich die Frage, auf welche Weise die Expression von E-Cadherin durch die Herunterregulation von Shrew-1 reguliert wird. Dazu wurde zuerst überprüft, ob die Herunterregulation von Shrew-1 die Expression von E-Cadherin auf der Ebene der Transkription oder Translation verändert. Um diese Fragestellung anzugehen wurden qPCRs mit cDNA Proben der 12Z-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die E-Cadherin mRNA in allen 12Z Shrew-1 KD-Zelllinien im Vergleich zu den 12Z-Kontrollzelllinien signifikant erhöht ist ($p \leq 0,0001$) (Abbildung 4.9). Daher könnte die Herunterregulation von Shrew-1 die Transkription des E-Cadherin-Gens (CDH1) oder die Stabilität der mRNA beeinflussen.

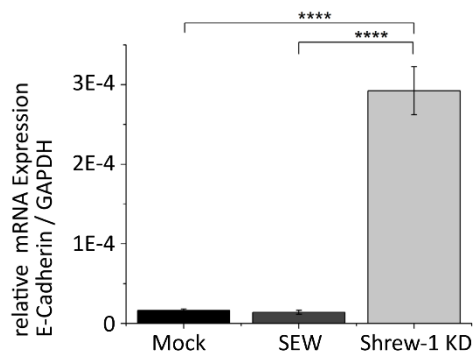


Abbildung 4.9 E-Cadherin wird in 12Z Shrew-1 KD-Zellen auf mRNA-Ebene reexprimiert

cDNA Proben der 12Z-Zelllinien wurden für qPCRs verwendet. Die relative Menge der E-Cadherin mRNA in Bezug auf die GAPDH mRNA-Expression ist in den 12Z Shrew-1 KD-Zelllinien, im Vergleich zu den 12Z-Kontrollzelllinien, signifikant erhöht. Die Herunterregulation von Shrew-1 scheint in diesem zellulären Kontext die Transkription des E-Cadherin-Gens zu beeinflussen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der relativen E-Cadherin mRNA-Expression in Bezug auf GAPDH von vier unabhängig erzeugten Zelllinien (n = 4). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. ****: $p \leq 0,0001$.

4.3.1 Expression von E-Cadherin-Repressoren in den 12Z-Zellen

Eine Möglichkeit der Regulation der E-Cadherin-Expression auf Transkriptions-Ebene besteht über die Expression von Repressoren. Zu den transkriptionalen Repressoren von E-Cadherin zählen die Transkriptionsfaktoren Snail, Slug, Twist und ZEB1. Diese können an mehrere Bereiche des CDH1-Promotors (E-Boxen) binden und so den Zugang für die Transkriptionsmaschinerie blockieren. Des Weiteren können diese Proteine weitere Faktoren rekrutieren, die zur Stilllegung des Promotors beitragen z. B. Histondeacetylasen (HDAC) (Peinado *et al.*, 2007; von Burstin *et al.*, 2009; Aghdassi *et al.*, 2012). Da die 12Z-Zellen ursprünglich kein E-Cadherin exprimieren besteht die Möglichkeit, dass die Transkription durch Repressoren blockiert ist und diese Blockade durch eine Herunterregulation von Shrew-1 aufgehoben wird. Um dies zu überprüfen, wurden qPCRs mit cDNA Proben der 12Z-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass es in den 12Z Shrew-1 KD-Zelllinien zu keiner verminderten Expression der Repressoren kommt (Abbildung 4.10). Im Falle von Slug und ZEB1 kommt es sogar zu einer verstärkten Expression der mRNA (Abbildung 4.10 a und c). Der Nachweis von Slug, Snail und Twist auf Protein-Ebene war mit den verfügbaren Antikörpern nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

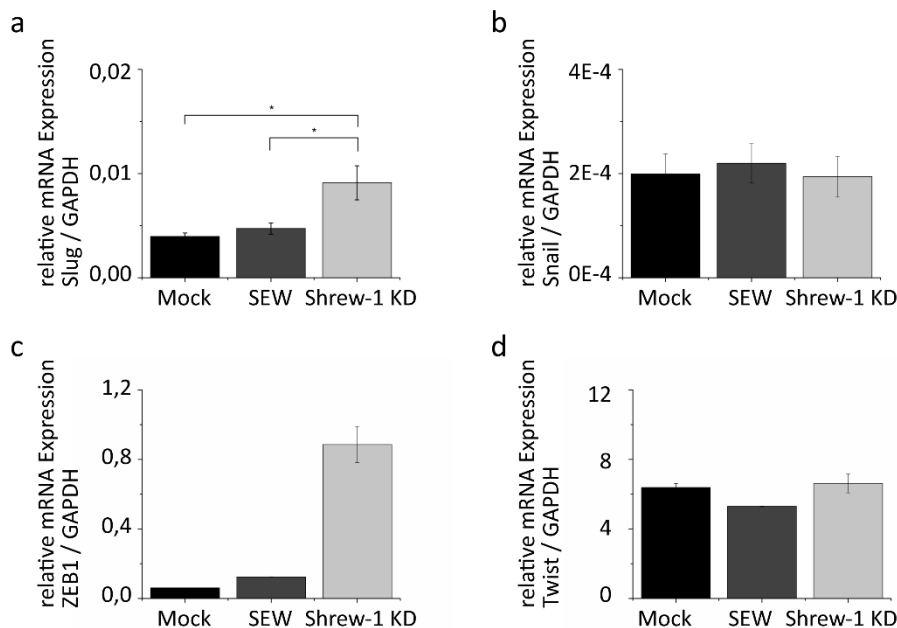


Abbildung 4.10: Expression der E-Cadherin-Repressoren in den 12Z-Zelllinien

cDNA Proben der 12Z-Zelllinien wurden für qPCRs mit TaqMan-Sonden (a und b, n = 4) oder SYBRGreen (c und d, n = 2) verwendet. Die Expression von Slug (a) und ZEB1 (c) wird durch die verminderte Expression von Shrew-1 hochreguliert. Wenn die E-Cadherin-Expression in den 12Z-Zellen über diese Repressoren reguliert wären, würde man eine verminderte Expression in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen erwarten. Die Expression von Snail (b) und Twist (d) scheint nicht beeinflusst zu werden. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (a und b) bzw. die Standardabweichung (c und d) an. *: $p \leq 0,05$.

4.3.2 Einfluss der Herunterregulation von Shrew-1 auf die Methylierung des CDH1-Promotors

Die E-Cadherin-Expression wird in vielen Karzinomen durch eine Hypermethylierung von Cytosinen (5-Methylcytosin) in CpG-Inseln des CDH1-Promotors unterdrückt (Ahmed, 2012; Jin & Robertson, 2013). In der Literatur lassen sich zahlreiche Hinweise finden, dass ein veränderter Methylierungsstatus von Promotorregionen im Kontext der Endometriose ebenfalls relevant sein könnte (Wu *et al.*, 2005, 2006; Xue *et al.*, 2007a, 2007b; Izawa *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). In epithelialen Endometriose-Zellen konnte eine erhöhte Expression der DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT3A und DNMT3B beobachtet werden (Wu *et al.*, 2007b), welche für die Etablierung und Aufrechterhaltung von Methylierungen in CpG-Inseln verantwortlich sind. Um zu überprüfen, ob die E-Cadherin-Expression in der Zelllinie 12Z durch eine Methylierung des CDH1-Promotors unterdrückt ist, wurden die Zellen mit dem synthetischen Nukleosid 5-Azacytidin inkubiert. Dieses baut sich während der Replikation anstelle von Cytosin in die neu replizierte DNA ein. Da 5-Azacytidin in seinem Pyrimidinring an der Position 5 ein Stickstoffatom und nicht wie Cytosin ein Kohlenstoffatom besitzt, kann es nicht methyliert werden. Auf diese Weise wird die Promotorregion demethyliert und eine Transkription kann erfolgen, falls diese zuvor aufgrund der Methylierung blockiert war. Nach der Behandlung der 12Z-Zellen mit 5-

Azacytidin konnte in Western Blot-Versuchen die Expression von E-Cadherin detektiert werden (Abbildung 4.11 a, Spur 2). Als Kontrollzelllinie diente in diesen Versuchen die humane Melanomzelllinie MDA-MB435s. Von dieser Zelllinie ist bekannt, dass diese keine E-Cadherin-Expression aufgrund der Hypermethylierung des CDH1-Promotors aufweist (Lombaerts *et al.*, 2006). Durch die Demethylierung des Promotors wurde die Expression von E-Cadherin in den MDA-MB 435s-Zellen induziert (Abbildung 4.11 a, Spur 4). Da die 12Z-Zellen ebenso auf die Behandlung mit 5-Azacytidin reagierten, ist es möglich, dass die E-Cadherin-Expression in der parentalen Zelllinie 12Z durch eine Hypermethylierung des CDH1-Promotors unterdrückt ist. Diese Methylierung könnte, wie die Behandlung mit 5-Azacytidin, ebenfalls durch die Herunterregulation von Shrew-1 aufgehoben werden, wodurch der CDH1-Promotor für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich wird und es zur Expression von E-Cadherin kommt. Um dies zu testen, wurde genomische DNA der 12Z-Zelllinien isoliert und die unmethylierten Cytosine mittels Bisulfit-Behandlung zu Uracil konvertiert. 5-Methylcytosin ist aufgrund der Methylgruppe vor dieser Konvertierung geschützt. In PCRs mit Primern, die entweder an nicht-konvertierte, also methylierte Bereiche oder konvertierte und somit unmethylierte Bereiche binden, kann eine Aussage über den Methylierungszustand eines Gens getroffen werden (methylierungsspezifische PCR, MSP). Dabei zeigte sich, dass es in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen keine Veränderungen im Anteil von methylierten und unmethylierten CDH1-Promotoren (Abbildung 4.11 c, Spur 5 und 6) im Vergleich zu den 12Z-Kontrollzellen gibt (Spur 1 bis 4). Dabei wurden Primer innerhalb der Promotorregion von CDH1 verwendet (F_ bzw. R_Ecad_M (Position -205 bis -90) und F_ bzw. R_Ecad_U (Position -210 bis -114)). Auch mit einem weiteren Primersatz (F_ bzw. R_Ecad_CH3 (Position -78 bis +126) und F_ bzw. R_Ecad_UN (Position -82 bis +129)), dessen reversen Primer innerhalb des Exon 1 binden, konnten keine Veränderungen beobachtet werden (Anhang, Abbildung 10.3). Auch die Sequenzierung der Bisulfit-konvertierten DNA von jeweils einer Zelllinie (12Z SEW, 12Z Shrew-1 KD) zeigte keine Veränderung im Methylierungsstatus des CDH1-Promotors (Daten nicht gezeigt). Um sicher zu stellen, dass die Aussagen der MSPs valide sind, wurden die MSPs neben den MDA-MB 435s-Zellen ebenfalls mit der Zelllinie MCF7 durchgeführt, die E-Cadherin exprimiert und dessen CDH1-Promotor vollständig unmethyliert ist (Graff *et al.*, 1997; Nass *et al.*, 2000; Lombaerts *et al.*, 2006). In den durchgeführten MSPs zeigten sich diese Ergebnisse ebenfalls (Abbildung 4.11 b).

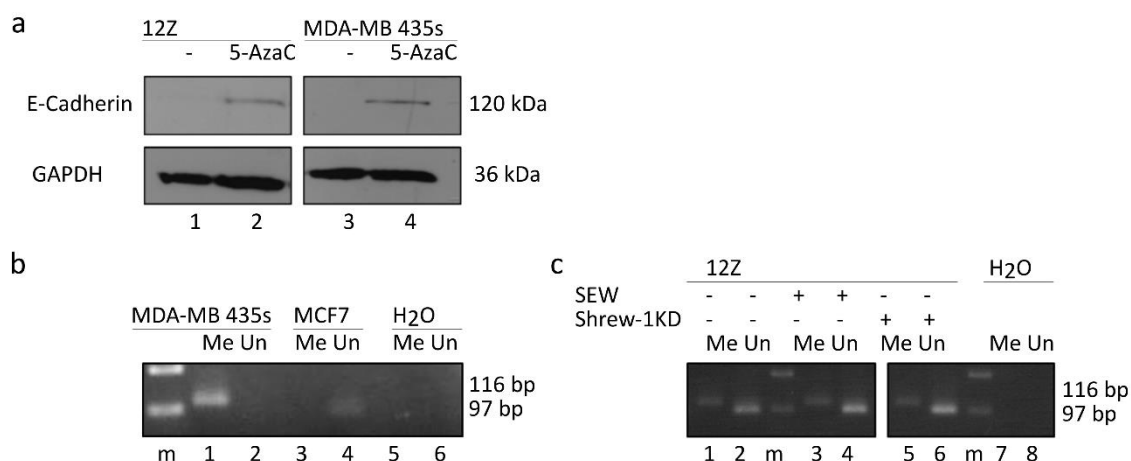


Abbildung 4.11: Keine Veränderung der CDH1-Promotor Methylierung durch die Shrew-1 Herunterregulation in 12Z-Zellen

(a) 12Z- und MDA-MB 435s-Zellen wurden an drei aufeinander folgenden Tagen mit jeweils 3 μ M 5-Azacytidin behandelt und anschließend ohne 5-Azacytidin weitere zwei Tage kultiviert, bevor Gesamtzelllysate angefertigt wurden. 5-Azacytidin bewirkt die Demethylierung von methylierten Cytosinen. In der Zelllinie 12Z führte die Behandlung mit 5-Azacytidin zur Expression von E-Cadherin, was darauf hinweist, dass dessen Promotorregion ursprünglich methyliert war. MDA-MB 435s-Zellen dienen als Kontrolle, da bekannt ist, dass deren CDH1-Promotor hypermethyliert ist. Pro Probe wurden 30 μ g Gesamtzelllysate eingesetzt und der Nachweis von GAPDH diente als Ladekontrolle. Rechts neben dem Blot sind die molekularen Massen der detektierten Proteine angegeben. (b) Die Methylierung des CDH1-Promotors in den 12Z-Zelllinien wurde mittels Bisulfit-Konvertierung und MSPs analysiert. Anhand der E-Cadherin-negativen Zelllinie MDA-MB 435s und der E-Cadherin exprimierenden Zelllinie MCF7 wurde die Funktionalität des Versuches überprüft, da bekannt ist, dass die E-Cadherin-Expression in diesen Zelllinien über die Methylierung des Promotors reguliert ist (Graff *et al.*, 1997; Nass *et al.*, 2000; Lombaerts *et al.*, 2006). Rechts neben dem Gel ist die Größe der Fragmente in Basenpaaren angegeben. (c) Dargestellt sind repräsentative MSP-Ergebnisse der 12Z-Zelllinien mit den Primern F_ bzw. R_Ecad_M (methyliert) und F_ bzw. R_Ecad_U (unmethyliert) nach der Bisulfit-Konvertierung. Die Herunterregulation von Shrew-1 verursacht keine Veränderung in der Menge von methyliertem und unmethyliertem CDH1-Promotor in den 12Z-Zellen. Me bzw. Un = PCR-Produkte mit Primern gegen den methylierten bzw. unmethylierten CDH1-Promotor.

4.3.3 Einfluss der HDAC-Inhibierung auf die E-Cadherin-Expression in 12Z-Zellen

Für die Entwicklung von Endometriose-Läsionen werden ebenfalls Veränderungen in der Modifikation von Histonen diskutiert (Wu *et al.*, 2007a; Colón-Díaz *et al.*, 2012; Xiaomeng *et al.*, 2012; Monteiro *et al.*, 2013). Histone können an Lysin-Resten acetyliert werden, wodurch die positive Ladung der Lysine neutralisiert wird. Die Bindung an das negativ geladene Phosphatgerüst der DNA wird so geschwächt, wodurch es zu einer Auflockerung des Chromatins in dem betreffenden Bereich kommt. Durch diese Auflockerung wird die Transkription in diesen Bereichen erleichtert. Histondeacetylasen (HDAC) können diese Acetylierung wieder entfernen, wodurch die DNA in den betreffenden Bereichen dichter gepackt wird und die Transkription somit erschwert wird. Im Kontext der Endometriose konnte bereits eine verstärkte Expression von HDACs gezeigt werden (Colón-Díaz *et al.*, 2012). Die Inhibierung von HDACs konnte zudem mit einer reduzierten Größe von Endometriose-ähnlichen Läsionen in Mäusen

(Lu *et al.*, 2010), sowie *in vitro* mit verminderter Motilität und Invasivität in Verbindung gebracht werden (Wu *et al.*, 2007a). Dabei wurde ebenfalls eine Auswirkung auf die E-Cadherin-Expression festgestellt (Wu *et al.*, 2007a). Die Expression von E-Cadherin in den 12Z-Zellen ist möglicherweise ebenfalls durch die Aktivität von HDACs unterbunden. Daher wurden 12Z-Zellen mit den HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) behandelt und die E-Cadherin-Expression in Western Blot-Analysen begutachtet. Durch die Gabe von TSA kam es in der Zelllinie 12Z zur Expression von E-Cadherin, wobei die Stärke der Expression abhängig von der TSA-Dosis war (Abbildung 4.12 a, Spur 1 bis 3). In Immunfluoreszenz-Färbungen zeigte sich, dass das reexprimierte E-Cadherin in diesem Zusammenhang an der Plasmamembran lokalisiert ist (Abbildung 4.12 b, Pfeile) und dort somit seine adhäsive Funktion ausüben kann.

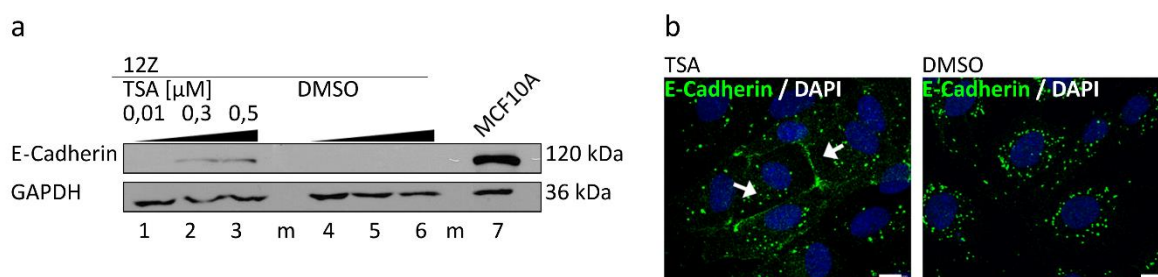


Abbildung 4.12: TSA induzierte E-Cadherin-Expression in 12Z-Zellen

(a) 12Z-Zellen wurden mit TSA in den angegebenen Konzentrationen oder dem Lösungsmittel DMSO für 24 Stunden inkubiert. Die Behandlung mit TSA führte zur Expression von E-Cadherin, wobei eine höhere Dosierung zu einer stärkeren Expression führte (Spur 1 bis 3). Die Gabe von DMSO induzierte keine E-Cadherin-Expression (Spur 4 bis 6). Pro Probe wurden 30 µg Gesamtzelllysate aufgetragen. Der GAPDH-Nachweis diente als Ladekontrolle. Neben dem Blot sind die molekularen Massen der detektierten Proteine angegeben. (b) In Immunfluoreszenz-Präparaten konnte die E-Cadherin-Lokalisation nach TSA-Behandlung (0,5 µM TSA, 24 Stunden) an der Plasmamembran gezeigt werden, wohingegen in den Kontrollzellen keine E-Cadherin-Expression gezeigt werden konnte. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop TCS SP5 (Leica) aufgenommen. Maßstab 10 µm.

4.3.4 Effekt der HDAC-Inhibierung auf andere Endometriose-Zelllinien

Als nächstes wurde überprüft, ob der Effekt von TSA auf die E-Cadherin-Expression ausschließlich in der Zelllinie 12Z auftritt oder ob dies in weiteren E-Cadherin-negativen epithelialen Zellen aus Endometriose-Biopsien ebenfalls zu beobachten ist. Die Stimulation mit TSA führte auch in den epithelialen Zelllinien 10Z und 49Z zur Expression von E-Cadherin (Abbildung 4.13 a, Spur 3 und b, Spur 3 und 4). Wie bei den 12Z-Zellen ist die Expressionsstärke von E-Cadherin in den 49Z-Zellen abhängig von der TSA Dosis.

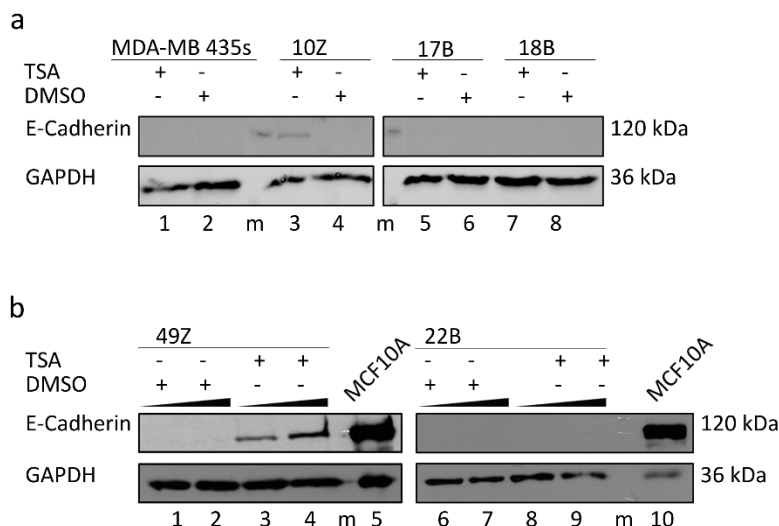


Abbildung 4.13: TSA induzierte E-Cadherin-Expression in epithelialen Endometriose-Zelllinien

(a) Die 10Z, 17B und 18B Zellen wurden mit TSA in DMSO (0,5 μ M) oder DMSO alleine für 24 Stunden kultiviert. Die Behandlung mit TSA führte in den 10Z-Zellen zur Expression von E-Cadherin (Spur 3). DMSO hat in keiner der Zelllinien einen Effekt auf die E-Cadherin-Expression. (b) Die Zelllinien 49Z und 22B wurden mit unterschiedlichen TSA-Konzentrationen für 24 Stunden stimuliert (0,3 μ M und 0,5 μ M). In den 49Z-Zellen konnte nach TSA Behandlung die Expression von E-Cadherin beobachtet werden (Spur 3 und 4), wobei eine höhere Dosierung zu einer stärkeren Expression führte (Spur 4). In den 22B-Zellen induzierte TSA keine E-Cadherin-Expression (Spur 8 und 9). MCF10A Zelllysat (20 μ g) diente als Positivkontrolle für die Expression von E-Cadherin (Spur 5 und 10). Pro Probe wurden 30 μ g Proteinlysat geladen. Der GAPDH-Nachweis diente als Ladekontrolle. Rechts neben den Blots sind die molekularen Massen der nachgewiesenen Proteine angegeben. m = Proteinleiter

Bei E-Cadherin-negativen epithelialen Zellen in Endometriose-Läsionen geht man von einer teilweisen Dedifferenzierung der Zellen aus, die einhergeht mit der Verminderung der E-Cadherin-Expression (Starzinski-Powitz *et al.*, 2001; Matsuzaki & Darcha, 2012). Diese verminderte Expression wäre somit nur ein temporäres Ereignis. In den stromalen Zellen sollte die Expression von E-Cadherin jedoch dauerhaft herunterreguliert sein. Wu *et al.* konnten bereits für die stromale Zelllinie 22B zeigen, dass die Behandlung mit TSA die Protein-Expression von E-Cadherin nicht induziert (Wu *et al.*, 2007a). Auf mRNA-Ebene konnte ein schwacher Anstieg beobachtet werden (Wu *et al.*, 2007a). In den stromalen Zelllinien 17B, 18B und 22B konnte nach der TSA-Behandlung weiterhin keine detektierbare E-Cadherin-Expression in Western Blot-Analysen nachgewiesen werden (Abbildung 4.13 a, Spur 5 und 7 und b, Spur 8 und 9). Dies lässt vermuten, dass in den stromalen Zellen aus Endometriose-Läsionen die E-Cadherin-Expression über einen anderen oder weiteren Mechanismus unterbunden ist. In MDA-MB 435-Zellen, dessen E-Cadherin-Expression durch die Methylierung des CDH1-Promotors unterbunden ist, induziert TSA ebenfalls nicht die Expression von E-Cadherin (Abbildung 4.13 a, Spur 1).

Auffällig ist, dass die E-Cadherin-Expression in den 49Z-Zellen stärker ist als die in den 10Z-Zellen. Die 49Z-Zellen haben E-Cadherin auch nach der Herunterregulation von Shrew-1 schwach exprimiert (Abbildung 4.3 b, Spur 6), aufgrund dessen man von einem Zusammenhang zwischen der Shrew-1-Expression und der epigenetischen Regulation von E-Cadherin ausgehen kann.

4.3.5 Einfluss der HDAC-Inhibierung auf das Aktinzytoskelett und Vinculin in den 12Z-Zellen

TSA führt, wie die Herunterregulation von Shrew-1, in epithelialen Endometriose-Zelllinien zur Expression von E-Cadherin (Abbildung 4.2 a, 4.3, 4.12 und 4.13). Da die Herunterregulation von Shrew-1 ebenfalls Einfluss auf die Lokalisation von Vinculin genommen hat (Abbildung 4.7), wurde in TSA behandelten 12Z-Zellen das Aktinzytoskelett, β -Catenin und Vinculin in Immunfluoreszenz-Färbungen begutachtet. β -Catenin ist nach der Behandlung mit TSA wie in den Kontrollzellen (DMSO) an der Plasmamembran lokalisiert (Abbildung 4.14, a). Die Behandlung mit TSA wirkt sich somit genau wie die Herunterregulation von Shrew-1 nicht auf die Lokalisation von β -Catenin aus (Abbildung 4.6). Auch das Aktinzytoskelett scheint durch die Behandlung mit TSA nicht verändert zu werden (Abbildung 4.14 b). Es ist mit und ohne TSA-Behandlung vorwiegend in Stressfasern organisiert und gleicht somit den 12Z Shrew-1 KD-Zellen sowie deren Kontrollzellen (SEW) (Abbildung 4.7).

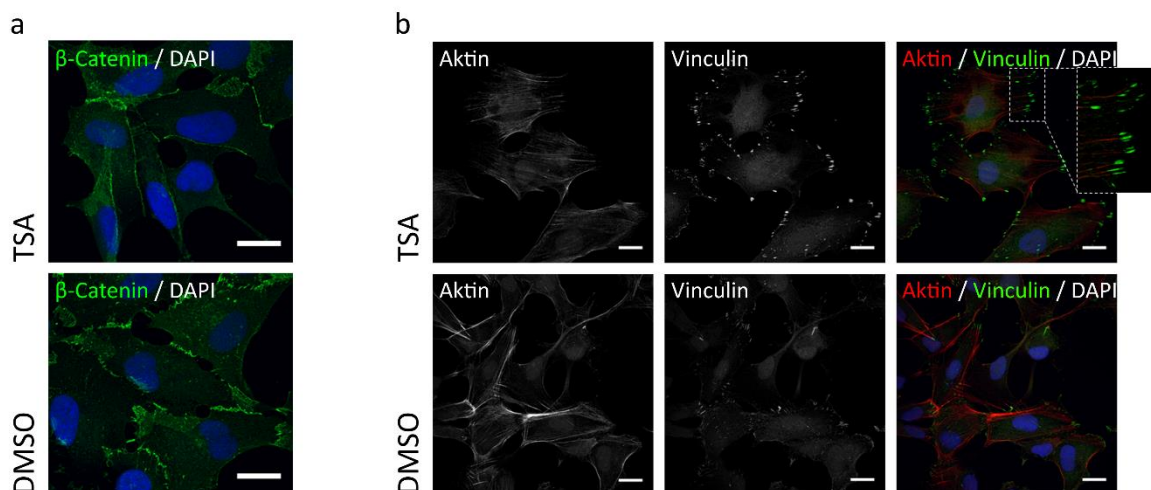


Abbildung 4.14: Auswirkungen von TSA auf das Aktinzytoskelett und assoziierte Proteine in 12Z-Zellen

Die Lokalisation von β -Catenin (a) und des Aktinzytoskeletts (b) wird in den 12Z-Zellen durch die TSA-Behandlung nicht verändert. Jedoch scheint es wie durch die Herunterregulation von Shrew-1 eine Veränderung an den Fokalkontakten zu geben. Vinculin (b) ist an den Enden der Aktin-Stressfasern deutlich stärker gefärbt (Vergrößerung). Dies ist in den DMSO behandelten Zellen nur schwach der Fall. β -Catenin und Vinculin wurde mit Antikörpern gefärbt, das Aktinzytoskelett wurde mit Phalloidin visualisiert. Die Kerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau). Gezeigt sind repräsentative Bilder einer Ebene der Zelllinien. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop TCS SP5 (Leica) aufgenommen. Maßstab 20 μ m.

Auffällig ist jedoch die Immunfluoreszenz-Färbung von Vinculin. In den TSA behandelten 12Z-Zellen ist eine starke Vinculin-Färbung an den Enden der Aktin-Stressfasern zu beobachten (Abbildung 4.14 b). Diese ähnelt stark der Färbung in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen (Abbildung 4.7) und ist ebenfalls in Zellausstülpungen als auch in Bereichen der Zell-Zell-Kontakte sichtbar. In den DMSO behandelten Zellen ist Vinculin auch schwach mit den Enden der Stressfasern assoziiert, jedoch ist die Färbung wie bei den 12Z-Kontrollzellen (Mock und SEW) deutlich geringer.

4.3.6 Beeinflussung der Histonen-Acetylierung am CDH1-Promotor durch Shrew-1

TSA inhibiert die Aktivität von HDACs und verhindert so die Acetylierung von Histonen, welche mit aktivem Chromatin assoziiert ist und hebt bestehende Acetylierungen auf (Wang *et al.*, 2007). Dies kann die Expression von E-Cadherin in den 12Z-Zellen nach der TSA-Behandlung erklären. Da eine Herunterregulation von Shrew-1 ebenfalls zur Expression von E-Cadherin führt und HDACs im Rahmen der Erkrankung Endometriose eine Rolle zu spielen scheinen (Colón-Díaz *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012a, 2012b; Samartzis *et al.*, 2013), wurde als nächstes überprüft, ob Shrew-1 einen Einfluss auf die Modifikation von Histonen am Promotor des E-Cadherin-Gens (CDH1) hat. Dazu wurden ChIP-Versuche mit Antikörpern gegen die Acetylierung des Lysin 9 am Histon 3 (H3K9ac) und gegen die RNA-Polymerase II durchgeführt. Die Histon-Modifikation H3K9ac ist mit Transkriptions-aktivem, aufgelockertem Chromatin assoziiert (Peterson & Laniel, 2004; Nishida *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007) und bei aktiver Transkription besteht eine Interaktion von Promotoren mit der RNA-Polymerase II. Mit der präzipitierten DNA wurden qPCRs mit spezifischen Primern für die CDH1-Promotorregion durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Promotorregion von CDH1 in den 12Z-Zellen nach der Herunterregulation von Shrew-1, im Vergleich zu den Kontrollzellen (SEW), mehr mit der Modifikation H3K9ac sowie der RNA-Polymerase II assoziiert ist (Abbildung 4.15 und Anhang, Abbildung 10.4 a bis d). Die Reduktion von Shrew-1 auf Protein-Ebene führt somit zu einer Zunahme der Histon-Modifikation H3K9ac im Bereich des CDH1-Promotors und so vermutlich zu einer Auflockerung des Chromatins in dem betreffenden Bereich und induziert möglicherweise auf diesem Wege die Expression von E-Cadherin.

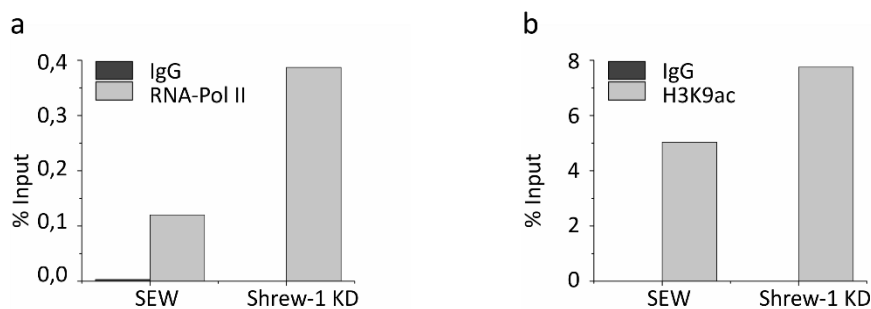


Abbildung 4.15: Verstärkte H3K9-Acetylierung am CDH1-Promotor nach der Herunterregulation von Shrew-1 in 12Z-Zellen

Um zu analysieren, ob die Herunterregulation von Shrew-1 Histon-Acetylierungen verändern kann, wurden ChIP-Experimente mit Antikörpern gegen die RNA-Polymerase II (a) und die Histon-Modifikation H3K9ac (b) durchgeführt. Anschließende qPCRs mit Primern gegen den CDH1-Promotor zeigten, dass die RNA-Polymerase II und H3K9ac in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen eher mit der Promotorregion von CDH1 verbunden sind als in den Kontrollzellen (SEW). Jede qPCR-Reaktion wurde als Duplikat durchgeführt und der Mittelwert gebildet. In den qPCRs wurde das Primer-Paar ChIP_CDH1_3 verwendet. Gezeigt ist je ein repräsentatives von drei (RNA-Polymerase II) bzw. sieben (H3K9ac) unabhängigen Experimenten. Weitere ChIP-Ergebnisse befinden sich im Anhang (Abbildung 10.4 a bis d).

Bei der Entwicklung von Tumorerkrankungen werden Veränderungen in der Expression von HDACs oder Mutationen in deren Genen häufig gefunden (Ropero & Esteller, 2007) und HDAC1 und HDAC2 scheinen im Kontext der Endometriose eine Rolle zu spielen (Imesch *et al.*, 2010; Colón-Díaz *et al.*, 2012). In Western Blot-Analysen wurde die Expressionsstärke der beiden Proteine in Abhängigkeit der Shrew-1-Expression in den 12Z-Zellen begutachtet. Die Expression von HDAC1 und HDAC2 ist in den 12Z-Zellen durch eine Herunterregulation von Shrew-1 nicht verändert (Abbildung 4.16 a, Spur 3 und b).

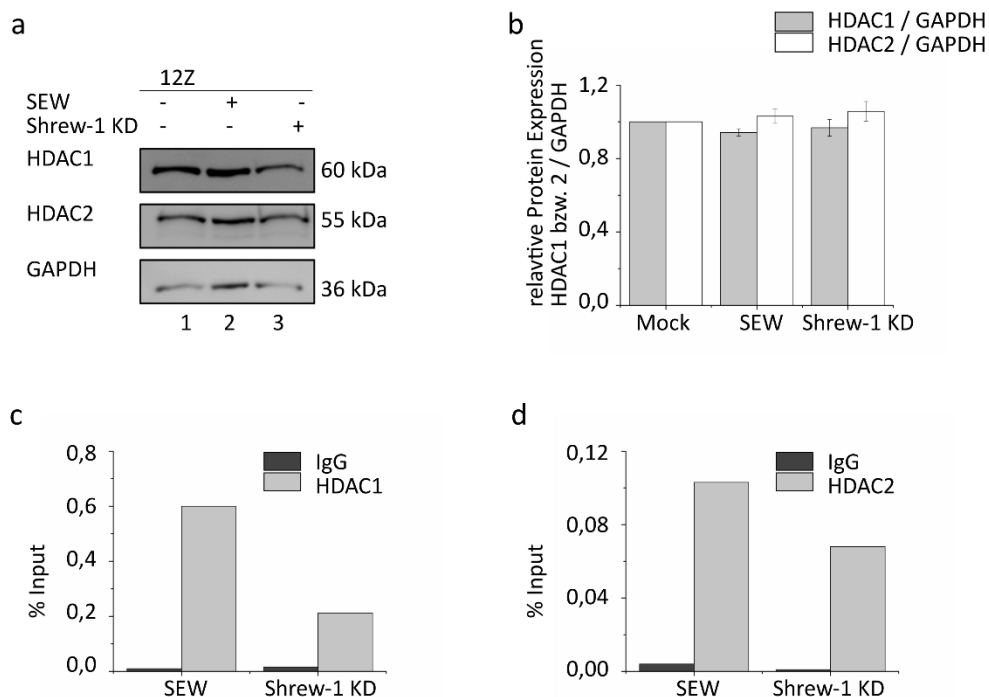


Abbildung 4.16: Expression von HDAC1 und HDAC2 und deren Interaktion mit dem CDH1-Promotor in den 12Z-Zellen

(a) In der 12Z-Zellen wurde die Expression von HDAC1 und HDAC2 begutachtet. Die Verwendung der shRNA gegen Shrew-1 in den 12Z-Zellen veränderte die Expressionsstärke von HDAC1 und HDAC2 nicht. Pro Zelllinie wurden 30 µg Proteinlysate eingesetzt und der Nachweis von GAPDH diente als Ladekontrolle. Rechts neben dem Blot sind die molekulare Masse der jeweiligen Proteine angegeben. (b) Densitometrische Auswertung der HDAC1- und HDAC2-Expression in den 12Z-Zellen bezogen auf die GAPDH-Expression. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (HDAC1, n = 3) bzw. die Standardabweichung (HDAC2, n = 2). Mit Antikörpern gegen (c) HDAC1 (10E2) und (d) HDAC2 wurden ChIP-Analysen durchgeführt. In anschließenden qPCRs zeigte sich, dass sowohl HDAC1 als auch HDAC2 nach der Herunterregulation von Shrew-1 weniger mit der Promotorregion von CDH1 assoziiert sind als in den Kontrollzellen (SEW). Jede qPCR-Reaktion wurde als Duplikat durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives von vier (HDAC1) bzw. fünf (HDAC2) unabhängigen Experimenten. In den qPCRs wurden die Primer-Sets ChIP_CDH1_3 (HDAC1) bzw. ChIP_CDH1_1 (HDAC2) verwendet. Weitere ChIP-Ergebnisse befinden sich im Anhang (Abbildung 10.4 e bis h).

Obwohl die Expressionstärke von HDAC1 und HDAC2 in Abhängigkeit der Shrew-1-Expression nicht verändert war, könnte deren Assoziierung mit der Promotorregion von CDH1 verändert sein und somit einen Einfluss auf die Expression von E-Cadherin nehmen. In ChIP-Analysen zeigte sich, dass die Interaktion von HDAC1 mit der Promotorregion von CDH1 in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen deutlich vermindert ist (Abbildung 4.16 c und Anhang, Abbildung 10.4 e und f). Auch HDAC2 ist vermindert mit dem CDH1-Promotor assoziiert, jedoch zu einem geringeren Ausmaß als HDAC1 (Abbildung 4.16 d und Anhang, Abbildung 10.4 g und h). Da diese beiden HDACs somit vermindert mit der Position assoziiert sind, an der sie ihre Aktivität ausüben können, kann es auf diesem Wege zu einer Anreicherung von Histonacetylierungen im Bereich des CDH1-Promotors kommen, wie in der ChIP gegen die Histon-Modifikation H3K9ac gezeigt wurde (Abbildung 4.15 b). Um zu zeigen, ob tatsächlich HDACs für die

gesteigerte H3K9-Acetylierung verantwortlich sind, wurden 12Z-Zellen mit TSA behandelt und ChIPs gegen die Modifikation H3K9ac durchgeführt. Es ist erkennbar, dass eine Inhibierung der HDACs zu einer Erhöhung der H3K9-Acetylierung am CDH1-Promotor führt, auch wenn der Effekt in diesem Fall nicht stark ist (Abbildung 4.17 und Anhang, Abbildung 10.5).

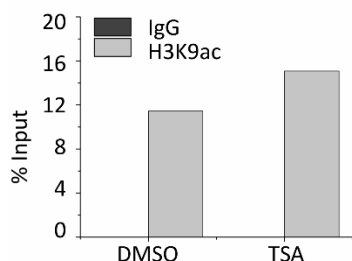


Abbildung 4.17: TSA verminderte H3K9-Acetylierung in 12Z-Zellen

12Z-Zellen wurden für 24 Stunden mit 0,5 μ M TSA oder DMSO behandelt. Anschließend wurden ChIP-Experimente gegen die Histon-Modifikation H3K9ac durchgeführt. Die CDH1-Promotor-Region ist bei Stimulation der 12Z-Zellen mit TSA, wie bei einer Herunterregulation von Shrew-1, stärker mit der Modifikation H3K9ac assoziiert als in den Kontrollzellen (DMSO). Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten. In den qPCRs wurden das Primer-Set CHIP_CDH1_3 verwendet.

Um zu überprüfen, ob HDAC1 und HDAC2 gemeinsam an der Regulation der E-Cadherin-Expression in den 12Zellen verantwortlich sein könnten, wurden Co-Immünpräzipitations-Versuche durchgeführt. In den 12Z-Kontrollzellen (SEW) präzipitierten sich HDAC1 und HDAC2 zu einem geringeren Maße gegenseitig (Abbildung 4.18 a, Spur 5 und 6). In den 12Z Shrew-1 KD-Zellen war diese gegenseitige Präzipitation weiter vermindert (Abbildung 4.18 b, Spur 5 und 6). Eine verminderte Interaktion von HDAC1 und HDAC2 könnte vorallem in Promotorbereichen auftreten, z. B. dem CDH1-Promotor.

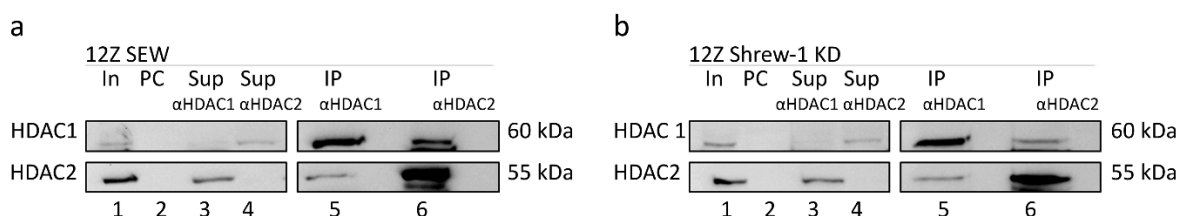


Abbildung 4.18: Verminderte Interaktion von HDAC1 und HDAC2 durch die Herunterregulation von Shrew-1

In Co-Immünpräzipitations-Versuchen gegen HDAC1 (10E2, Santa Cruz) und HDAC2 (HDAC2-62, Abcam) konnte in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen (b) jeweils eine geringere gegenseitige Bindung festgestellt werden (IP, Spur 5 und 6) im Vergleich zu den Kontrollzellen (a, SEW). Die Effizienz der Präzipitation war jeweils gegeben, da keines der präzipitierten Proteine im Überstand (Sup) detektiert werden konnte. Unspezifische Bindungen können anhand des Pre-Clearings (PC) ausgeschlossen werden. Rechts neben den Blots sind die molekularen Massen der jeweiligen Proteine angegeben. In = Input. n = 2 (HDAC1) bzw. 1 (HDAC2).

4.3.7 Einfluss der Herunterregulation von Shrew-1 auf den Wnt-Signalweg

Eine weitere denkbare Möglichkeit der Regulation der E-Cadherin-Expression in den 12Z-Zellen ist eine Beteiligung des Wnt-Signalweges, da bekannt ist, dass die Aktivierung des Wnt-Signalweges die Expression von E-Cadherin inhibieren kann (Orsulic *et al.*, 1999; Gottardi *et al.*, 2001; Conacci-Sorrell *et al.*, 2003; Howe *et al.*, 2003; Nelson & Nusse, 2004; Yook *et al.*, 2005; Peinado *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2012). β -Catenin spielt eine zentrale Rolle im Wnt-Signalweg und kann ebenfalls eine direkte Interaktion mit Shrew-1 eingehen (Bharti *et al.*, 2004). Eine reduzierte Expression von Shrew-1, wie nach der lentiviralen Herunterregulation in den 12Z-Zellen, führt möglicherweise zu einem Anstieg von freiem cytosolischem β -Catenin, welches in den Nukleus gelangen und dort zur Transkription Wnt-regulierter Gene führen kann. Dieser Zusammenhang konnte für β -Catenin und E-Cadherin in der kolorektalen Tumorzelllinie SW480 gezeigt werden (Orsulic *et al.*, 1999; Gottardi *et al.*, 2001). Ein Hinweis auf die Beteiligung des Wnt-Signalweges wäre somit eine veränderte Lokalisation von cytosolischem β -Catenin in den verschiedenen 12Z-Zelllinien. Wie bereits in Abbildung 4.6 zu sehen ist, ändert sich die Lokalisation von β -Catenin in den 12Z-Zellen nicht durch die Herunterregulation von Shrew-1.

In der parentalen Zelllinie 12Z, die Shrew-1 exprimiert jedoch kein E-Cadherin (Zeitvogel *et al.*, 2001; Diplomarbeit Paul, 2010), würde man erwarten, dass es zu einer erneuten E-Cadherin-Expression kommt, wenn die Zellen mit einem Wnt-Signalweg-Inhibitor behandelt werden. Nach der Behandlung mit XAV939, welches Axin stabilisiert und somit den Abbau von β -Catenin fördert, was zu einer Inhibierung des Wnt-Signalweges führt, konnte in den 12Z-Zellen keine Expression von E-Cadherin beobachtet werden (Abbildung 4.19 a, Spur 1 bis 3). Auch die Expressionstärke von β -Catenin wird nicht verändert. Die Stimulation mit Lithiumchlorid (LiCl), welches die GSK3 β inhibiert und somit den Wnt-Signalweg aktiviert, führte in den 12Z-Zellen wiederum zur Expression von E-Cadherin (Abbildung 4.19 b, Spur 2 und 3). Die Aktivierung des Wnt-Signalweges scheint somit in diesem zellulären Kontext die Expression von E-Cadherin zu fördern. Der Grund der nicht vorhandenen E-Cadherin-Expression in den 12Z-Zellen kann somit möglicherweise an einem inaktiven Wnt-Signalweg liegen, was durch einen Effekt von Shrew-1 auf β -Catenin denkbar ist.

Um dies zu testen, wurde der Wnt-Signalweg-Aktivator SB216763 eingesetzt, der die GSK3 β inhibiert. In den 12Z-Kontrollzellen (SEW) führte die Behandlung mit SB216763 zur Expression von E-Cadherin (Abbildung 4.19 c, Spur 2) und in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen wurde dessen Expression verstärkt (Abbildung 4.19 c, Spur 8). Die Inhibierung des Wnt-Signalweges mit XAV939 hatte in den 12Z SEW Zellen keinen Einfluss auf die E-Cadherin-Expression (Abbildung 4.19 c, Spur 4), wohingegen in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen eine verminderte Expression beobachtet werden konnte (Abbildung 4.19 c, Spur 10). Für die Versuche wurde eine XAV939-Konzentration von 1 μ M verwendet, da sich die 12Z-Zellen

bei der höheren Dosis (3 μM) bei längerer Stimulation (über 24 Stunden) von der Zellkulturschale ablösen. Bei zeitgleicher Stimulation von SB216763 und XAV939 kann in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen E-Cadherin detektiert werden (Abbildung E18 c, Spur 12). Die Expression ist stärker als in der Lösungsmittelkontrolle (Abbildung E18 c, Spur 13), jedoch schwächer als bei der Simulation mit SB216763 alleine (Spur 8). Auch in den Kontrollzellen (SEW) ist bei Stimulation mit SB216763 und XAV939 eine schwache E-Cadherin Bande nachweisbar. Ein Einfluss auf die Expressionsstärke von β -Catenin konnte nicht gezeigt werden. Die Expression von E-Cadherin könnte in den 12Z-Zellen somit teilweise auch über eine Beteiligung des Wnt-Signalweges beeinflusst zu werden.

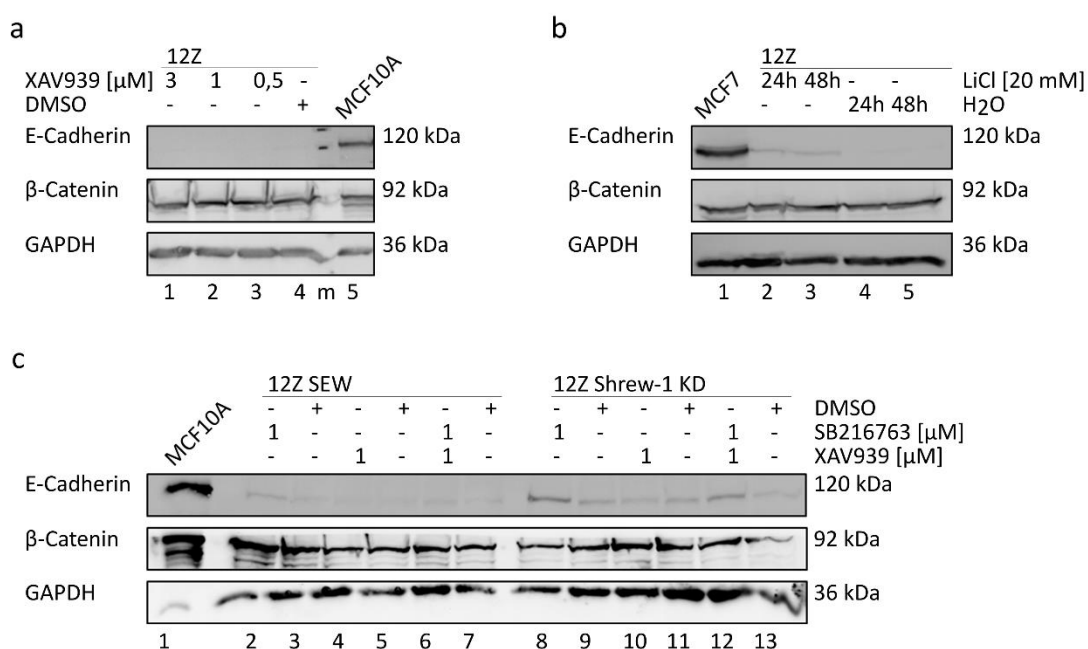


Abbildung 4.19 Einfluss des Wnt-Signalweges auf die E-Cadherin-Expression in 12Z-Zellen

(a) 12Z-Zellen wurden für 24 Stunden mit XAV939 in DMSO in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO alleine (Volumen, wie bei höchster eingesetzter XAV939 Konzentration) stimuliert, bevor die Zellen lysiert wurden. Durch die pharmakologische Inhibierung des Wnt-Signalweges wird in den 12Z-Zellen keine E-Cadherin-Expression induziert (Spur 1 bis 3). Die Proteinmenge von β -Catenin wird durch die Behandlung nicht verändert. MCF10A-Zellen (20 μg) dienen als Positivkontrolle für die E-Cadherin-Expression (Spur 5). $n = 4$. (b) Stimulation der 12Z-Zellen mit 20 mM LiCl in H₂O oder H₂O alleine für 24 und 48 Stunden. LiCl inhibiert die GSK3 β und führte in den 12Z-Zellen zur Expression von E-Cadherin (Spur 2 und 3). Die Expressionsstärke von β -Catenin wurde durch LiCl nicht verändert. MCF7-Zellen dienen als Positivkontrolle für die E-Cadherin-Expression (Spur 1). $n = 3$ (c) Die Inhibierung der GSK3 β mit SB216763 (24 Stunden) führt in den 12Z-Kontrollzellen (SEW) zur Expression von E-Cadherin (Spur 2) und verstärkt diese in der 12Z Shrew-1 KD-Zellen (Spur 8). Die Behandlung mit XAV939 (24 Stunden) vermindert die E-Cadherin-Expression der 12Z Shrew-1 KD-Zellen (Spur 10). MCF10A-Zellen (20 μg) dienen als Positivkontrolle für die E-Cadherin-Expression (Spur 1). $n = 1$. Pro Probe wurden 30 μg Protein geladen. Der Nachweis von GAPDH diente als Ladekontrolle. Rechts neben den Blots sind die molekularen Massen der nachgewiesenen Proteine angegeben. m = Proteinleiter.

5 Diskussion

Shrew-1 wurde im Kontext der Erkrankung Endometriose entdeckt, wobei die Expression von Shrew-1 auf mRNA-Ebene in einer invasiven Passage der Zelllinie EEC145T detektiert wurde (Bharti *et al.*, 2004). In einer späteren, nicht mehr invasiven Passage dieser Zelllinie konnte die Shrew-1-mRNA nicht nachgewiesen werden, was auf einen Invasions-fördernden Effekt von Shrew-1 hinweist. In Endometriose-Läsionen aus dem Myometrium konnte in einigen epithelialen Zellen eine erhöhte Shrew-1-Expression detektiert werden (Dr. Petra Bernardi, persönliche Kommunikation). Diesen Zellen fehlt die Expression von E-Cadherin, aufgrund dessen vermutet wird, dass diese Zellen an der Pathogenese der Endometriose beteiligt sind (Starzinski-Powitz *et al.*, 2001). In endometrialen (Lai *et al.*, 2014) und cervicalen Karzinomen (Chen *et al.*, 2014) konnte eine Hypermethylierung des Shrew-1 Promotors gezeigt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine veränderte Expression von Shrew-1 und E-Cadherin im Kontext gynäkologischer Erkrankungen relevant ist.

In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass exogen exprimiertes Shrew-1 einen fördernden Einfluss auf das motile und invasive Verhalten von HT1080 Fibrosarkom- und MCF7-Zellen nimmt und einen modulatorischen Effekt auf die EGF-induzierte Internalisierung von E-Cadherin in MCF7-Zellen hat (Schreiner *et al.*, 2007; Gross *et al.*, 2009). In den 12Z-Zellen konnte ebenfalls ein Zusammenhang der Shrew-1-Expression und der Motilität und Invasivität gezeigt werden (Diplomarbeit Paul, 2010). Die Zelllinie 12Z wurde aus epithelialen Zellen einer aktiven Endometriose-Läsion generiert, die jedoch kein E-Cadherin exprimierten (Zeitvogel *et al.*, 2001). Diese Zellen zeigen *in vitro* ein invasives Verhalten (Gaetje *et al.*, 1997; Starzinski-Powitz *et al.*, 2001; Zeitvogel *et al.*, 2001), was durch die fehlende E-Cadherin-Expression erklärt werden kann (Frixen *et al.*, 1991; Vleminckx *et al.*, 1991). Nach der Herunterregulation von Shrew-1 in 12Z-Zellen konnte die Expression von E-Cadherin auf Protein-Ebene nachgewiesen werden (Diplomarbeit Paul, 2010). In 12Z-Zellen besteht somit, wie in epithelialen, E-Cadherin-negativen Zellen aus Adenomyose-Läsionen (Dr. Petra Bernardi, persönliche Kommunikation), ein inverser Zusammenhang der Expression von Shrew-1 und E-Cadherin. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, auf welche Weise Shrew-1 Einfluss auf die Expression von E-Cadherin in den 12Z-Zellen nimmt.

5.1 Reexpression von E-Cadherin durch die Herunterregulation von Shrew-1

Vor der Herunterregulation von Shrew-1 wurde dessen endogene Expression in 12Z-Zellen auf mRNA-Ebene sichergestellt (Abbildung 4.1 a). Auf Protein-Ebene war dieser Nachweis nicht möglich, da kein Antikörper gegen Shrew-1 verfügbar ist, der endogen exprimiertes Shrew-1 in den 12Z-Zellen und vielen weiteren humanen Zellkulturmodellen detektiert (Schreiner *et al.*, 2007). In HUVEC-Zellen kann Shrew-1 jedoch auf Protein-Ebene detektiert werden (Masterarbeit Hötte, 2014). Bei HUVEC-Zellen handelt es sich um primäre humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene, die *in vitro* kultiviert werden. In Gewebeschnitten aus humanem Endometrium und Adenomyose-Biopsien konnte die Expression von Shrew-1 in luminalen bzw. glandulären Epithelzellen ebenfalls gezeigt werden (Jakob *et al.*, 2006) (Dr. Petra Bernardi, persönliche Kommunikation). Dies lässt vermuten, dass die verfügbaren Antikörper gegen Shrew-1 in *in vitro* Modellen immer weniger effizient binden, je weiter das Modell von dessen physiologischem Ursprung entfernt ist. Es ist somit anzunehmen, dass die Expression von Shrew-1 auf Protein-Ebene in den 12Z-Zellen, obwohl sie nicht gezeigt werden kann, erfolgt.

Aufgrund des Einflusses von Shrew-1 auf die Internalisierung von E-Cadherin wurde die E-Cadherin-Expression in Abhängigkeit der Shrew-1-Expression in 12Z-Zellen bereits getestet. Dabei zeigte sich, dass die Expression von E-Cadherin auf Protein-Ebene in den 12Z-Zellen nach der Herunterregulation von Shrew-1 detektierbar ist (Diplomarbeit Paul, 2010). In drei weiteren, unabhängig generierten 12Z Shrew-1 KD-Zelllinien konnte die Expression von E-Cadherin ebenfalls gezeigt werden (Abbildung 4.2). In einer weiteren epithelialen Endometriose-Zelllinie (49Z) ist dieser Effekt ebenso nachweisbar (Abbildung 4.3). Diese Zelllinie wurde wie die Zelllinie 12Z aus E-Cadherin-negativen Epithelzellen einer aktiven Endometriose-Läsion generiert und weist *in vitro* einen invasiven Phänotyp auf (Zeitvogel *et al.*, 2001). In den verwendeten stromalen Endometriose-Zelllinien (17B, 18B und 22B) induzierte die Herunterregulation von Shrew-1 keine E-Cadherin-Expression (Abbildung 4.3). In der stromalen Zelllinie 17B konnte in einer der zwei generierten Shrew-1 KD-Zelllinien eine schwache E-Cadherin-Expression nachgewiesen werden. Die E-Cadherin-Expression ist in stromalen Zellen gewöhnlich nicht vorhanden (Gaetje *et al.*, 1997; Zeitvogel *et al.*, 2001). Das E-Cadherin-Gen (CDH1) ist jedoch weiterhin vorhanden, wodurch eine Expression grundsätzlich möglich ist. Durch die Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor TSA konnte in der stromalen Zelllinie 22B die E-Cadherin-Expression auf mRNA-, jedoch nicht auf Protein-Ebene induziert werden ((Wu *et al.*, 2007a) und Abbildung 4.13). Eine Induktion der E-Cadherin-Expression ist somit unter gewissen Umständen, wie auch der Herunterregulation von Shrew-1, denkbar.

Der Einfluss von Shrew-1 auf die Expression von E-Cadherin scheint jedoch in epithelialen Zellen aus Endometriose-Läsionen oder dem Endometrium zu kommen. Eine entscheidende Beobachtung ist dabei, dass in den Epithelzellen des Endometriums eine moderate Expression von Shrew-1 vorhanden ist (Dr. Petra Bernardi, persönliche Kommunikation). Diese Zellen exprimieren E-Cadherin in einem hohen Maß. In passenden Endometriose-Läsionen aus dem Myometrium (Adenomyose) sind diese Zellen ebenfalls vorhanden. Jedoch gibt es weitere epitheliale Zellen, die durch die Abwesenheit von E-Cadherin gekennzeichnet sind. In diesen Zellen ist die Expression von Shrew-1 verstärkt (Dr. Petra Bernardi, persönliche Kommunikation). Dies deutet darauf hin, dass der Zusammenhang in der Expression von Shrew-1 und E-Cadherin auch *in vivo* relevant ist. Epitheliale Zellen, die kein E-Cadherin exprimieren, werden regelmäßig in Endometriose-Biopsien detektiert (Gaetje *et al.*, 1997; Zeitvogel *et al.*, 2001; Bartley *et al.*, 2014). Es wird vermutet, dass diese Zellen eine Dedifferenzierung durchlaufen und bei der Entstehung von Läsionen eine zentrale Rolle spielen (Starzinski-Powitz *et al.*, 2001; Matsuzaki & Darcha, 2012). Im Endometrium exprimieren alle Epithelzellen E-Cadherin, wobei die Expression bei Frauen mit Endometriose vermindert sein kann (van der Linden *et al.*, 1994; Béliard *et al.*, 1997; Scotti *et al.*, 2000). Im Menstruationsblut von Frauen mit und ohne Endometriose können in ca. 38 % der Proben epitheliale Zellen nachgewiesen werden, die kein E-Cadherin exprimieren (van der Linden *et al.*, 1994). In der Peritonealflüssigkeit konnten in einer von acht untersuchten Proben von Endometriose-Patientinnen epitheliale Zellen, die E-Cadherin exprimieren, beobachtet werden (van der Linden *et al.*, 1994). In der Peritonealflüssigkeit von gesunden Frauen wurden solche Zellen nicht nachgewiesen. Daher wird davon ausgegangen, dass E-Cadherin temporär herunterreguliert wird und im Falle der Bildung von Läsionen reexprimiert werden kann (van der Linden *et al.*, 1994; Starzinski-Powitz *et al.*, 2001). Dafür spricht, dass der Hauptteil der epithelialen Zellen in Läsionen E-Cadherin exprimieren (van der Linden *et al.*, 1994; Béliard *et al.*, 1997; Gaetje *et al.*, 1997; Bartley *et al.*, 2014). Durch die fehlende Expression von E-Cadherin stellen die epithelialen 12Z-Zellen genau diesen partiell dedifferenzierten Zelltyp dar, von dem angenommen wird, dass er für die Bildung von Endometriose-Läsionen verantwortlich sein könnte (Starzinski-Powitz *et al.*, 2001). Durch die Herunterregulation von Shrew-1 wird die Expression von E-Cadherin in den 12Z-Zellen induziert (Abbildung 4.2 und 4.4), wodurch sie, in Bezug auf die E-Cadherin-Expression, dem Hauptteil der Epithelzellen in Endometriose-Läsionen gleichen. Eine Veränderung der Shrew-1-Expression in endometrialen Zellen könnte durch die Methylierung des Shrew-1 Promotors erfolgen. Eine Hypermethylierung des Shrew-1 Promotors konnte in endometrialen (Lai *et al.*, 2014) und cervicalen Karzinomen (Chen *et al.*, 2014) gezeigt werden. In Oligodendrogliomen und Glioblastomen konnte die Hypermethylierung des Shrew-1 Promotors ebenfalls identifiziert werden (Cogdell *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2012). In Neuroblastomen (White *et al.*, 2005; Okawa *et al.*, 2008), Oligodendrogliomen (McDonald *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2011), Ependymomen (Milde *et al.*, 2009) und Glioblastomen (Lin

et al., 2012) ist Shrew-1 häufig deletiert. In Gliomen konnte gezeigt werden, dass die Verminderung der Shrew-1-Expression zu Beginn der Gliomagenese stattzufinden scheint (Han *et al.*, 2014). Der Verlust der Shrew-1-Expression in malignen Gliomen geht einher mit einer geringen Lebenserwartung von Patienten, weswegen ihm eine Rolle als Tumorsuppressor zugesagt wird (Zeng *et al.*, 2014). Im neuronalen Kontext scheint Shrew-1 somit eine protektive Wirkung zu haben, während es im Zusammenhang der Endometriose mit invasivem Verhalten assoziiert ist (Bharti *et al.*, 2004).

Das Endometrium geht während der Entwicklung des Urogenitalsystems aus dem Mesoderm hervor (Acloque *et al.*, 2009). Die Epithelzellen des Endometriums durchlaufen somit eine mesenchymal-epitheliale Transition (MET) bevor sie ein sekundäres Epithel bilden (Acloque *et al.*, 2009; Kalluri & Weinberg, 2009; Zeisberg & Neilson, 2009). Daher wird angenommen, dass diese Zellen die Fähigkeit besitzen, einfacher von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp überzugehen (Matsuzaki & Darcha, 2012). In epithelialen Zellen roter peritonealer und ovarialer Läsionen konnte gezeigt werden, dass weniger Cytokeratin exprimiert wird (Matsuzaki & Darcha, 2012). Dafür war die Expression mesenchymaler Marker (Vimentin und S100A4) im Vergleich zu eutopem Endometrium erhöht. Die 12Z-Zellen, die aus epithelialen Zellen einer roten Läsionen generiert wurden, exprimieren Cytokeratin, zeigen jedoch durch die Expression von Vimentin und N-Cadherin sowie das Fehlen der E-Cadherin-Expression ebenfalls mesenchymale Tendenzen (Zeitvogel *et al.*, 2001). Epitheliale Zellen in schwarzen und tiefinfiltrierenden Läsionen zeigen eine verstärkte E-Cadherin-Expression im Vergleich zum Endometrium, roten peritonealen und ovarialen Läsionen, exprimieren jedoch weiterhin mesenchymale Marker (Matsuzaki & Darcha, 2012). Matsuzaki und Darcha kommen daher zu der Annahme, dass epitheliale Endometriose-Zellen einen EMT-ähnlichen Prozess durchlaufen, während sie sich oberflächlich an das Peritoneum anhaften und rote Läsionen bilden. Nach dem Einwandern in das Peritoneum könnten MET-ähnliche Prozesse ablaufen, die zu schwarzen und tiefinfiltrierenden Läsionen führen (Matsuzaki & Darcha, 2012) (Abbildung 5.1). Diesen Zustand könnten die 12Z-Zellen durch die Expression von E-Cadherin nach der Herunterregulation von Shrew-1 darstellen (Abbildung 4.2 und Abbildung 5.1).

In 12Z-Zellen scheint die Herunterregulation von Shrew-1 jedoch keine vollständigen EMT- oder MET-Prozesse zu induzieren, da die Expressionsstärke mesenchymaler Marker (N-Cadherin und Vimentin) sowie des epithelialen Markers Keratin 8 durch die Herunterregulation von Shrew-1 nicht verändert wurde (Abbildung 4.2). Andere konnten jedoch Veränderungen in der Expression von N-Cadherin im Kontext der Endometriose feststellen. Während Matsuzaki und Darcha einen leichten Anstieg der N-Cadherin-Expression in epithelialen Endometriose-Zellen zeigen konnten, fanden van Patten *et al.* eine verminderte N-Cadherin-Expression (Van Patten *et al.*, 2010; Matsuzaki & Darcha, 2012). In Adenomyose-Biopsien konnte eine Hochregulation von Vimentin und eine verminderte Expression von

E-Cadherin detektiert werden (Chen *et al.*, 2010). Dabei zeigte sich eine negative Korrelation des Estradiol-Levels im Serum und der Expression von E-Cadherin, aufgrund dessen die Autoren davon ausgehen, dass Estrogen-induzierte EMT-Prozesse in den epithelialen Zellen des Endometriums ablaufen und diese zur Entstehung von Adenomyose-Läsionen beitragen könnte (Chen *et al.*, 2010). Weiterhin konnte eine HGF- und Estradiol-induzierte EMT in epithelialen Endometriose-Zellen *in vitro* festgestellt werden (Khan *et al.*, 2014). Neben der verminderten Expression von E-Cadherin, kam es zu einer verstärkten Expression der mesenchymalen Marker N-Cadherin, Snail und Slug.

Während der retrograden Menstruation gelangen endometriale Zellen in die Bauchhöhle und es wird angenommen, dass diese Zellen für die Bildung von Endometriose-Läsionen verantwortlich sind (Sampson, 1927; Signorile & Baldi, 2010; Hickey *et al.*, 2014). Dieser Vorgang scheint ein völlig gewöhnlicher Prozess zu sein. Bei Frauen, die Endometriose entwickeln, wird vermutet, dass der Reflux Zellen enthält, welche im Bauchraum die Fähigkeit besitzen, zu überleben und sich anzuhafte. Es wird vermutet, dass dies mit einer temporären Dedifferenzierung epithelialer Zellen zusammen hängt (van der Linden *et al.*, 1994; Starzinski-Powitz *et al.*, 2001; Matsuzaki & Darcha, 2012). Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass im *Stratum basale* epitheliale Zellen mit Stammzellcharakter identifiziert werden konnten (Gargett *et al.*, 2009; Gargett & Masuda, 2010; Masuda *et al.*, 2010). Jedoch wurde ebenfalls beobachtet, dass das Endometrium von Frauen, die an Endometriose leiden, grundsätzlich Veränderungen aufweist, welche die Entstehung von Läsionen begünstigen könnten. Hierzu zählen Veränderungen in apoptotischen Vorgängen, Angiogenese und Veränderungen des Immunsystems (Taylor *et al.*, 1997; Meresman *et al.*, 2000; Dmowski *et al.*, 2001; Lebovic *et al.*, 2001; Berkkanoglu & Arici, 2003; Agic *et al.*, 2009).

Ein entscheidendes Protein bei der Bildung von Endometriose-Läsionen scheint das Adhäsionsprotein E-Cadherin zu sein. Im Kontext von Krebserkrankungen spielt E-Cadherin eine entscheidende Rolle, wobei ein Verlust der Expression von E-Cadherin mit der Metastasierung von epithelialen Krebszellen assoziiert ist (Canel *et al.*, 2013). E-Cadherin wird in epithelialen Zellen, jedoch nicht in stromalen oder endothelialen Zellen des Endometriums exprimiert (van der Linden *et al.*, 1994; Gaetje *et al.*, 1997). Im Endometrium von Frauen mit Endometriose wurde eine generell verminderte E-Cadherin-Expression detektiert und auch einzelne epitheliale Zellen, denen die E-Cadherin-Expression vollständig fehlt (Béliard *et al.*, 1997; Gaetje *et al.*, 1997; Scotti *et al.*, 2000; Bartley *et al.*, 2014). Scotti *et al.* konnten eine starke E-Cadherin-Expression in eutopem Endometrium von gesunden Frauen feststellen (Scotti *et al.*, 2000). Diese Expression ist im Endometrium von Frauen mit Endometriose schwächer. In wenigen Biopsien aus dem Endometrium von Endometriose-Patientinnen konnte keine E-Cadherin-Expression detektiert werden. In ektopem Endometrium ist die E-Cadherin Expression nur schwach oder nicht vorhanden (Scotti *et al.*, 2000). Van der Linden *et al.* konnten in einigen Biopsien

ausschließlich Zellen ohne E-Cadherin-Expression detektieren, während sie in den meisten Läsionen keine veränderte Expression im Vergleich zu normalem Endometrium feststellen konnten (van der Linden *et al.*, 1994). Dies wird durch die Ergebnisse von Béliard *et al.* bestätigt (Béliard *et al.*, 1997). Anderen gelang es, einzelne E-Cadherin-negative epitheliale Zellen in Endometriose-Läsionen zu detektieren (Gaetje *et al.*, 1997; Scotti *et al.*, 2000; Bartley *et al.*, 2014). Microarray-Analysen zeigen, dass E-Cadherin im ektopen Endometrium vermindert exprimiert wird (Eyster *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression von E-Cadherin bei der Ätiologie und Pathogenese der Endometriose bedeutend ist. Es gibt jedoch auch Studien, in denen keine Veränderung der E-Cadherin-Expression im Vergleich zum Endometrium von gesunden Frauen gefunden werden konnte (Shaco-Levy *et al.*, 2008).

Eine verminderte E-Cadherin-Expression würde die Vermutung von dedifferenzierten Zellen als Ursache der Endometriose bekräftigen und auch die These der Beteiligung von endometrialen Stammzellen unterstützen. Eine temporäre Dedifferenzierung epithelialer Zellen untermauert auch die These von Matsuzaki und Darcha, die eine Beteiligung von EMT- und MET-Prozesse bei der Entwicklung persistierender Endometriose-Läsionen vermuten (Matsuzaki & Darcha, 2012). Diese Theorie ist mit der Stammzelltheorie vereinbar. Die dedifferenzierten Zellen oder Zellen mit Stammzell-Charakteristika könnten in der Bauchhöhle überleben, sich oberflächlich an das Peritoneum anhaften und sich dort zu vollständig differenzierten epithelialen Zellen entwickeln (Starzinski-Powitz *et al.*, 2001; Maruyama & Yoshimura, 2012; Gargett *et al.*, 2014). Durch seinen Einfluss auf die E-Cadherin-Expression in 12Z-Zellen ist es möglich, dass Shrew-1 eine zentrale Rolle bei der Dedifferenzierung endometrialer Epithelzellen einnimmt und so Einfluss auf die Entwicklung von Endometriose-Läsionen nehmen kann.

Im Endometrium konnten epitheliale und stromale Zellen mit Stammzell-Charakter identifiziert werden (Gargett *et al.*, 2009; Gargett & Masuda, 2010). Die Lokalisation der stromalen Stammzell-ähnlichen Zellen wird im *Stratum basale* und *Stratum funktionale* angenommen, während die epithelialen Vorläuferzellen im *Stratum basale* am Grund der Drüsen vermutet werden (Gargett *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte eine Zellpopulation identifiziert werden, die endotheliale Marker exprimiert und sich *in vitro* in endometriale Epithel-, Stroma- und Endothelzellen differenzieren lässt (Masuda *et al.*, 2010). Diese Zellen waren *in vivo* in der Lage glanduläre Strukturen zu bilden. In Endometriose-Biopsien konnte gezeigt werden, dass die Expression der Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog, welche Marker für die Pluripotenz von Zellen sind, im Vergleich zum Endometrium erhöht ist (Chang *et al.*, 2013). Die Überexpression von Oct4 in Stromazellen aus Endometriose-Läsionen führte zu einer verstärkten Expression der mesenchymalen Marker Vimentin, Twist, Snail, Slug und N-Cadherin. Es wird angenommen, dass endometriale Stammzellen maßgeblich an der Regeneration des

Endometriums nach der Menstruation beteiligt sind und auch bei der Entwicklung der Endometriose eine Rolle spielen, wenn sie über den Vorgang der retrograden Menstruation in die Bauchhöhle gelangen (Gargett & Masuda, 2010; Maruyama & Yoshimura, 2012).

5.2 Das verminderte motile und invasive Verhalten der 12Z Shrew-1 KD-Zellen resultiert aus der Reexpression von E-Cadherin

Im Kontext der 12Z Shrew-1 KD-Zellen war entscheidend, dass das reexprimierte E-Cadherin an der Plasmamembran lokalisiert (Abbildung 4.4), und im Adhärenzkomplex mit β -Catenin vorhanden ist (Abbildung 4.5). Somit ist E-Cadherin in der Lage, seine adhäsive Funktion in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen auszuüben und so auf den motilen und invasiven Charakter der Zellen einzuwirken. Dies wurde mittels Transwell-Migrations-Versuchen überprüft, in denen ein verminderter Anteil motiler Zellen nach der Herunterregulation von Shrew-1 im Vergleich zu den 12Z-Kontrollzellen detektiert werden konnte (Abbildung 4.8). Diese reduzierte Motilität wurde zuvor in einem anderen Versuchsansatz gezeigt (*in vitro* Scratch-Analyse, (Diplomarbeit Paul, 2010)). Durch die funktionelle Inhibierung der adhäsiven Funktion von E-Cadherin durch den Antikörper DECMA1 konnte die Motilität der 12Z Shrew-1 KD-Zellen auf das Maß der 12Z-Kontrollzellen gesteigert werden (Abbildung 4.8 b). Dies bedeutet, dass die Reexpression von E-Cadherin für die verminderte Motilität der 12Z Shrew-1 KD-Zellen verantwortlich sein könnte. Auch das invasive Verhalten der 12Z-Zellen ist durch die Herunterregulation von Shrew-1 reduziert (Diplomarbeit Paul, 2010). Durch die funktionelle Blockierung von E-Cadherin (DECMA1) wird die Invasivität der 12Z Shrew-1 KD-Zellen jedoch nicht verstärkt (Abbildung 4.8 c), was darauf hinweist, dass für die verminderte Invasivität nicht alleine die Reexpression von E-Cadherin verantwortlich sein kann. Invasive Zellen besitzen die Fähigkeit, sich durch die extrazelluläre Matrix (EZM) zu bewegen, was vor allem durch deren Um- und/oder Abbau durch Matrix-Metalloproteasen (MMPs) geschieht. MMPs sind Endopeptidasen, die eine wichtige Rolle bei der Remodellierung der EZM spielen und im Falle von Tumorerkrankungen, Fibrosen und der Endometriose dereguliert sein können (Amălinei *et al.*, 2010). An der Abstoßung des *Stratum functionale* zu Beginn des Menstruationszyklus sind MMPs maßgeblich beteiligt. Ihre Expression wird durch die erhöhte Konzentration von Estrogenen in dieser Zyklusphase verstärkt (Hudelist *et al.*, 2005; Mihm *et al.*, 2011). Durch die Wirkung von Progesteron wird ihre Expression im Verlauf des Zyklus wieder vermindert. Im ektopen Endometrium konnte eine erhöhte Expression von MMP2 (Wenzl & Heinzl, 1998; Shaco-Levy *et al.*, 2008), MMP3 (Bruner-Tran *et al.*, 2002), MMP7 (Bruner-Tran *et al.*, 2002) und MMP9 (Chung *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Collette *et al.*, 2004, 2006; Shaco-Levy *et al.*, 2008) gefunden werden. Die Expression des MMP9-Inhibitors TIMP1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase 1*) ist im Vergleich zum Endometrium von gesunden Frauen nicht verändert (Collette *et al.*, 2006). TIMP3, welches ebenfalls die Aktivität von MMP9 hemmt, ist im

eutopen und ektopen Endometrium von Frauen mit Endometriose vermindert exprimiert (Chung *et al.*, 2001). In 12Z-Zellen werden MMPs, vor allem MMP1, 2 und 9, exprimiert und die Expression ist im Vergleich zu immortalisierten endometrialen Epithelzellen verstärkt (Banu *et al.*, 2008). Jedoch werden auch TIMPs verstärkt exprimiert (Banu *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression und Aktivität von MMPs im Kontext der Endometriose verändert sind, was zur Pathogenese dieser Erkrankung beitragen kann.

Besonders interessant ist die Tatsache, dass Shrew-1 ebenfalls an der Regulation von MMPs beteiligt ist. In der Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 wurde eine erhöhte proteolytische Aktivität von proMMP9 und MMP9 in Gelatine-Zymographien nach der Überexpression von Shrew-1 gezeigt (Schreiner *et al.*, 2007). Die Aktivität von MMP2 wird jedoch nicht verändert. Des Weiteren wurde eine Interaktion mit CD147, auch in Lysaten aus 12Z-Zellen, welche CD147 exprimieren (Lee *et al.*, 2013), gezeigt (Schreiner *et al.*, 2007). CD147 hat einen fördernden Einfluss auf die Aktivität und Sekretion von MMPs, wird in vielen Geweben exprimiert und scheint einen Einfluss bei Tumorerkrankungen zu haben (Xiong *et al.*, 2014). Im Falle der HT1080-Zellen führt die Überexpression von Shrew-1 zu einer Verstärkung der Invasivität (Schreiner *et al.*, 2007), was an der Wirkung von MMP9 liegen kann. In Epithelzellen einer Endometriose-Biopsie wurde ebenfalls ein positiver Zusammenhang zwischen der Shrew-1-Expression und invasiven Eigenschaften gezeigt. In einer frühen, invasiven Passage der Zelllinie EEC145T konnte die Expression von Shrew-1 auf RNA-Ebene nachgewiesen werden (Bharti *et al.*, 2004). In einer späteren Passage dieser Zellen verloren sie ihren invasiven Phänotyp und die Expression von Shrew-1 konnte nicht mehr gezeigt werden. Es kann vermutet werden, dass eine verminderte Expression von Shrew-1 einen negativen Effekt auf die Aktivität von MMPs hat, wobei eine fehlende Interaktion mit CD147 entscheidend sein könnte. Dies könnte ebenfalls eine Ursache des verminderten invasiven Charakters der 12Z Shrew-1 KD-Zellen sein. Vermutlich wirkt Shrew-1 darüber hinaus über weitere Mechanismen auf die Invasivität von Zellen. In HeLa Zellen konnte durch die Überexpression von Shrew-1 zwar deren Invasivität gefördert werden, jedoch wurde keine verstärkte MMP9 Aktivität beobachtet (Schreiner *et al.*, 2007).

5.3 Veränderte Vinculin-Lokalisation nach der Herunterregulation von Shrew-1

Das Aktinzytoskelett ist in die Migration von Zellen involviert. Durch die Polymerisation von Aktinfilamenten bilden sich Lamellipodien in Richtung der Zellbewegung, die über Fokalkontakte mit der EZM verbunden sind. Durch die Kontraktion von Aktinfilamenten mittels Myosin wird der Zellkörper nachgezogen (Wozniak *et al.*, 2004; Carisey & Ballestrem, 2011). In Epithelien können Aktinfilamente über Verbindungsproteine mit E-Cadherin assoziiert sein (Aberle *et al.*, 1994; Jou *et al.*, 1995; Hazan *et al.*, 1997; Gumbiner, 2005; van Roy & Berx, 2008). Daher lag die Vermutung nahe, dass das Aktinzytoskelett in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen aufgrund ihrer Reexpression von E-Cadherin und ihrer verminderten Motilität im Vergleich zu den 12Z-Kontrollzellen anders gestaltet ist. Eine Veränderung des Aktinzytoskeletts, welches in den 12Z-Zellen vorwiegend in Stressfasern organisiert ist, konnte jedoch nicht gezeigt werden (Abbildung 4.7). In Time-Lapse-Mikroskopie-Versuchen konnte gezeigt werden, dass Zellen, die in Glaskulturschalen kultiviert werden, ausgeprägte Aktin-Stressfasern bilden, wenn sie nicht motil sind und sich flach in der Kulturschale ausbreiten (Herman *et al.*, 1981; Walpita & Hay, 2002). Spindelförmige Zellen, die in den Aufnahmen Bewegungen zeigten, hatten keine Aktin-Stressfasern. Daher wird angenommen, dass 2D-Mikroskopie-Ansätze zur Untersuchung des Aktinzytoskeletts nicht aussagekräftig für die Situation in multizellulären Organismen sind und eine Kultivierung auf oder in Komponenten der ECM sinnvoller wären (Walpita & Hay, 2002; Pampaloni *et al.*, 2007).

In den 12Z Shrew-1 KD-Zellen wurde jedoch eine stärkere Vinculin-Färbung im Vergleich zu den 12Z-Kontrollzellen beobachtet. Diese zeigte sich im Bereich von Zellausstülpungen und Zell-Zell-Kontakten an den Enden von Aktin-Stressfasern (Abbildung 4.7). Vinculin spielt eine Rolle bei der Bildung von Fokalkontakten in Lamellipodien bei der Zellmigration (Wozniak *et al.*, 2004; Carisey & Ballestrem, 2011). In den 12Z Shrew-1 KD-Zellen ist die Motilität jedoch vermindert (Abbildung 4.8 a). Die Vinculin-Färbung ist hauptsächlich im Bereich der Zell-Zell-Kontakte sichtbar. Vinculin ist neben der Zell-Matrix-Verbindung auch an der Zell-Zell-Verbindung beteiligt und kann Teil der Adhärenzverbindung sein, wo es eine Verbindung zwischen α -Catenin und dem Aktinzytoskelett herstellen kann (Hazan *et al.*, 1997; Leerberg & Yap, 2013). Vinculin kann in der Adhärenzverbindung ebenfalls eine Bindung mit α -Actinin und β -Catenin eingehen (Hazan *et al.*, 1997; Leerberg & Yap, 2013). In epithelialen Zellen (MCF10A) konnte durch die Herunterregulation von Vinculin (Vinculin KD) eine veränderte Morphologie der Zellen und die Auflösung der Adhärenzverbindungen festgestellt werden (Peng *et al.*, 2010). Die β -Catenin-Färbung in MCF10A Vinculin KD-Zellen (Peng *et al.*, 2010) ähnelt der in den 12Z-Kontrollzellen (Mock und SEW) (Abbildung 4.6). Die Färbung von β -Catenin ist unregelmäßig und gezackt an der Plasmamembran lokalisiert. Peng *et al.* führen diese Beobachtung auf die Auflösung der Adhärenzverbindungen zurück (Peng *et al.*, 2010). In den MCF10A-Kontrollzellen ist β -Catenin an der

gesamten Plasmamembran regelmäßig lokalisiert (Peng *et al.*, 2010) und gleicht somit der β -Catenin-Färbung in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen. Vinculin ist sowohl in den MCF10A-Zellen (Peng *et al.*, 2010) als auch den 12Z Shrew-1 KD-Zellen (Abbildung 4.7) in punktartigen Anhäufungen an der Plasmamembran angeordnet. Die Herunterregulation von Vinculin in den MCF10A-Zellen führt zu einer verminderten E-Cadherin-vermittelten Adhäsion der Zellen und die Lokalisation von E-Cadherin an der Plasmamembran ist reduziert (Peng *et al.*, 2010). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Vinculin mit β -Catenin entscheidend für die E-Cadherin-Lokalisation an der Plasmamembran ist (Peng *et al.*, 2010). In murinen Sarkomzellen (S180), die E-Cadherin stabil überexprimieren, führt die Herunterregulation von Vinculin zur Verminderung der E-Cadherin-vermittelten Adhäsionsstärke (Thomas *et al.*, 2013). Die verstärkte Vinculin-Lokalisation im Bereich der Zell-Zell-Kontakte könnte in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen relevant für die Lokalisation von E-Cadherin an der Plasmamembran oder eine Folge der E-Cadherin-Expression sein.

In der murinen embryonalen Karzinom-Zelllinie WT F9 führt die Abwesenheit von Vinculin (Knockout) zu einer verstärkten Aktivität der *extracellular-signal regulated kinase 1/2* (ERK1/2) (Subauste *et al.*, 2004). Die Abwesenheit von Vinculin führte in diesen Zellen zu einem verstärkten motilen Verhalten. Dies ähnelt der Situation in den 12Z-Zellen. Die 12Z-Kontrollzellen zeigen in Immunfluoreszenzfärbungen von Vinculin eine schwächere Färbung im Vergleich zu den 12Z-Shrew-1 KD-Zellen (Abbildung 4.7) und verfügen über eine höhere Motilität (Abbildung 4.8 a). In der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie HSC-4 scheint die MT1-MMP (MMP14)-Expression über den MEK/ERK-Signalweg in der Abhängigkeit von Vinculin reguliert zu sein (Yoshimoto *et al.*, 2014). Die Herunterregulation von Vinculin führt zu einer verstärkten Expression von MT1-MMP, sowie einer verminderten Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion (Yoshimoto *et al.*, 2014). Des Weiteren wurde die Motilität der HSC-4-Zellen durch die Herunterregulation von Vinculin erhöht. In MCF7-Zellen führt die Überexpression von Shrew-1 zu einer erhöhten ERK1/2-Aktivität nach der Stimulation mit EGF oder DECMA1 (Gross *et al.*, 2009). Es ist somit möglich, dass Shrew-1 auch über Vinculin und den MEK/ERK-Signalweg einen Einfluss auf das motile Verhalten der 12Z-Zellen nehmen kann. Vinculin könnte in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion eine Rolle spielen und auf die Aktivität von MMPs wirken und so Einfluss auf deren Motilität und Invasivität nehmen. Ob die verstärkte Expression von Vinculin jedoch eine direkte Auswirkung der Shrew-1 Herunterregulation ist oder aufgrund der E-Cadherin-Reexpression erfolgt, bleibt offen und muss weiter untersucht werden.

5.4 Shrew-1 beeinflusst die E-Cadherin-Expression der 12Z-Zellen über epigenetische Mechanismen

In qPCRs konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation von Shrew-1 die E-Cadherin-Expression in 12Z-Zellen nicht nur auf Protein-Ebene, sondern bereits auf mRNA-Ebene beeinflusst (Abbildung 4.9). Dies legt eine Regulation der Expression auf Transkriptions-Ebene nahe, vor allem, da die Behandlung mit dem DNA-demethylierenden Agens 5-Azacytidin in den 12Z-Zellen ebenfalls zur E-Cadherin-Expression führte. In MSPs sowie Bisulfit-Sequenzierungen konnte die Regulation der E-Cadherin-Expression durch einen veränderten Methylierungsstatus des CDH1-Promotors durch die Herunterregulation von Shrew-1 jedoch nicht bestätigt werden (Abbildung 4.11 c und Anhang, Abbildung 10.3). Ein Teil der CDH1-Promotoren in den 12Z-Zelllinien sind jedoch methyliert und auf diese Weise von der Transkription ausgeschlossen. Die Behandlung mit 5-Azacytidin könnte auf diese methylierten Promotoren wirken, wodurch es zu einer geringen E-Cadherin-Expression kommt. Die unmethylierten und auch die methylierten CDH1-Promotoren sind vermutlich durch weitere Mechanismen von der Transkription ausgenommen.

Die Veränderung von Methylierungen in Promotoren spielt im Kontext der Endometriose jedoch durchaus eine Rolle. Veränderungen im Methylierungsstatus konnten in Promotoren des Progesterone Rezeptor B (Wu *et al.*, 2006), HOXA10 (Wu *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009), Estrogen Rezeptor 2 (Xue *et al.*, 2007a), Steroidogenic factor-1 (SF1) (Xue *et al.*, 2007b) und des Aromatase Gens (Izawa *et al.*, 2008) gezeigt werden. Die Behandlung mit TNF α führt in der immortalisierten epithelialen Endometriose-Zelllinie 11Z zur partiellen Methylierung der PR-B Promotors (Wu *et al.*, 2008). Dies lässt vermuten, dass inflammatorische Prozesse bei der Methylierung des PR-B Promotors eine Rolle spielen. Die Expression der DNMT1 ist im ektopen Endometrium im Vergleich zum eutopen Endometrium von Frauen mit und ohne Endometriose, zwischen denen es keine Unterschiede in der Expression gibt, erhöht (Wu *et al.*, 2007b). Die Expression von DNMT3A und DNMT3B ist in epithelialen Zellen aus Endometriose-Läsionen und eutopem Endometrium von Frauen mit Endometriose im Vergleich zu gesundem Endometrium erhöht, wobei die Expression im ektopem Endometrium weiter erhöht ist (Wu *et al.*, 2007b).

Eine Blockierung der E-Cadherin-Expression durch die an EMT-Prozessen beteiligten Repressoren der E-Cadherin-Transkription Snail, Slug, Twist und ZEB1 konnte ebenfalls ausgeschlossen werden (Abbildung 4.10). Diese Repressoren sind prominente Regulatoren der E-Cadherin-Expression und im Falle von Tumorerkrankungen (Batlle *et al.*, 2000; Cano *et al.*, 2000; Bolós *et al.*, 2002; Lombaerts *et al.*, 2006; Peinado *et al.*, 2007; Hasselblatt *et al.*, 2009), darunter auch endometriale Tumore (Panda *et al.*, 2012; Mirantes *et al.*, 2013), häufig verstärkt exprimiert. In den 12Z Shrew-1 KD-Zellen, die E-Cadherin exprimieren, würde man eine verminderte Expression der Repressoren erwarten. Dies war

jedoch nicht der Fall. Die mRNA-Expression von Snail und Twist blieb durch die Herunterregulation von Shrew-1 in den 12Z-Zellen unverändert, während die Expression von Slug und ZEB1 sogar erhöht war (Abbildung 4.10).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation der E-Cadherin-Expression ist die Modifikation von Histonen (von Burstin *et al.*, 2009; Jordaan *et al.*, 2013), welche Einfluss auf die Struktur des Chromatins nimmt. Hier spielen HDACs eine entscheidende Rolle und im Kontext der Endometriose konnten Hinweise auf eine Beteiligung von HDACs in Bezug auf die Stärke von Schmerzen und die Größe von Läsionen gefunden werden (Liu & Guo, 2008; Lu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012a, 2012b). In der Literatur finden sich diverse Hinweise auf eine Beteiligung von HDACs an der Entwicklung und dem Fortbestehen von Endometriose-Läsionen. So konnte in humanen Endometriose-Läsionen eine verstärkte Expression von HDAC1 in epithelialen und stromalen Zellen im Vergleich zu endometrialem Gewebe festgestellt werden (Samartzis *et al.*, 2013). In peritonealen und ovarialen Läsionen ist diese Erhöhung signifikant. Die untersuchten tiefinfiltrierenden Läsionen zeigten auch eine verstärkte HDAC1-Expression, jedoch war diese im Vergleich zu endometrialem Gewebe nicht signifikant (Samartzis *et al.*, 2013). Die Expression der Klasse I HDACs HDAC2 und HDAC in Endometriose-Läsionen war in dieser Studie jedoch nicht verändert (Samartzis *et al.*, 2013). Colón-Días *et al.* konnten eine erhöhte Expression von HDAC1 und HDAC2 in stromalen Endometriose-Zellen im Vergleich zu endometrialen Stromazellen feststellen (Colón-Días *et al.*, 2012). Auch in Adenomyose-Läsionen konnte eine verstärkte Expression von HDAC1, HDAC2 und HDAC3 festgestellt werden (Liu *et al.*, 2012b). Andere konnten eine verminderte HDAC1-Expression im ektopem Endometrium feststellen (Xiaomeng *et al.*, 2012). Zellen der immortalisierten Zelllinie 11Z, die aus epithelialen Endometriose-Zellen abgeleitet ist, exprimieren die Klasse I HDACs HDAC1, HDAC2 und HDAC3 und die Klasse II HDACs HDAC4, HDAC5 und HDAC6 (Imesch *et al.*, 2010). Die 12Z-Zellen exprimieren ebenfalls HDAC1 und HDAC2, wobei die Herunterregulation von Shrew-1 keinen Einfluss auf deren Expressionsstärke nimmt (Abbildung 4.16 a und b). Die Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Romidepsin führte in den 11Z-Zellen zu einer Verminderung der HDAC-Aktivität und einer Zunahme der Acetylierungen an den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 (Imesch *et al.*, 2010). Die Behandlung von stromalen Zellen aus Endometriose-Läsionen mit den HDAC-Inhibitoren Valproinsäure, Vorinostat und Apicidin führt zu einer Zunahme der Acetylierungen an den Histonen H3 und H4 sowie zu einer Verminderung der Proliferation und einer Hochregulation von Proteinen, die den Zellzyklus anhalten können (p16INK4a, p21Waf1/Cip1, p27Kip1 und CHK2) (Kawano *et al.*, 2011). In der epithelialen Zelllinie 11Z führte die Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor TSA zu einer Verminderung des invasiven Verhaltens (Wu *et al.*, 2007a). Dies beruht vermutlich auf der Reexpression von E-Cadherin, die ebenfalls durch die TSA-Behandlung induziert werden konnte (Wu *et al.*, 2007a). Auch in weiteren zellulären Systemen kann die Inhibierung von HDACs die E-Cadherin-Expression beeinflussen. In CLL (Chronische lymphatische Leukämie)-Zellen induziert die Behandlung

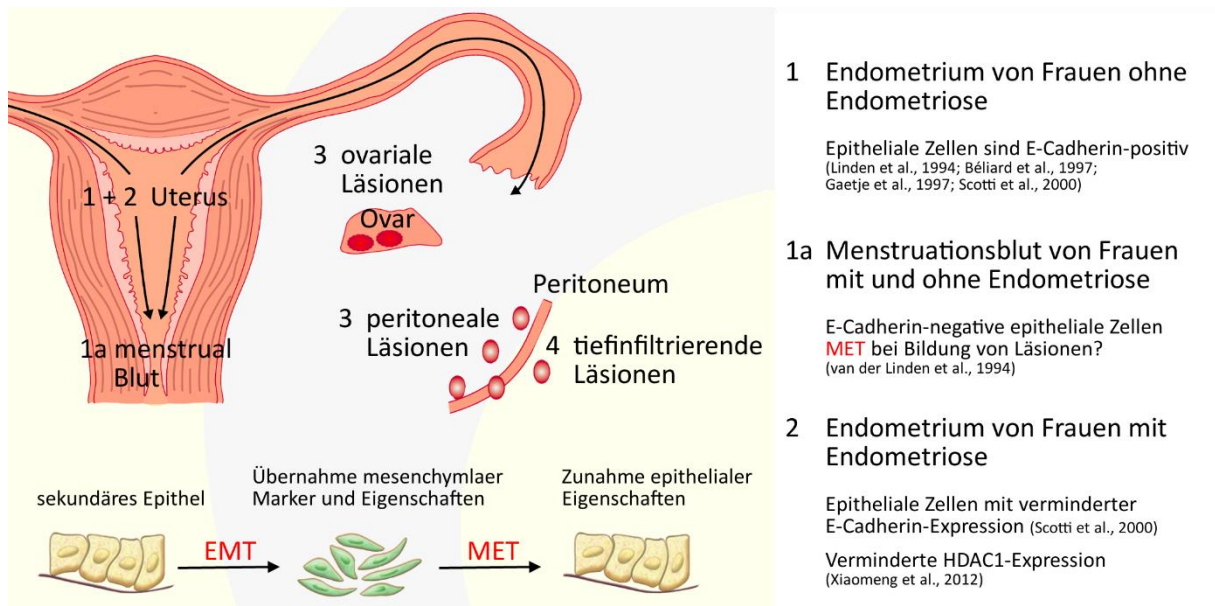
mit dem HDAC-Inhibitor MS-275 die Reexpression von E-Cadherin auf mRNA- und Protein-Ebene (Jordaan *et al.*, 2013). Dies erfolgte durch die verstärkte Acetylierung der Histone H3 und H4 im Bereich des CDH1-Promotors (Jordaan *et al.*, 2013). In metastasierenden Zellen aus Pankreas-Tumoren kann die E-Cadherin-Expression ebenfalls über die Acetylierung von Histonen gesteuert werden. In hoch-invasiven Zellen ist die E-Cadherin-Expression durch einen Repressor-Komplex aus Snail, HDAC1 und HDAC2 reduziert (von Burstin *et al.*, 2009). Durch die Stimulation mit TSA konnte die E-Cadherin-Expression wieder induziert werden.

In den zellulären Endometriose-Modellen 10Z, 12Z und 49Z führte die Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor TSA ebenfalls zur E-Cadherin-Reexpression (Abbildung 4.12 und 4.13). Die TSA-Behandlung hat somit in Bezug auf die E-Cadherin-Reexpression den gleichen Effekt wie die Herunterregulation von Shrew-1 in den Zelllinien 12Z und 49Z. In den 12Z-Zellen konnte eine Zunahme der Histon-Modifikation H3K9ac am E-Cadherin-Promotor (CDH1) sowohl durch die Behandlung mit TSA als auch durch die Herunterregulation von Shrew-1 festgestellt werden (Abbildung 4.15 b und 4.17). In den 12Z Shrew-1 KD-Zellen konnte ebenfalls eine verstärkte Assoziation der RNA-Polymerase II mit dem CDH1-Promotor gezeigt werden. Dies legt nahe, dass in den 12Z-Zellen durch die Herunterregulation von Shrew-1 tatsächlich die Transkription von E-Cadherin beeinflusst wird.

Die verminderte Expression von Shrew-1 in 12Z-Zellen vermindert ebenfalls das Vorkommen von HDAC1 und HDAC2 am CDH1-Promotor (Abbildung 4.16), welche die Acetylierung von Histonen beeinflussen (de Ruijter *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007). Obwohl die Stärke der Expression von HDAC1 und HDAC2 in 12Z-Zellen durch die Herunterregulation von Shrew-1 nicht beeinflusst war, gibt es Hinweise auf eine verminderte gegenseitige Interaktion von HDAC1 und HDAC2 in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen (Abbildung 4.18). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Shrew-1 die E-Cadherin-Expression im Kontext der Endometriose über den Acetylierungszustand von Histonen am CDH1-Promotor reguliert. Am Acetylierungsstatus des CDH1-Promotors sind HDAC1 und HDAC2 maßgeblich beteiligt, wobei ein Mitwirken weiterer HDACs nicht ausgeschlossen ist. Eine verminderte Interaktion von HDACs mit Promotorregionen weiterer Gene ist in den 12Z-Zellen nach der Herunterregulation von Shrew-1 möglich, wobei es von Interesse wäre, ob es einen generellen Effekt auf die Acetylierung von Histonen gibt.

In Endometriose-Zellen gibt es Hinweise auf solche generellen Veränderungen in der Acetylierung von Histonen. In Endometriose-Läsionen konnte eine verminderte globale Acetylierung des Histon H3 gefunden werden, während die Acetylierung des Histon H4 im Vergleich zu normalem Endometrium nicht verändert war (Monteiro *et al.*, 2013). Xiaomeng *et al.* detektierten eine verminderte globale Acetylierung am Histon H4 in Endometriose-Läsionen im Vergleich zum Endometrium von gesunden Frauen (Xiaomeng *et al.*, 2012). Eine veränderte Acetylierung des Histon H3 konnte in dieser Studie

nicht nachgewiesen werden (Xiaomeng *et al.*, 2012). In stromalen Zellen aus Endometriose-Läsionen ist das Level an global acetyliertem Histon H3 und H4 im Vergleich zu endometrialen Stromazellen signifikant vermindert (Kawano *et al.*, 2011). Im Vergleich zum Endometrium von Frauen mit und ohne Endometriose ist die H3K9 (H3K9ac)- und H4K16 (H4K16ac)-Acetylierung im ektopem Endometrium vermindert (Monteiro *et al.*, 2013). Für die Acetylierungen H4K5ac oder H4K8ac konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Diese Acetylierungen (H3K9, H4K5, H4K8 und H4K16) sind mit aktiver Transkription verbunden (Peterson & Laniel, 2004). In ChIP-Experimenten konnte in den Läsionen eine verminderte H3 und H4 Acetylierung in den Promotoren der Gene *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α* (Kawano *et al.*, 2013), *HOXA10*, *ER alpha*, *p21* sowie *CDH1* (Monteiro *et al.*, 2013) festgestellt werden. Eine geringe Histon-Acetylierung (H3K9ac) am *CDH1*-Promotor konnte in den 12Z-Zellen ebenfalls gezeigt werden, die jedoch durch die Herunterregulation von *Shrew-1* verstärkt wurde. Die Expression von E-Cadherin scheint somit in epithelialen Endometriose-Zellen durch die veränderte Histonacetylierung am *CDH1*-Promotor zu erfolgen und bei dieser Regulation scheint *Shrew-1* beteiligt zu sein (Abbildung 5.1).



3 Peritoneale und ovariäre Endometriose-Läsionen

Verminderte E-Cadherin-Expression in epithelialen Zellen, einzelne E-Cadherin-negative Epithelzellen, Läsionen ohne E-Cadherin-positive Zellen (van der Linden et al., 1994; Gaetje et al., 1997; Scotti et al., 2000; Eyster et al., 2007; Bartley et al., 2014)

E-Cadherin-negative Zellen zeigen *in vitro* invasives Verhalten (Gajetj et al., 1997; Zeitvogel et al., 2001)

Shrew-1-Expression in invasiver epithelialer Endometriose-Zelllinie EEC145T (Bharti et al., 2004)

E-Cadherin negative Zellen zeigen erhöhte **Shrew-1**-Expression (Adenomyose) (Dr. Petra Bernardi, persönliche Kommunikation)

Verminderte Expression von Cytokeratin, verstärkte Expression mesenchymaler Marker (Vimentin, S100A4, N-Cadherin) **EMT?** (Matsuzaki und Darcha, 2012)

Verstärkte HDAC1-Expression, verminderte globale H3 und H4 Acetylierung und H3K9 und H4K16 Acetylierung (Xiaomeng et al., 2012; Monteiro et al., 2013; Samartzis et al., 2013)

H3 und H4 Acetylierung an CDH1 Promotor vermindert (Monteiro et al., 2013)

4 tiefinfiltrierende Endometriose-Läsionen

Verstärkte E-Cadherin-Expression, weiterhin Expression mesenchymaler Marker **MET?** (Matsuzaki & Darcha, 2012)

KD von **Shrew-1** induziert Reexpression von E-Cadherin über H3K9ac und HDAC1 und HDAC2 (diese Arbeit)

Abbildung 5.1 Zusammenhang zwischen der E-Cadherin-Expression und Histon-Acetylierung in epithelialen Zellen im Kontext der Endometriose

Das Endometrium geht während der Embryonalentwicklung aus dem Mesoderm hervor, aufgrund dessen die Epithelzellen ein sekundäres Epithel darstellen. Es wird davon ausgegangen, dass diese Zellen daher leichter an EMT- und MET-Prozessen teilnehmen können. Im Endometrium exprimieren alle epithelialen Zellen E-Cadherin (1), während bei Frauen mit Endometriose schon eine verminderte E-Cadherin-Expression festgestellt werden kann (2). Auch die HDAC1-Expression kann bei Frauen mit Endometriose im Endometrium vermindert sein. In oberflächlichen Läsionen (grauer Hintergrund) ist die E-Cadherin-Expression weiter vermindert und es werden häufig E-Cadherin-negative Zellen gefunden (3). Zugleich kommt es zu einer Zunahme mesenchymaler Marker, was auf EMT-Prozesse hinweist. Die verstärkte Expression von HDAC1 konnte in diesen Läsionen gezeigt werden und der Acetylierungszustand der Histone ist vermindert, darunter auch Histone am CDH1-Promotor. Dies weist darauf hin, dass die E-Cadherin-Expression im Kontext der Endometriose unter anderem über den Acetylierungszustand von Histonen reguliert wird, woran Shrew-1 beteiligt sein könnte. In tiefinfiltrierenden Läsionen ist die E-Cadherin-Expression wieder erhöht, was an ablaufenden MET-Prozessen liegen könnte (4). Referenzen in der Abbildung. Abbildung entnommen und verändert nach (Giudice & Kao, 2004; Zeisberg & Neilson, 2009).

5.5 Shrew-1 scheint den Wnt-Signalweg in den 12Z-Zellen zu beeinflussen

Am zyklischen Auf- und Abbau des Endometriums ist der Wnt-Signalweg beteiligt (Bui *et al.*, 1997; Tulac *et al.*, 2003). Auch im Kontext der Endometriose konnte eine Beteiligung des Wnt-Signalweges gezeigt werden (Gaetje *et al.*, 2007; Matsuzaki & Darcha, 2013a, 2013b). In Endometriose-Biopsien ist die mRNA-Expression des Wnt-Liganden Wnt7a im Vergleich zum eutopen Endometrium von Frauen mit und ohne Endometriose signifikant erhöht (Gaetje *et al.*, 2007). In Immunfluoreszenz-Färbungen und *in situ* Hybridisierungen zeigte sich, dass sowohl die epithelialen als auch die Stromazellen Wnt7a exprimieren, wobei die Expression in den Stromazellen geringer ist. Die Expression von Wnt-Liganden deutet an, dass der aktive Wnt-Signalweg in Endometriose-Zellen relevant sein könnte. Des Weiteren konnte die Beteiligung des Wnt-Signalweges an Fibrosen im Kontext von Endometriose gezeigt werden (Matsuzaki & Darcha, 2013b).

Die Inhibierung der GSK3 β mittels LiCl oder SB216763, wodurch die Phosphorylierung von β -Catenin verhindert wird, scheint in den 12Z-Kontrollzellen zur Expression detektierbarer Mengen an E-Cadherin zu führen (Abbildung 4.19). In den 12Z Shrew-1 KD-Zellen wird die E-Cadherin-Expression durch die Inhibierung der GSK3 β (SB216763) gesteigert, wohingegen die Stabilisierung von Axin (XAV939), welche die Phosphorylierung von β -Catenin fördert, zu einer verminderten E-Cadherin-Expression zu führen scheint. Die Herunterregulation von Shrew-1 könnte somit die E-Cadherin-Expression in den 12Z-Zellen zum Teil auch über die Aktivierung des Wnt-Signalweges beeinflussen.

β -Catenin kommt im Wnt-Signalweg eine zentrale Rolle zu, da es neben seiner Funktion in den Adhärenzverbindungen, auch im Nukleus an der Transkription von Wnt-Zielgenen beteiligt ist (Kim *et al.*, 2013). Ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung des Wnt-Signalweges in den 12Z-Zellen wäre somit eine veränderte Lokalisation von β -Catenin, welches bei einem aktiven Wnt-Signalweg auch im Zellkern lokalisiert sein sollte. In den verschiedenen 12Z-Zelllinien (Mock, SEW und Shrew-1 KD) konnte jedoch keine veränderte Lokalisation von β -Catenin gezeigt werden (Abbildung 4.6). β -Catenin ist ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiert. Auch nach der Herunterregulation von Shrew-1 konnte keine nukleäre Lokalisation von β -Catenin gezeigt werden. In murinen E-Cadherin-negativen Brustepithel-Zellen wurde gezeigt, dass dephosphoryliertes β -Catenin nach der Aktivierung des Wnt-Signalweges kurzzeitig an der Plasmamembran lokalisiert ist (Hendriksen *et al.*, 2008). In epithelialen Endometriose-Zellen infertiler Frauen konnte dephosphoryliertes β -Catenin in der sekretorischen Phase des Zyklus ebenfalls an der Membran detektiert werden (Matsuzaki *et al.*, 2010). In epithelialen Zellen aus tief-infiltrierenden Läsionen konnte gezeigt werden, dass die Menge an dephosphoryliertem β -Catenin signifikant erhöht ist, im Vergleich zu denen aus ovarialen oder peritonealen Läsionen (Matsuzaki & Darcha, 2012). In eutopem Endometrium konnte kein dephosphoryliertes β -Catenin detektiert werden (Matsuzaki & Darcha, 2012).

Da sowohl die E-Cadherin-Expression nach der Inhibierung der GSK3 β , als auch die Verminderung der E-Cadherin-Expression in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen nach der Stabilisierung von Axin nur schwach ist, ist anzunehmen, dass der Wnt-Signalweg lediglich einen geringen Einfluss auf die E-Cadherin-Expression in den 12Z-Zellen haben könnte. Es ist möglich, dass die Menge an Zellkern-lokalisiertem β -Catenin zu gering für dessen Detektion in Immunfluoreszenz-Färbungen ist, vor allem da die Membranständige Färbung besonders stark ist.

Um die Beteiligung des Wnt-Signalweges sicher zu stellen, sollte die Aktivität des Wnt-Signalweges in den 12Z-Zellen in TOP/FOP-SEAP-Reporter-Messungen unter den verschiedenen Bedingungen (Shrew-1 KD, pharmakologische Aktivierung und Inhibierung des Wnt-Signalweges) getestet werden. Jedoch war es nicht möglich die entsprechenden TOP- bzw. FOP-Konstrukte in die Zellen einzubringen, auch nicht über eine lentivirale Transduktion. In HEK293T-Zellen konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Überexpression von Shrew-1 die von β -Catenin induzierte Reporterexpression unterdrückt (Dr. Rolf-Peter Scholz, persönliche Kommunikation). Das lässt darauf schließen, dass die direkte Interaktion von Shrew-1 und β -Catenin (Bharti *et al.*, 2004) entscheidend ist. Es ist möglich, dass Shrew-1 freies cytosolisches β -Catenin durch die Interaktion an der Translokation in den Nukleus hindert und so Einfluss auf den Wnt-Signalweg nehmen kann. Eine Herunterregulation von Shrew-1 könnte somit zu einem Anstieg von cytosolischem und nukleärem β -Catenin führen und so zu einer Aktivierung des Wnt-Signalweges beitragen. Dieser Zusammenhang konnte für β -Catenin und E-Cadherin in der kolorektalen Tumorzelllinie SW480 (Orsulic *et al.*, 1999; Gottardi *et al.*, 2001) und in CLL (Chronische lymphatische Leukämie)-Zellen (Jordaan *et al.*, 2013) gezeigt werden. Die cytoplasmatische Domäne von E-Cadherin, welche freies cytosolisches β -Catenin binden kann, dirigiert β -Catenin an die Plasmamembran und verhindert dessen nukleäre Lokalisation (Gottardi *et al.*, 2001) und kann so die β -Catenin/TCF-Reporterexpression-Aktivität vermindern (Orsulic *et al.*, 1999). Auf diese Weise wäre in den 12Z-Zellen auch eine Inhibierung des Wnt-Signalweges durch Shrew-1 möglich, wodurch es bei seiner Herunterregulation zur Wnt-Signalwegaktivierung kommen könnte. Jedoch wird in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen E-Cadherin exprimiert, welches ebenso diesen Effekt auf β -Catenin und den Wnt-Signalweg hat (Orsulic *et al.*, 1999; Gottardi *et al.*, 2001; Jordaan *et al.*, 2013).

Dass E-Cadherin in den 12Z-Zellen nach der Inhibierung der GSK3 β exprimiert wird, ist eher ungewöhnlich. Der Wnt-Signalweg hat üblicherweise einen inhibierenden Effekt auf die E-Cadherin-Expression, wobei die Repressoren Snail, Slug, Twist und ZEB1 beteiligt sein können, und ist mit einem motilen und invasiven Charakter von Zellen assoziiert (Orsulic *et al.*, 1999; Gottardi *et al.*, 2001; Conacci-Sorrell *et al.*, 2003; Howe *et al.*, 2003; Nelson & Nusse, 2004; Yook *et al.*, 2005; Peinado *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2012). In den 12Z-Zellen hat der Wnt-Signalweg in Bezug auf die E-Cadherin-Expression möglicherweise einen gegenteiligen Effekt, da die Herunterregulation von Shrew-1 den Wnt-Signalweg

zu aktivieren scheint und dies zur Expression von E-Cadherin führt (Abbildung 4.19). In Lungenkrebszellen konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von E-Cadherin und dem aktiven Wnt-Signalweg gefunden werden. Die Aktivierung des Wnt-Signalweges mit LiCl sowie durch die Expression von Wnt1, Wnt7a oder nicht-phosphorylierbarem β -Catenin induzierte die Expression von E-Cadherin in der Lungenkrebs-Zelllinie H661 (Ohira *et al.*, 2003). Zudem nahm die Menge an freien cytosolischem β -Catenin zu, was auf die Aktivierung des Wnt-Signalweges hinweist (Ohira *et al.*, 2003). In Zellen aus Tumoren der Nebenniere (Phäochromozytom) der Ratte führte die exogene Expression von Wnt1 ebenfalls zur Erhöhung der E-Cadherin-Expression sowie der Calcium-abhängigen Adhäsion (Bradley *et al.*, 1993). Die Auswirkung des Wnt-Signalweges auf die E-Cadherin-Expression kann somit vom zellulären Kontext abhängig sein. Die Ergebnisse der Zelllinie 12Z lassen vermuten, dass der Wnt-Signalweg in Endometriose-Zellen einen fördernden Einfluss auf die E-Cadherin-Expression haben könnte.

6 Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigte E-Cadherin-Reexpression in 12Z Shrew-1 KD-Zellen über die Acetylierung von Histonen sollte weiter untersucht werden. Eine erhöhte H3K9-Acetylierung am CDH1-Promotor konnte in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen gezeigt werden und es wäre interessant Kenntnis darüber zu erlangen, ob in diesem Bereich weitere Histon-Modifikationen (z. B. H4K5ac, H4K8ac und H4K16ac) auftreten. Auch die Assoziation von weiteren HDACs und deren Veränderung am CDH1-Promotor in Abhängigkeit der Shrew-1-Expression sollten in weiteren CHIP-Versuchen analysiert werden. Darüber hinaus sollten weitere Promotoren auf veränderte Histon-Modifikationen untersucht werden. Dabei wären die Promotoren des Shrew-1-Interaktionspartners β -Catenin und MMP9 interessant. Aufgrund einer möglichen generellen Auswirkung von Shrew-1 auf die Acetylierung von Histonen, sollte die globale Acetylierung von Histonen (H2Aac, H2Bac, H3ac und H4ac) überprüft werden.

In diesem Zusammenhang wäre es wichtig zu klären, auf welche Weise Shrew-1 auf HDACs wirkt, vor allem, da es die Expressionsstärke nicht beeinflusst. Dabei ist von Interesse, dass Shrew-1 cytoplasmatisch eine Kernexport-Sequenz besitzt und in murinen epithelialen Brustdrüsenzellen während der Schwangerschaft und Laktation im Kern lokalisiert ist (Dr. Petra Bernardi, persönliche Kommunikation). Es ist möglich, dass dabei die Interaktion mit β -Catenin entscheidend ist, da dieses sowohl cytoplasmatisch als auch nukleär lokalisiert sein kann. Dabei bleibt zu klären, ob eine Interaktion der beiden Proteine auch im Nukleus auftritt.

Die veränderte Lokalisation von Vinculin durch die Herunterregulation von Shrew-1 sollte ebenfalls weiter charakterisiert werden. Dabei ist von Interesse, ob Vinculin mit den Adhärenzverbindungen assoziiert ist. Durch die Herunterregulation von Vinculin wäre es möglich zu klären, ob Vinculin für die Reexpression und Lokalisation von E-Cadherin in den 12Z-Zellen entscheidend ist.

Auch die mögliche Beteiligung des Wnt-Signalweges sollte weiter analysiert werden. Da in den 12Z-Zellen kein Reporter-gen-System etabliert werden konnte, wäre es sinnvoll, diese Frage in einem ähnlichen zellulären Modell zu klären (z. B. 10Z, 49Z). Hier wäre es interessant zu überprüfen, ob E-Cadherin ein direktes oder indirektes Ziel des Wnt-Signalweges ist.

Von den 12Z-Zellen ist bekannt, dass sie Endometriose-ähnliche Läsionen in immunsupprimierten Mäusen induzieren können, wenn sie gemeinsam mit stromalen Zellen (22B) in die Bauchhöhle der Tiere injiziert werden (Banu *et al.*, 2009). Durch den Einfluss der Herunterregulation von Shrew-1 in diesen Zellen auf die Expression von E-Cadherin und das motile und invasive Verhalten der Zellen, wäre es interessant zu klären, ob die 12Z Shrew-1 KD-Zellen weiterhin in der Lage sind, Läsionen zu bilden und ob diese ausschließlich oberflächliche oder auch tiefinfiltrierende Läsionen bilden können. Dies

würde Rückschlüsse auf die Beteiligung von Shrew-1 bei der Entstehung von Endometriose-Läsionen geben.

Da der Shrew-1 Promotor im Kontext gynäkologischer Erkrankungen methyliert vorliegen kann (Chen *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2014), wäre es wichtig zu klären, ob dies im Kontext der Endometriose ebenfalls auftritt. Hier wäre es interessant zu erfahren, ob *in vivo* eine inverse Expression von shrew-1 und E-Cadherin in verschiedenen Stadien (oberflächliche und tiefinfiltrierende Läsionen) der Erkrankung zu beobachten ist und somit Shrew-1 an der Bildung von oberflächlichen und persistierenden tiefinfiltrierenden Läsionen beteiligt ist.

7 Zusammenfassung

Die Endometriose ist eine gynäkologische Erkrankung, bei der epitheliale und stromale Zellen des Endometriums Läsionen außerhalb des Uterus bilden, die in ihrem Aufbau dem Endometrium gleichen. Diese Läsionen, sowie deren zyklische Proliferation, führen zu Schmerzen bei betroffenen Frauen. In isolierten, invasiven Epithelzellen (EEC145T) einer Endometriose-Läsion konnte die Expression von Shrew-1 gezeigt werden. Auch in anderen zellulären Zusammenhängen fördert die Expression von Shrew-1 den invasiven Phänotyp. Shrew-1 ist ein Transmembranprotein, das in Epithelzellen mit den Adhärenzverbindungen assoziiert ist und Interaktionen mit β -Catenin und E-Cadherin eingeht. In MCF7-Zellen fördert die Expression von Shrew-1 die EGF-induzierte Internalisierung von E-Cadherin, welche zur Verminderung der Zell-Zell-Adhäsion führt. In 12Z- und HT1080-Zellen konnte eine Interaktion mit CD147 gezeigt werden. CD147 fördert die Aktivität von MMPs und in Shrew-1-überexprimierenden HT1080-Zellen konnte eine erhöhte Aktivität der MMP9 gezeigt werden. Shrew-1 wirkt somit auf die Invasivität von Zellen und ist gleichzeitig Teil der Adhärenzverbindung. Aus diesem Grund wird Shrew-1 eine modulatorische Rolle in diesem Kontext zugeschrieben.

In immunhistologischen Färbungen von Shrew-1 und E-Cadherin konnte in Adenomyose-Läsionen eine inverse Expression der beiden Proteine in einigen epithelialen Zellen gezeigt werden, die im Endometrium nicht detektiert werden konnten. In den epithelialen Endometriose-Zelllinien 12Z und 49Z, die kein E-Cadherin exprimieren und äquivalent zu der Zelllinie EEC145T sind, führte die Herunterregulation von Shrew-1 (Shrew-1 KD) zur Reexpression von E-Cadherin. E-Cadherin ist in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen an der Plasmamembran lokalisiert und interagiert mit β -Catenin, wodurch seine Assoziation mit den Adhärenzverbindungen wahrscheinlich ist. Die Herunterregulation von Shrew-1 führt zu einer verminderten Motilität und Invasivität der 12Z-Zellen, wobei die reduzierte Invasivität nicht alleine auf die Reexpression von E-Cadherin zurückgeführt werden kann. Es ist zu vermuten, dass das verminderte invasive Verhalten mit der ausbleibenden Interaktion von Shrew-1 mit CD147 zusammenhängt, welches die Aktivität von MMPs fördert.

Da Shrew-1 eine direkte Interaktion mit β -Catenin eingehen kann, ist es möglich, dass die Herunterregulation von Shrew-1 zu Veränderungen in der Lokalisation von β -Catenin und weiteren Proteinen, die mit den Adhärenzverbindungen assoziiert sind (p120 Catenin und Aktin), führen. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Eine verstärkte Lokalisation von Vinculin an den Enden von Aktin-Stressfasern sowohl in Zellausstülpungen als auch an Zell-Zell-Kontakten konnte in 12Z-Zellen nach der Herunterregulation von Shrew-1 beobachtet werden. Dies könnte eine Folge der E-Cadherin-Reexpression oder entscheidend für die Lokalisation von E-Cadherin an der Membran sein.

Die Reexpression von E-Cadherin, die in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen auf mRNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden kann, erfolgt in den 12Z-Zellen vermutlich hauptsächlich über Veränderungen von Histon-Acetylierungen, da die Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor TSA die Expression von E-Cadherin in den 12Z-Zellen induziert. Eine verstärkte H3K9-Acetylierung am CDH1-Promotor konnte in ChIP-Analysen in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen gezeigt werden. Die gesteigerte Acetylierung resultiert vermutlich aus der verminderten Assoziation von HDAC1 und HDAC2 mit dem CDH1-Promotor in diesen Zellen. Eine Beteiligung der Repressoren Snail, Slug, Twist und ZEB1 an der Reexpression von E-Cadherin in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen konnte nicht gezeigt werden. Ebenso scheinen Veränderungen am Methylierungsstatus des CDH1-Promotors nach der Herunterregulation von Shrew-1 nicht zu erfolgen.

TSA induziert auch in weiteren epithelialen Endometriose-Zelllinien (10Z und 49Z) die Expression von E-Cadherin. In stromalen Zellen führt hingegen weder TSA noch die Herunterregulation von Shrew-1 zur Expression von E-Cadherin (17B, 18B und 22B). Dies weist darauf hin, dass die Herunterregulation von Shrew-1 über die Veränderungen von Histon-Acetylierungen wirkt und dass dieser Mechanismus in epithelialen Endometriose-Zellen entscheidend ist. In den stromalen Zellen muss die Expression von E-Cadherin über einen anderen und/oder weitere Mechanismen blockiert sein.

Auch der Wnt-Signalweg scheint an der Reexpression von E-Cadherin in 12Z-Zellen beteiligt zu sein. Die Inhibierung der GSK3 β (LiCl und SB216763) führt zur Expression von geringen Mengen an E-Cadherin. In 12Z Shrew-1 KD-Zellen führt die Stabilisierung von Axin (XAV939) zur verminderten Expression von E-Cadherin. Dies lässt darauf schließen, dass Shrew-1 auch einen Einfluss auf den Wnt-Signalweg hat, was vor allem durch dessen Interaktion mit β -Catenin wahrscheinlich ist.

8 Referenzen

- Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R., and Hoschuetzky, H.** (1994). Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J. Cell Sci.* *107*, 3655–3663.
- Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., and Nieto, M. A.** (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin. Invest.* *119*, 1438–1449.
- Adammek, M., Greve, B., Kässens, N., Schneider, C., Brüggemann, K., Schüring, A. N., Starzinski-Powitz, A., Kiesel, L., and Götte, M.** (2013). MicroRNA miR-145 inhibits proliferation, invasiveness, and stem cell phenotype of an in vitro endometriosis model by targeting multiple cytoskeletal elements and pluripotency factors. *Fertil. Steril.* *99*, 1346–1355.
- Aghdassi, A. et al.** (2012). Recruitment of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the transcriptional repressor ZEB1 downregulates E-cadherin expression in pancreatic cancer. *Gut* *61*, 439–448.
- Agic, A., Djalali, S., Diedrich, K., and Hornung, D.** (2009). Apoptosis in endometriosis. *Gynecol. Obstet. Invest.* *68*, 217–223.
- Ahmed, H.** (2012). Methylated DNA as Promising Marker for Early Diagnosis of Cancer. *J. Bioanal. Biomed.* *4*, 5–6.
- Amălinei, C., Căruntu, I. D., Giușcă, S. E., and Bălan, R. A.** (2010). Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom. J. Morphol. Embryol.* *51*, 215–228.
- Arce, L., Pate, K. T., and Waterman, M. L.** (2009). Groucho binds two conserved regions of LEF-1 for HDAC-dependent repression. *BMC Cancer* *9*, 159.
- Bachmann, B. J.** (1983). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 7. *Microbiol. Rev.* *47*, 180–230.
- Baldi, A., Campioni, M., and Signorile, P. G.** (2008). Endometriosis: pathogenesis, diagnosis, therapy and association with cancer (review). *Oncol. Rep.* *19*, 843–846.
- Banu, S. K., Lee, J., Starzinski-Powitz, A., and Arosh, J. a** (2008). Gene expression profiles and functional characterization of human immortalized endometriotic epithelial and stromal cells. *Fertil. Steril.* *90*, 972–987.
- Banu, S. K., Starzinski-Powitz, A., Speights, V. O., Burghardt, R. C., and Arosh, J. a** (2009). Induction of peritoneal endometriosis in nude mice with use of human immortalized endometriosis epithelial and stromal cells: a potential experimental tool to study molecular pathogenesis of endometriosis in humans. *Fertil. Steril.* *91*, 2199–2209.
- Bartley, J., Jülicher, a, Hotz, B., Mechsner, S., and Hotz, H.** (2014). Epithelial to mesenchymal transition (EMT) seems to be regulated differently in endometriosis and the endometrium. *Arch. Gynecol. Obstet.* *289*, 871–881.
- Battle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and García De Herreros, A.** (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* *2*, 84–89.
- Béliard, A., Donnez, J., Nisolle, M., and Foidart, J.** (1997). Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertil. Steril.* *67*, 266–272.
- Benagiano, G., and Brosens, I.** (2006). History of adenomyosis. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* *20*, 449–463.

- Berkkanoglu, M., and Arici, A.** (2003). Immunology and endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* *50*, 48–59.
- Berx, G., and van Roy, F.** (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*, a003129.
- Bharti, S., Handrow-Metzmacher, H., Zickenheiner, S., Zeitvogel, A., Baumann, R., and Starzinski-Powitz, A.** (2004). Novel Membrane Protein shrew-1 Targets to Cadherin-Mediated Junctions in Polarized Epithelial Cells. *Mol. Biol. Cell* *15*, 397–406.
- Billin, A. N., Thirlwell, H., and Ayer, D. E.** (2000). Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 6882–6890.
- Boggon, T. J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B. M., and Shapiro, L.** (2002). C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* *296*, 1308–1313.
- Bolós, V., Peinado, H., Pérez-Moreno, M., Fraga, M., Esteller, M., and Cano, A.** (2002). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J. Cell Sci.* *116*, 499–511.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248–254.
- Bradley, R. S., Cowin, P., and Brown, A. M. C.** (1993). Expression of Wnt-1 in PC12 cells results in modulation of plakoglobin and E-cadherin and increased cellular adhesion. *J. Cell Biol.* *123*, 1857–1865.
- Bruner-Tran, K. L., Eisenberg, E., Yeaman, G. R., Anderson, T. a, McBean, J., and Osteen, K. G.** (2002). Steroid and cytokine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 4782–4791.
- Bui, T. D., Zhang, L., Rees, M. C., Bicknell, R., and Harris, A. L.** (1997). Expression and hormone regulation of Wnt2, 3, 4, 5a, 7a, 7b and 10b in normal human endometrium and endometrial carcinoma. *Br. J. Cancer* *75*, 1131–1136.
- Von Burstin, J. et al.** (2009). E-Cadherin Regulates Metastasis of Pancreatic Cancer In Vivo and Is Suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 Repressor Complex. *Gastroenterology* *137*, 361–371, 371.e1–e5.
- Canel, M., Serrels, A., Frame, M. C., and Brunton, V. G.** (2013). E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J. Cell Sci.* *126*, 393–401.
- Cano, A., Pérez-Moreno, M., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M., del Barrio, M., Portillo, F., and Nieto, M.** (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* *2*, 76–83.
- Carisey, A., and Ballestrem, C.** (2011). Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *Eur. J. Cell Biol.* *90*, 157–163.
- Chaffer, C. L., Brennan, J. P., Slavin, J. L., Blick, T., Thompson, E. W., and Williams, E. D.** (2006). Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res.* *66*, 11271–11278.
- Chaffer, C. L., Thompson, E. W., and Williams, E. D.** (2007). Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells. Tissues. Organs* *185*, 7–19.

- Chang, J. H., Au, H. K., Lee, W. C., Chi, C. C., Ling, T. Y., Wang, L. M., Kao, S. H., Huang, Y. H., and Tzeng, C. R.** (2013). Expression of the pluripotent transcription factor OCT4 promotes cell migration in endometriosis. *Fertil. Steril.* *99*, 1332–1339.
- Chao, Y. L., Shepard, C. R., and Wells, A.** (2010). Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Mol. Cancer* *9*, 179.
- Chen, C. L., Liu, S. S., Ip, S. M., Wong, L. C., Ng, T. Y., and Ngan, H. Y. S.** (2003). E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours. *Eur. J. Cancer* *39*, 517–523.
- Chen, Y.-C. et al.** (2014). Methylomics analysis identifies epigenetically silenced genes and implies an activation of β -catenin signaling in cervical cancer. *Int. J. Cancer* *135*, 117–127.
- Chen, Y.-J., Li, H.-Y., Huang, C.-H., Twu, N.-F., Yen, M.-S., Wang, P.-H., Chou, T.-Y., Liu, Y.-N., Chao, K.-C., and Yang, M.-H.** (2010). Oestrogen-induced epithelial-mesenchymal transition of endometrial epithelial cells contributes to the development of adenomyosis. *J. Pathol.* *222*, 261–270.
- Chuang, D.-M., Leng, Y., Marinova, Z., Kim, H.-J., and Chiu, C.-T.** (2009). Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci.* *32*, 591–601.
- Chung, H., Wen, Y., Chun, S., and Nezhat, C.** (2001). Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: a rationale. *Fertil. Steril.* *75*, 152–159.
- Cogdell, D., Chung, W., Liu, Y., McDonald, J. M., Aldape, K., Issa, J.-P. J., Fuller, G. N., and Zhang, W.** (2011). Tumor-associated methylation of the putative tumor suppressor AJAP1 gene and association between decreased AJAP1 expression and shorter survival in patients with glioma. *Chin. J. Cancer* *30*, 247–253.
- Collette, T., Bellehumeur, C., Kats, R., Maheux, R., Mailloux, J., Villeneuve, M., and Akoum, a** (2004). Evidence for an increased release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of matrix metalloproteinase-9. *Hum. Reprod.* *19*, 1257–1264.
- Collette, T., Maheux, R., Mailloux, J., and Akoum, a** (2006). Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in the eutopic endometrial tissue of women with endometriosis. *Hum. Reprod.* *21*, 3059–3067.
- Colón-Díaz, M. et al.** (2012). HDAC1 and HDAC2 are differentially expressed in endometriosis. *Reprod. Sci.* *19*, 483–492.
- Conacci-Sorrell, M., Simcha, I., Ben-Yedidia, T., Blechman, J., Savagner, P., and Ben-Ze'Ev, A.** (2003). Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: The roles of β -catenin signaling, Slug, and MAPK. *J. Cell Biol.* *163*, 847–857.
- Cong, N., Du, P., Zhang, A., Shen, F., Su, J., Pu, P., Wang, T., Zjang, J., Kang, C., and Zhang, Q.** (2013). Downregulated microRNA-200a promotes EMT and tumor growth through the Wnt/ β -catenin pathway by targeting the E-cadherin repressors ZEB1/ZEB2 in gastric adenocarcinoma. *Oncol. Rep.* *29*, 1579–1587.
- Corn, P. G., Smith, B. D., Ruckdeschel, E. S., Douglas, D., Baylin, S. B., and Herman, J. G.** (2000). E-Cadherin Expression Is Silenced by 5' CpG Island Methylation in Acute Leukemia. *Clin. Cancer Res.* *6*, 4243–4248.
- D'Hooghe, T. M., Bambra, C. S., Raeymaekers, B. M., De Jonge, I., Lauweryns, J. M., and Koninckx, P. R.** (1995). Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (*Papio cynocephalus* and *Papio anubis*). *Am. J. Obstet. Gynecol.* *173*, 125–134.
- Daniel, J. M.** (2007). Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 59–68.

- Daniel, J. M., and Reynolds, A. B.** (1999). The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 3614–3623.
- Debnath, J., Muthuswamy, S. K., and Brugge, J. S.** (2003). Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* *30*, 256–268.
- Demaison, C., Parsley, K., Brouns, G., Scherr, M., Battmer, K., Kinnon, C., Grez, M., and Thrasher, A. J.** (2002). High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum. Gene Ther.* *13*, 803–813.
- Diplomarbeit Paul, H.-V.** (2010). Etablierung und molekulare Charakterisierung von Endometriosezellen in 2D- und 3D-Kulturen. Goethe-Universität in Frankfurt am Main.
- Dissertation Resch, E.** (2011). Definition and Characterization of Functional Protein Segments of Shrew-1. Goethe-Universität in Frankfurt am Main.
- Dmowski, W. P., Ding, J., Shen, J., Rana, N., Fernandez, B. B., and Braun, D. P.** (2001). Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum. Reprod.* *16*, 1802–1808.
- Dong, P., Kaneuchi, M., Watari, H., Hamada, J., Sudo, S., Ju, J., and Sakuragi, N.** (2011). MicroRNA-194 inhibits epithelial to mesenchymal transition of endometrial cancer cells by targeting oncogene BMI-1. *Mol. Cancer* *10*, 99.
- Evdokimov, K., Biswas, S., Adrian, M., Weber, J., Schledzewski, K., Winkler, M., Goerdts, S., and Géraud, C.** (2013). Proteolytic cleavage of LEDA-1/PIANP by furin-like proprotein convertases precedes its plasma membrane localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *434*, 22–27.
- Eyster, K. M., Klinkova, O., Kennedy, V., and Hansen, K. A.** (2007). Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrium. *Fertil. Steril.* *88*, 1505–1533.
- Frixen, U., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Löchner, D., and Birchmeier, W.** (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell Biol.* *113*, 173–185.
- Gaetje, R., Holtrich, U., Karn, T., Cikrit, E., Engels, K., Rody, A., and Kaufmann, M.** (2007). Characterization of WNT7A expression in human endometrium and endometriotic lesions. *Fertil. Steril.* *88*, 1534–1540.
- Gaetje, R., Kotzian, S., Herrmann, G., Baumann, R., and Starzinski-Powitz, A.** (1997). Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. *Am. J. Pathol.* *150*, 461–467.
- Gargett, C. E., and Masuda, H.** (2010). Adult stem cells in the endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* *16*, 818–834.
- Gargett, C. E., Schwab, K. E., Brosens, J. J., Puttemans, P., Benagiano, G., and Brosens, I.** (2014). Potential role of endometrial stem/progenitor cells in the pathogenesis of early-onset endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.* *20*, 591–598.
- Gargett, C. E., Schwab, K. E., Zillwood, R. M., Nguyen, H. P. T., and Wu, D.** (2009). Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol. Reprod.* *80*, 1136–1145.
- Géraud, C. et al.** (2010). Liver sinusoidal endothelium: a microenvironment-dependent differentiation program in rat including the novel junctional protein liver endothelial differentiation-associated protein-1. *Hepatology* *52*, 313–326.

- Giepmans, B. N. G., and van Ijzendoorn, S. C. D.** (2009). Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 820–831.
- Giudice, L. C., and Kao, L. C.** (2004). Endometriosis. *Lancet* 364, 1789–1799.
- Goldberg, A. D., Allis, C. D., and Bernstein, E.** (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128, 635–638.
- Gottardi, C. J., Wong, E., and Gumbiner, B. M.** (2001). E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J. Cell Biol.* 153, 1049–1060.
- Graff, J. R., Herman, J. G., Myöhänen, S., Baylin, S. B., and Vertino, P. M.** (1997). Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation. *J. Biol. Chem.* 272, 22322–22329.
- Gross, J., Schreiner, A., Engels, K., and Starzinski-Powitz, A.** (2009). E-cadherin surface levels in epithelial growth factor-stimulated cells depend on adherens junction protein Shrew-1. *Mol. Biol. Cell* 20, 3598–3607.
- Grund, E. M., Kagan, D., Tran, C. A., Zeitvogel, A., Starzinski-Powitz, A., Nataraja, S., and Palmer, S. S.** (2008). Tumor necrosis factor-alpha regulates inflammatory and mesenchymal responses via mitogen-activated protein kinase kinase, p38, and nuclear factor kappaB in human endometriotic epithelial cells. *Mol. Pharmacol.* 73, 1394–1404.
- Gumbiner, B. M.** (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345–357.
- Gumbiner, B. M.** (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 622–634.
- Gunin, A. G., Emelianov, V. U., Mironkin, I. U., Morozov, M. P., and Tolmachev, A. S.** (2004). Lithium treatment enhances estradiol-induced proliferation and hyperplasia formation in the uterus of mice. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 114, 83–91.
- Guo, S.-W.** (2009). Epigenetics of endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.* 15, 587–607.
- Hagios, C., Lochter, A., and Bissell, M. J.** (1998). Tissue architecture: the ultimate regulator of epithelial function? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353, 857–870.
- Halme, J., Hammond, M. G., Hulka, J. F., Raj, S. G., and Talbert, L. M.** (1984). Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet. Gynecol.* 64, 151–154.
- Han, L. et al.** (2014). AJAP1 is dysregulated at an early stage of gliomagenesis and suppresses invasion through cytoskeleton reorganization. *CNS Neurosci. Ther.* 20, 429–437.
- Hasselblatt, M. et al.** (2009). TWIST-1 is overexpressed in neoplastic choroid plexus epithelial cells and promotes proliferation and invasion. *Cancer Res.* 69, 2219–2223.
- Hazan, R. B., Kang, L., Roe, S., Borgen, P. I., and Rimm, D. L.** (1997). Vinculin is associated with the E-cadherin adhesion complex. *J. Biol. Chem.* 272, 32448–32453.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W.** (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509–1512.
- Hendriksen, J., Jansen, M., Brown, C. M., van der Velde, H., van Ham, M., Galjart, N., Offerhaus, G. J., Fagotto, F., and Fornerod, M.** (2008). Plasma membrane recruitment of dephosphorylated beta-catenin upon activation of the Wnt pathway. *J. Cell Sci.* 121, 1793–1802.

- Herman, I. M., Crisona, N. J., and Pollard, T. D.** (1981). Relation between cell activity and the distribution of cytoplasmic actin and myosin. *J. Cell Biol.* *90*, 84–91.
- Hermann, A., Goyal, R., and Jeltsch, A.** (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J. Biol. Chem.* *279*, 48350–48359.
- Heuberger, J., and Birchmeier, W.** (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a002915.
- Hickey, M., Ballard, K., and Farquhar, C.** (2014). Endometriosis. *BMJ* *348*, g1752.
- Howe, L. R., Watanabe, O., Leonard, J., and Brown, A. M. C.** (2003). Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer Res.* *63*, 1906–1913.
- Hudelist, G., Singer, C. F., and Keckstein, J.** (2005). [Matrix metalloproteinases and their role in menstruation and endometriosis]. *Zentralbl. Gynakol.* *127*, 320–324.
- Imesch, P., Fink, D., and Fedier, A.** (2010). Romidepsin reduces histone deacetylase activity, induces acetylation of histones, inhibits proliferation, and activates apoptosis in immortalized epithelial endometriotic cells. *Fertil. Steril.* *94*, 2838–2842.
- Izawa, M., Harada, T., Taniguchi, F., Ohama, Y., Takenaka, Y., and Terakawa, N.** (2008). An epigenetic disorder may cause aberrant expression of aromatase gene in endometriotic stromal cells. *Fertil. Steril.* *89*, 1390–1396.
- Jabbour, H. N., Kelly, R. W., Fraser, H. M., and Critchley, H. O. D.** (2006). Endocrine regulation of menstruation. *Endocr. Rev.* *27*, 17–46.
- Jakob, V., Schreiner, A., Tikkanen, R., and Starzinski-powitz, A.** (2006). Targeting of Transmembrane Protein Shrew-1 to Adherens Junctions Is Controlled by Cytoplasmic Sorting Motifs. *Mol. Biol. Cell* *17*, 3397–3408.
- Jin, B., and Robertson, K. D.** (2013). DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* *754*, 3–29.
- Jordaan, G., Liao, W., and Sharma, S.** (2013). E-cadherin gene re-expression in chronic lymphocytic leukemia cells by HDAC inhibitors. *BMC Cancer* *13*, 88.
- Jou, T., Stewart, D., Stappert, J., Nelson, W., and Marrs, J.** (1995). Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 5067–5071.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.** (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* *119*, 1420–1428.
- Kawano, Y., Nasu, K., Hijiya, N., Tsukamoto, Y., Amada, K., Abe, W., Kai, K., Moriyama, M., and Narahara, H.** (2013). CCAAT/enhancer-binding protein α is epigenetically silenced by histone deacetylation in endometriosis and promotes the pathogenesis of endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *98*, E1474–E1482.
- Kawano, Y., Nasu, K., Li, H., Tsuno, A., Abe, W., Takai, N., and Narahara, H.** (2011). Application of the histone deacetylase inhibitors for the treatment of endometriosis: histone modifications as pathogenesis and novel therapeutic target. *Hum. Reprod.* *26*, 2486–2498.
- Khan, K. N., Kitajima, M., Hiraki, K., Fujishita, A., Nakashima, M., and Masuzaki, H.** (2014). Involvement of Hepatocyte Growth Factor-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Adenomyosis. *Biol. Reprod.*

- Khan, K. N., Masuzaki, H., Fujishita, A., Kitajima, M., Hiraki, K., Miura, S., Sekine, I., and Ishimaru, T.** (2006). Peritoneal fluid and serum levels of hepatocyte growth factor may predict the activity of endometriosis. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* *85*, 458–466.
- Kim, W., Kim, M., and Jho, E.** (2013). Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem. J.* *450*, 9–21.
- Klemmt, P. A. B., and Starzinski-Powitz, A.** (2012). Biology of Eutopic and Ectopic Endometrium in Women with Endometriosis. In: *Endometriosis: Science and Practice*, ed. L. C. Giudice, J. L. H. Evers, and D. L. Healy, Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Koninckx, P., Oosterlynck, D., D'Hooghe, T., and Meuleman, C.** (1994). Deeply infiltrating endometriosis is a disease whereas mild endometriosis could be considered a non-disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *734*, 333–341.
- Krusche, C. A., Vloet, A. J., Classen-Linke, I., von Rango, U., Beier, H. M., and Alfer, J.** (2007). Class I histone deacetylase expression in the human cyclic endometrium and endometrial adenocarcinomas. *Hum. Reprod.* *22*, 2956–2966.
- Lai, H.-C., Wang, Y.-C., Yu, M.-H., Huang, R.-L., Yuan, C.-C., Chen, K.-J., Wu, C.-C., Chiang, K.-J., and Chao, T.-K.** (2014). DNA methylation as a biomarker for the detection of hidden carcinoma in endometrial atypical hyperplasia. *Gynecol. Oncol.* *135*, 552–559.
- Le, T. L., Yap, a S., and Stow, J. L.** (1999). Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J. Cell Biol.* *146*, 219–232.
- Lebovic, D. I., Mueller, M. D., and Taylor, R. N.** (2001). Immunobiology of endometriosis. *Fertil. Steril.* *75*, 1–10.
- Lee, B., Du, H., and Taylor, H. S.** (2009). Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium. *Biol. Reprod.* *80*, 79–85.
- Lee, J., Banu, S. K., Burghardt, R. C., Starzinski-Powitz, A., and Arosh, J. a** (2013). Selective inhibition of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 inhibits adhesion of human endometriotic epithelial and stromal cells through suppression of integrin-mediated mechanisms. *Biol. Reprod.* *88*, 77.
- Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., and Thompson, E. W.** (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J. Cell Biol.* *172*, 973–981.
- Leerberg, J. M., and Yap, A. S.** (2013). Vinculin, cadherin mechanotransduction and homeostasis of cell-cell junctions. *Protoplasma* *250*, 817–829.
- Li, L., Zhao, H., Nakajima, K., and Oh, B. R.** (2001). Methylation of the E-cadherin gene promoter correlates with progression of prostate cancer. *J. Urol.* *166*, 705–709.
- Lin, N. et al.** (2012). Deletion or epigenetic silencing of AJAP1 on 1p36 in glioblastoma. *Mol. Cancer Res.* *10*, 208–217.
- Van der Linden, P., de Goeij, A., Dunselman, G., van der Linden, E., Ramaekers, F., and Evers, J.** (1994). Expression of integrins and E-cadherin in cells from menstrual effluent, endometrium, peritoneal fluid, peritoneum, and endometriosis. *Fertil. Steril.* *61*, 85–90.
- Liu, H., and Lang, J. H.** (2011). Is abnormal eutopic endometrium the cause of endometriosis? The role of eutopic endometrium in pathogenesis of endometriosis. *Med. Sci. Monit.* *17*, RA92–RA99.
- Liu, M., Liu, X., Zhang, Y., and Guo, S.-W.** (2012a). Valproic acid and progestin inhibit lesion growth and reduce hyperalgesia in experimentally induced endometriosis in rats. *Reprod. Sci.* *19*, 360–373.

- Liu, X., and Guo, S.-W.** (2008). A pilot study on the off-label use of valproic acid to treat adenomyosis. *Fertil. Steril.* *89*, 246–250.
- Liu, X., Nie, J., and Guo, S.-W.** (2012b). Elevated immunoreactivity against class I histone deacetylases in adenomyosis. *Gynecol. Obstet. Invest.* *74*, 50–55.
- Liu, X.-J., He, Y.-L., and Peng, D.-X.** (2002). Expression of metalloproteinase-9 in ectopic endometrium in women with endometriosis. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* *22*, 467–469.
- Lombaerts, M. et al.** (2006). E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Br. J. Cancer* *94*, 661–671.
- Lu, Y., Nie, J., Liu, X., Zheng, Y., and Guo, S.-W.** (2010). Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, reduces lesion growth and hyperalgesia in experimentally induced endometriosis in mice. *Hum. Reprod.* *25*, 1014–1025.
- Martinez-Zamora, M. A., Mattioli, L., Parera, J., Abad, E., Coloma, J. L., van Babel, B., Galceran, M. T., Balasch, J., and Carmona, F.** (2015). Increased levels of dioxin-like substances in adipose tissue in patients with deep infiltrating endometriosis. *Hum. Reprod.* *0*, 1–10.
- Maruyama, T., and Yoshimura, Y.** (2012). Stem cell theory for the pathogenesis of endometriosis. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* *4*, 2854–2863.
- Masterarbeit Hötte, K.** (2014). Functional analysis of AJAP1 in endothelial cells Master Thesis Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main. Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Masuda, H. et al.** (2010). Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. *PLoS One* *5*, e10387.
- Matsuzaki, S., and Darcha, C.** (2012). Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis. *Hum. Reprod.* *27*, 712–721.
- Matsuzaki, S., and Darcha, C.** (2013a). In vitro effects of a small-molecule antagonist of the Tcf/ β -catenin complex on endometrial and endometriotic cells of patients with endometriosis. *PLoS One* *8*, e61690.
- Matsuzaki, S., and Darcha, C.** (2013b). Involvement of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in the cellular and molecular mechanisms of fibrosis in endometriosis. *PLoS One* *8*, e76808.
- Matsuzaki, S., Darcha, C., Maleysson, E., Canis, M., and Mage, G.** (2010). Impaired down-regulation of E-cadherin and beta-catenin protein expression in endometrial epithelial cells in the mid-secretory endometrium of infertile patients with endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *95*, 3437–3445.
- Mcdonald, J. M., Dunlap, S., Cogdell, D., Dunmire, V., Wei, Q., Starzinski-powitz, A., Sawaya, R., Bruner, J., Fuller, G. N., and Aldape, K.** (2006). The SHREW1 gene, frequently deleted in oligodendrogliomas, functions to inhibit cell adhesion and migration. *Cancer Biol. Ther.* *5*, 300–304.
- Meresman, G. F., Vighi, S., Buquet, R. a, Contreras-Ortiz, O., Tesone, M., and Rumi, L. S.** (2000). Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil. Steril.* *74*, 760–766.
- Mihm, M., Gangooly, S., and Muttukrishna, S.** (2011). The normal menstrual cycle in women. *Anim. Reprod. Sci.* *124*, 229–236.

- Milde, T., Pfister, S., and Korshunov, A.** (2009). Stepwise accumulation of distinct genomic aberrations in a patient with progressively metastasizing ependymoma. *Genes. Chromosomes Cancer* *238*, 229–238.
- Mirantes, C., Espinosa, I., Ferrer, I., Dolcet, X., Prat, J., and Matias-Guiu, X.** (2013). Epithelial-to-mesenchymal transition and stem cells in endometrial cancer. *Hum. Pathol.* *44*, 1973–1981.
- Mok-Lin, E. Y., Wolfberg, A., Hollinquist, H., and Laufer, M. R.** (2010). Endometriosis in a Patient with Mayer-Rokitansky-K??ster-Hauser Syndrome and Complete Uterine Agenesis: Evidence to Support the Theory of Coelomic Metaplasia. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* *23*, e35–e37.
- Monteiro, J. B., Col3n-D3az, M., Garc3a, M., Gutierrez, S., Col3n, M., Seto, E., Laboy, J., and Flores, I.** (2013). Endometriosis Is Characterized by a Distinct Pattern of Histone 3 and Histone 4 Lysine Modifications. *Reprod. Sci.*
- Montserrat, N., Mozos, A., Llobet, D., Dolcet, X., Pons, C., de Herreros, A. G., Matias-Guiu, X., and Prat, J.** (2012). Epithelial to mesenchymal transition in early stage endometrioid endometrial carcinoma. *Hum. Pathol.* *43*, 632–643.
- Munro, S. K., Farquhar, C. M., Mitchell, M. D., and Ponnampalam, a P.** (2010). Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol. Hum. Reprod.* *16*, 297–310.
- Nakagawa, M., Fukata, M., Yamaga, M., Itoh, N., and Kaibuchi, K.** (2001). Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J. Cell Sci.* *114*, 1829–1838.
- Nass, S., Herman, J., Gabrielson, E., and Iversen, P.** (2000). Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. *Cancer Res.*, 4346–4348.
- Nasu, K., Kawano, Y., Kai, K., Aoyagi, Y., Abe, W., Okamoto, M., and Narahara, H.** (2014). Aberrant histone modification in endometriosis. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* *19*, 1202–1214.
- Nasu, K., Kawano, Y., Tsukamoto, Y., Takano, M., Takai, N., Li, H., Furukawa, Y., Abe, W., Moriyama, M., and Narahara, H.** (2011). Aberrant DNA methylation status of endometriosis: epigenetics as the pathogenesis, biomarker and therapeutic target. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* *37*, 683–695.
- Nei, H., Saito, T., Yamasaki, H., Mizumoto, H., Ito, E., and Kudo, R.** (1999). Nuclear localization of beta-catenin in normal and carcinogenic endometrium. *Mol. Carcinog.* *25*, 207–218.
- Nelson, W. J., and Nusse, R.** (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* *303*, 1483–1487.
- Niessen, C. M., Leckband, D., and Yap, A. S.** (2011). Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol. Rev.* *91*, 691–731.
- Nishida, H., Suzuki, T., Kondo, S., Miura, H., Fujimura, Y., and Hayashizaki, Y.** (2006). Histone H3 acetylated at lysine 9 in promoter is associated with low nucleosome density in the vicinity of transcription start site in human cell. *Chromosome Res.* *14*, 203–211.
- Nisolle, M., Casanas-Roux, F., and Donnez, J.** (2000). Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice. *Fertil. Steril.* *74*, 306–312.
- Ohira, T. et al.** (2003). WNT7a induces E-cadherin in lung cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10429–10434.

- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., and Li, E.** (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.
- Okawa, E. R., Gotoh, T., Manne, J., Igarashi, J., Fujita, T., Silverman, K. a, Xhao, H., Mosse, Y. P., White, P. S., and Brodeur, G. M.** (2008). Expression and sequence analysis of candidates for the 1p36.31 tumor suppressor gene deleted in neuroblastomas. *Oncogene* 27, 803–810.
- Orsulic, S., Huber, O., Aberle, H., Arnold, S., and Kemler, R.** (1999). E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 8, 1237–1245.
- Ozawa, M., Hoschützky, H., Herrenknecht, K., and Kemler, R.** (1990). A possible new adhesive site in the cell-adhesion molecule uvomorulin. *Mech. Dev.* 33, 49–56.
- Pampaloni, F., Reynaud, E. G., and Stelzer, E. H. K.** (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 839–845.
- Panda, H., Pelakh, L., Chuang, T.-D., Luo, X., Bukulmez, O., and Chegini, N.** (2012). Endometrial miR-200c is altered during transformation into cancerous states and targets the expression of ZEBs, VEGFA, FLT1, IKK β , KLF9, and FBLN5. *Reprod. Sci.* 19, 786–796.
- Van Patten, K., Parkash, V., and Jain, D.** (2010). Cadherin expression in gastrointestinal tract endometriosis: possible role in deep tissue invasion and development of malignancy. *Mod. Pathol.* 23, 38–44.
- Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A.** (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* 7, 415–428.
- Peng, X., Cuff, L. E., Lawton, C. D., and DeMali, K. a** (2010). Vinculin regulates cell-surface E-cadherin expression by binding to beta-catenin. *J. Cell Sci.* 123, 567–577.
- Peterson, C. L., and Laniel, M.-A.** (2004). Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* 14, R546–R551.
- Polotsky, A. J., Zhu, L., Santoro, N., and Pollard, J. W.** (2009). Lithium chloride treatment induces epithelial cell proliferation in xenografted human endometrium. *Hum. Reprod.* 24, 1960–1967.
- Qi, L., Sun, B., Liu, Z., Cheng, R., Li, Y., and Zhao, X.** (2014). Wnt3a expression is associated with epithelial-mesenchymal transition and promotes colon cancer progression. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 33, 1–11.
- Redwine, D. B.** (2002). Was Sampson wrong? *Fertil. Steril.* 78, 686–693.
- Resch, E., Quaiser, S., Quaiser, T., Schneider, G., Starzinski-Powitz, A., and Schreiner, A.** (2008). Synergism of shrew-1's signal peptide and transmembrane segment required for plasma membrane localization. *Traffic* 9, 1344–1353.
- Rier, S. E., Martin, D. C., Bowman, R. E., Dmowski, W. P., and Becker, J. L.** (1993). Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam. Appl. Toxicol.* 21, 433–441.
- Rock, J. A., and Markham, S. M.** (1992). Pathogenesis of endometriosis. *Lancet* 340, 1264–1267.
- Ropero, S., and Esteller, M.** (2007). The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol. Oncol.* 1, 19–25.
- Van Roy, F., and Berx, G.** (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3756–3788.

- Rüdiger, M., Jockusch, B., and Rothkegel, M.** (1997). Epitope tag-antibody combination useful for the detection of protein expression in prokaryotic and eukaryotic cells. *Biotechniques* 23, 96–97.
- De Ruijter, A. J. M., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A. B. P.** (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 370, 737–749.
- Salamanca, A., and Beltrán, E.** (1995). Subendometrial contractility in menstrual phase visualized by transvaginal sonography in patients with endometriosis. *Fertil. Steril.* 64, 193–195.
- Samartzis, E. P., Noske, A., Samartzis, N., Fink, D., and Imesch, P.** (2013). The Expression of Histone Deacetylase 1, But Not Other Class I Histone Deacetylases, Is Significantly Increased in Endometriosis. *Reprod. Sci.*
- Sampson, J.** (1927). Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am. J. Pathol.* 3, 93–110.43.
- Saydam, O. et al.** (2009). Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing E-cadherin and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 29, 5923–5940.
- Schindelin, J. et al.** (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
- Schreiner, A., Ruonala, M., Jakob, V., Suthaus, J., Boles, E., Wouters, F., and Starzinski-Powitz, A.** (2007). Junction Protein Shrew-1 Influences Cell Invasion and Interacts with Invasion-promoting Protein CD147. *Mol. Biol. Cell* 18, 1272–1281.
- Scotti, S., Regidor, P., Schindler, A., and Winterhager, E.** (2000). Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.* 6, 610–617.
- Shaco-Levy, R., Sharabi, S., Benharroch, D., Piura, B., and Sion-Vardy, N.** (2008). Matrix metalloproteinases 2 and 9, E-cadherin, and beta-catenin expression in endometriosis, low-grade endometrial carcinoma and non-neoplastic eutopic endometrium. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 139, 226–232.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A.** (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5522–5527.
- Signorile, P. G., and Baldi, A.** (2010). Endometriosis: new concepts in the pathogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 778–780.
- Starzinski-Powitz, A., Zeitvogel, A., Schreiner, A., and Baumann, R.** (2001). In search of pathogenic mechanisms in endometriosis: the challenge for molecular cell biology. *Curr. Mol. Med.* 1, 655–664.
- Stefansson, H., Geirsson, R. T., Steinthorsdottir, V., Jonsson, H., Manolescu, a, Kong, a, Ingadottir, G., Gulcher, J., and Stefansson, K.** (2002). Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis. *Hum. Reprod.* 17, 555–559.
- Subauste, M. C., Pertz, O., Adamson, E. D., Turner, C. E., Junger, S., and Hahn, K. M.** (2004). Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *J. Cell Biol.* 165, 371–381.
- Taylor, R. N., Ryan, I. P., Moore, E. S., Hornung, D., Shifren, J. L., and Tseng, J. F.** (1997). Angiogenesis and macrophage activation in endometriosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 828, 194–207.
- Thomas, W. a et al.** (2013). α -Catenin and vinculin cooperate to promote high E-cadherin-based adhesion strength. *J. Biol. Chem.* 288, 4957–4969.

- Thompson, E. W., and Haviv, I.** (2011). The social aspects of EMT-MET plasticity. *Nat. Med.* *17*, 1048–1049.
- Thoreson, M., Anastasiadis, P., Daniel, J., Ireton, R., Wheelock, M., Johnson, K., Hummingbird, D., and Reynolds, A.** (2000). Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J. Cell Biol.* *148*, 189–202.
- Troncon, J. K., Carolina, A., Zani, T., Duarte, A., Vieira, D., Poli-neto, O. B., Nogueira, A. A., and Rosa-e-silva, J. C.** (2014). Case Report Endometriosis in a Patient with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome. *Case Rep. Obstet. Gynecol.* *2014*, 376231.
- Tulac, S. et al.** (2003). Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 3860–3866.
- Vestweber, D., and Kemler, R.** (1985). Identification of a putative cell adhesion domain of uvomorulin. *EMBO J.* *4*, 3393–3398.
- Vlahos, N. F., Economopoulos, K. P., and Fotiou, S.** (2010). Endometriosis, in vitro fertilisation and the risk of gynaecological malignancies, including ovarian and breast cancer. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* *24*, 39–50.
- Vleminckx, K., Vakaet, L., Mareel, M., Fiers, W., and van Roy, F.** (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* *66*, 107–119.
- Walpita, D., and Hay, E.** (2002). Studying actin-dependent processes in tissue culture. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 137–141.
- Wang, G. G., Allis, C. D., and Chi, P.** (2007). Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol. Med.* *13*, 363–372.
- Wang, Y., van der Zee, M., Fodde, R., and Blok, L. J.** (2010). Wnt/B-catenin and sex hormone signaling in endometrial homeostasis and cancer. *Oncotarget* *1*, 674–684.
- Weber, K., Bartsch, U., Stocking, C., and Fehse, B.** (2008). A multicolor panel of novel lentiviral “gene ontology” (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol. Ther.* *16*, 698–706.
- Welsch, U., and Deller, T.** (2010). *Sobotta Lehrbuch Histologie*, Elsevier GmbH.
- Wenzl, R. J., and Heinzl, H.** (1998). Localization of matrix metalloproteinase-2 in uterine endometrium and ectopic implants. *Gynecol. Obstet. Invest.* *45*, 253–257.
- Wheelock, M. J., and Johnson, K. R.** (2003). Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *19*, 207–235.
- White, P. S. et al.** (2005). Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma. *Oncogene* *24*, 2684–2694.
- Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T., and Oehme, I.** (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett.* *277*, 8–21.
- Witz, C. A.** (2002). Pathogenesis of endometriosis. *Gynecol. Obstet. Invest.* *53*, 52–62.
- Wozniak, M. A., Modzelewska, K., Kwong, L., and Keely, P. J.** (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim. Biophys. Acta* *1692*, 103–119.

- Wu, Y., Halverson, G., Basir, Z., Strawn, E., Yan, P., and Guo, S.-W.** (2005). Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *193*, 371–380.
- Wu, Y., Starzinski-Powitz, A., and Guo, S.-W.** (2007a). Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, attenuates invasiveness and reactivates E-cadherin expression in immortalized endometriotic cells. *Reprod. Sci.* *14*, 374–382.
- Wu, Y., Starzinski-Powitz, A., and Guo, S.-W.** (2008). Prolonged stimulation with tumor necrosis factor- α induced partial methylation at PR-B promoter in immortalized epithelial-like endometriotic cells. *Fertil. Steril.* *90*, 234–237.
- Wu, Y., Strawn, E., Basir, Z., Halverson, G., and Guo, S.-W.** (2006). Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (PR-B) in endometriosis. *Epigenetics* *1*, 106–111.
- Wu, Y., Strawn, E., Basir, Z., Halverson, G., and Guo, S.-W.** (2007b). Aberrant expression of deoxyribonucleic acid methyltransferases DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in women with endometriosis. *Fertil. Steril.* *87*, 24–32.
- Wu, Z.-Q., Li, X.-Y., Hu, C. Y., Ford, M., Kleer, C. G., and Weiss, S. J.** (2012). Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 16654–16659.
- Xiaomeng, X., Ming, Z., Jiezhi, M., and Xiaoling, F.** (2012). Aberrant histone acetylation and methylation levels in woman with endometriosis. *Arch. Gynecol. Obstet.* *287*, 487–494.
- Xiong, L., Edwards, C. K., and Zhou, L.** (2014). The biological function and clinical utilization of CD147 in human diseases: a review of the current scientific literature. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 17411–17441.
- Xue, Q. et al.** (2007a). Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium and endometriosis. *Biol. Reprod.* *77*, 681–687.
- Xue, Q., Lin, Z., Yin, P., Milad, M. P., Cheng, Y.-H., Confino, E., Reierstad, S., and Bulun, S. E.** (2007b). Transcriptional activation of steroidogenic factor-1 by hypomethylation of the 5' CpG island in endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *92*, 3261–3267.
- Yang, W.-M., Tsai, S.-C., Wen, Y.-D., Fejer, G., and Seto, E.** (2002). Functional domains of histone deacetylase-3. *J. Biol. Chem.* *277*, 9447–9454.
- Yap, A., Niessen, C., and Gumbiner, B.** (1998). The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J. Cell Biol.* *141*, 779–789.
- Yook, J. I., Li, X.-Y., Ota, I., Fearon, E. R., and Weiss, S. J.** (2005). Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J. Biol. Chem.* *280*, 11740–11748.
- Yoshimoto, T., Takino, T., Li, Z., Domoto, T., and Sato, H.** (2014). Vinculin negatively regulates transcription of MT1-MMP through MEK/ERK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *455*, 251–255.
- Zamah, N. M., Dodson, M. G., Stephens, L. C., Buttram, V. C., Besch, P. K., and Kaufman, R. H.** (1984). Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic nude mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *149*, 591–597.
- Zeisberg, M., and Neilson, E. G.** (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* *119*, 1429–1437.

Zeitvogel, A., Baumann, R., and Starzinski-Powitz, A. (2001). Identification of an invasive, N-cadherin-expressing epithelial cell type in endometriosis using a new cell culture model. *Am. J. Pathol.* *159*, 1839–1852.

Zeng, L., Fee, B. E., Rivas, M. V., Lin, J., and Adamson, D. C. (2014). Adherens junctional associated protein-1: a novel 1p36 tumor suppressor candidate in gliomas (Review). *Int. J. Oncol.* *45*, 13–17.

Zhang, Y., Sivasankar, S., Nelson, W. J., and Chu, S. (2009). Resolving cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 109–114.

9 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 9.1 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
[v/v]	Volumen zu Volumen-Verhältnis
[w/v]	Masse zu Volumen-Verhältnis
°C	Grad Celsius
5-AzaC	5-Azacytidin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BP	Birkenprofilin-Tag
bzw.	beziehungsweise
CHD1	E-Cadherin Gen
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoIP	Co-Immunpräzipitation
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DECMA1	E-Cadherin-Antikörper
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
EC	Cadherin-Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	und andere
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GSK3β	Glykogensynthase-Kinase 3β
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
k	Kilo (10 ³)
l	Liter
LCF/LEF	<i>T-cell factor/Lymphoid enhancer factor</i>
LiCl	Lithiumchlorid
μ	Mikro (10 ⁻⁶)

Abkürzung	Bedeutung
m	Meter oder milli (10^{-3})
M	Molarität (mol/l)
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
Min	Minute
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MW	molekularen Masse
n	Nano (10^{-9})
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
RIPA	Zellysepuffer (<i>radio immuno precipitation assay</i>)
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
U	Unit
ü. N.	über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
WB	Western Blot
ZEB	<i>zinc finger E-box binding homeobox</i>
z. B.	zum Beispiel

Tabelle 9.2 Aminosäuren

Aminosäure	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode
Alanin	A	Ala
Cystein	C	Cys
Asparaginsäure	D	Asp
Glutaminsäure	E	Glu
Phenylalanin	F	Phe
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Lysin	K	Lys
Leucin	L	Leu
Methionin	M	Met

Aminosäure	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode
Asparagin	N	Asn
Prolin	P	Pro
Glutamin	Q	Gln
Arginin	R	Arg
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thy
Valin	V	Val
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr

Tabelle 9.3 Nukleoside

Nukleosid	Abkürzung
Adenosin	A
Cytidin	C
Guanosin	G
Thymidin	T
Uridin	U

10 Anhang

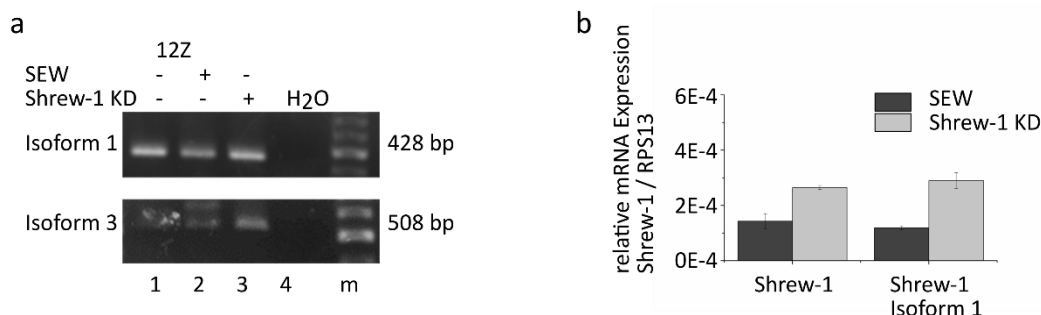


Abbildung 10.1 Expression der Shrew-1 Isoformen in den 12Z-Zelllinien

(a) Aus cDNA-Proben konnte für alle 12Z-Zelllinien die Expression der Shrew-1 Isoformen 1 und 3 gezeigt werden. Die Herunterregulation vermindert die Expression der beiden Isoformen nicht (Spur 3). Für den Nachweis der Isoform 1 wurden die Primer F_Shrew-1 und R_Exon 2_28mer verwendet. Für die Isoform 3 wurde der reverse Primer R_3'UTR_28mer verwendet, der für die Isoform 3 bei Amplifikat von 508 bp erzeugt. m = DNA-Leiter.

(b) Auch in qPCRs mit kommerziellen Primern konnte keine Reduktion der Expression der Isoformen von Shrew-1 in den 12Z-Zelllinien detektiert werden. Die Shrew-1-Expression scheint in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen sogar verstärkt zu sein. n = 2. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

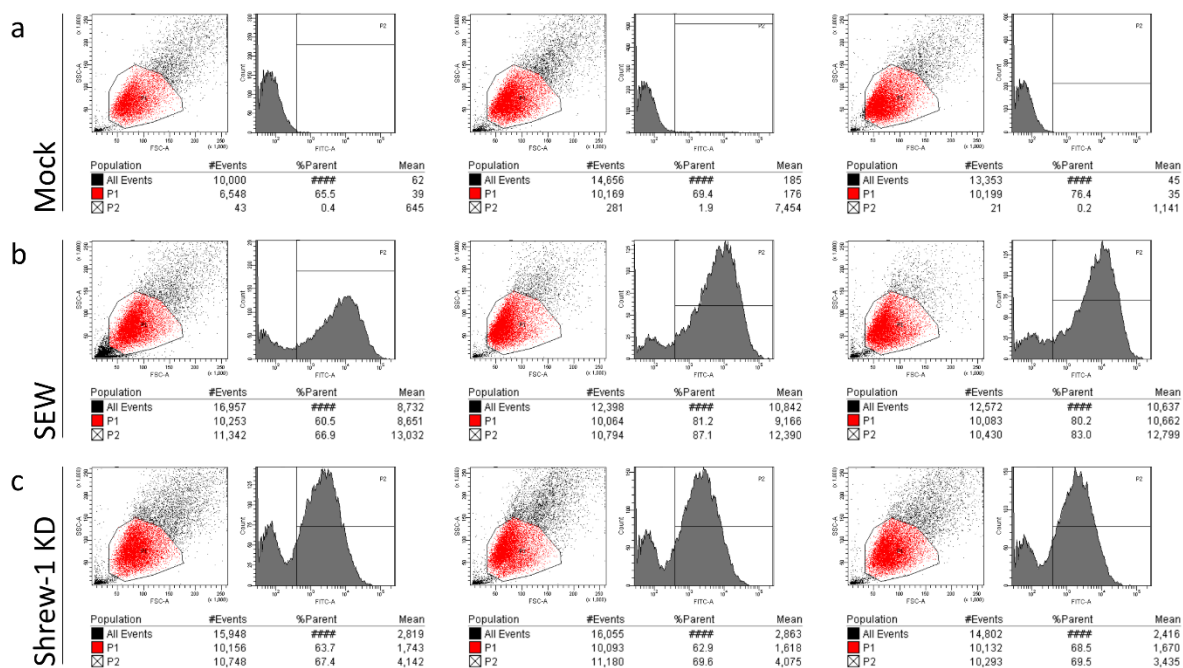


Abbildung 10.2 Transfektionseffizienz der 12Z-Zelllinien

Der Anteil der transduzierten, GFP-exprimierenden 12Z-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin von den Zellkulturschalen gelöst und mit PBS 1x gewaschen. Nach dem Fixieren mit PFA wurden die Zellen bis zur Messung im Dunkeln in PBS 1x gelagert. Unter den 12Z SEW (b) und den 12Z Shrew-1 KD (c) Zelllinien sind jeweils mindestens 67,4 % GFP-positive und somit transduzierte Zellen (P2). Die 12Z Mock-Zellen (a) exprimieren kein GFP. Die Messungen wurden mit dem FACSCanto von BD Biosciences durchgeführt.

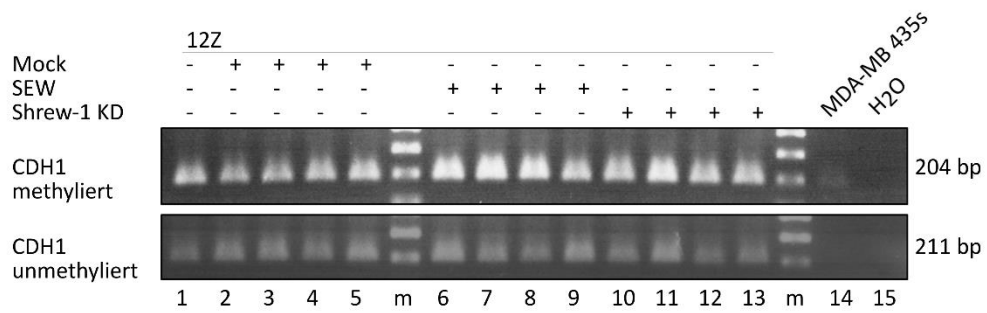


Abbildung 10.3: Die Shrew-1 Herunterregulation verändert die CDH1-Promotor-Methylierung in 12Z-Zellen nicht

MSP-Ergebnisse mit dem Primern F_bzw. R_Ecad_CH3 (methyliert) und F_bzw. R_Ecad_UN (unmethyliert) nach der Bisulfit-Konvertierung. Auch mit diesen Primern kann durch die Herunterregulation von Shrew-1 keine Veränderung in der Menge von methyliertem und unmethyliertem CDH1-Promotor in den 12Z-Zellen beobachtet werden. Rechts neben der Abbildung ist die Größe der Amplifikate angegeben. m = DNA-Leiter

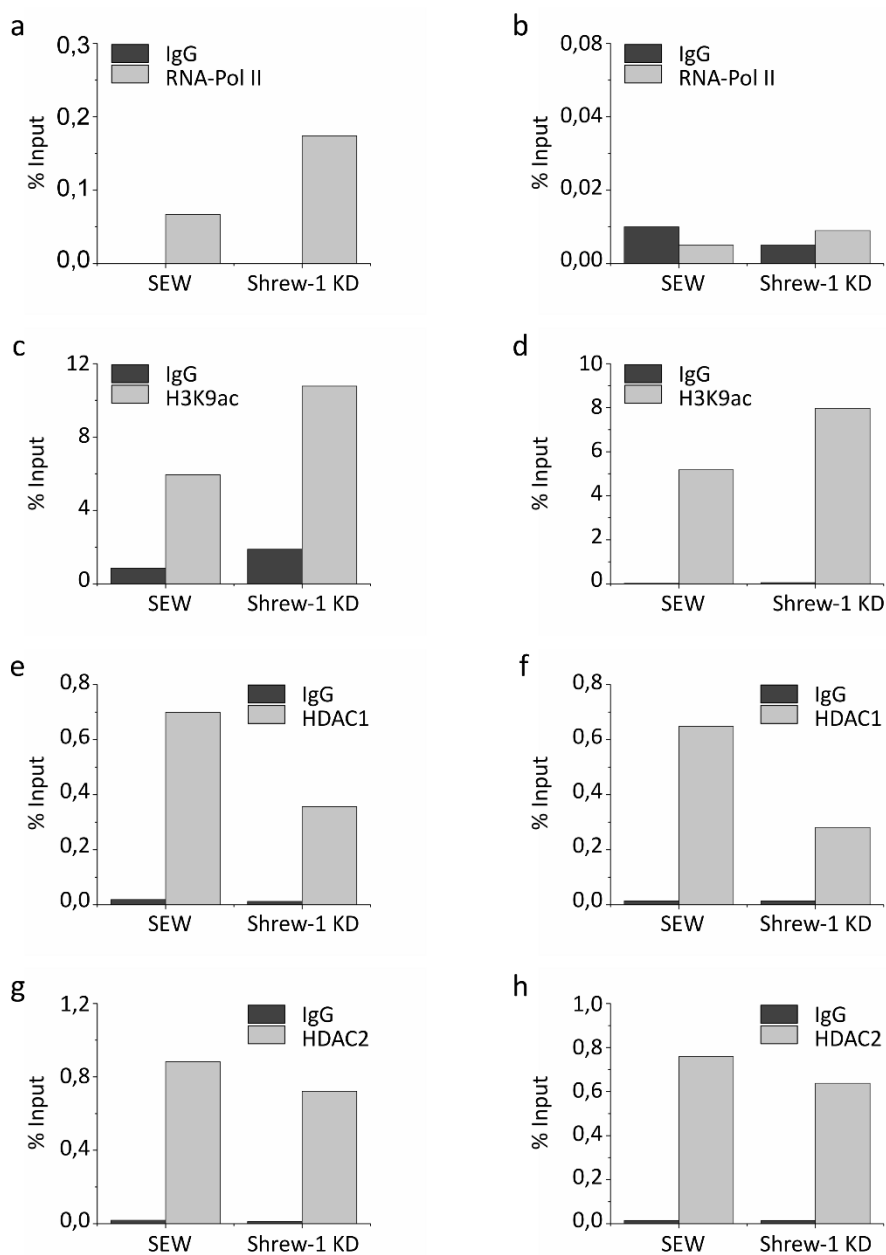


Abbildung 10.4 ChIP-Experimente mit den 12Z-Zellen

ChIP-Experimente wurden mit den 12Z-Zellen (Shrew-1 KD und SEW) mit Antikörpern gegen RNA-Pol II, H3K9ac, HDAC1 und HDAC2 durchgeführt. In anschließenden qPCRs konnte eine erhöhte Assoziation der RNA-Pol II (a und b) und H3K9ac (c und d) mit dem CDH1-Promotor in den 12Z Shrew-1 KD-Zellen detektiert werden im Vergleich zu den Kontrollzellen. HDAC1 (e und f) und HDAC2 (g und h) sind nach der Herunterregulation von Shrew-1 weniger mit der CDH1-Promotorregion assoziiert. In den qPCRs wurden die Primerpaare ChIP_cdh1_3 (a, b, c, e, f, g und h) und ChIP_cdh1_1 (d) verwendet. Jede qPCR-Reaktion wurde als Duplikat durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

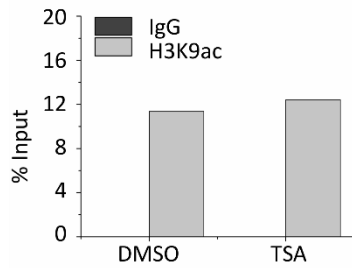


Abbildung 10.5: TSA verminderte H3K9-Acetylierung in 12Z-Zellen

Die CDH1-Promotor-Region ist bei Stimulation der 12Z-Zellen mit TSA (24h, 0,5 μ M) stärker mit der Modifikation H3K9ac assoziiert als in den Kontrollzellen (DMSO). In Bezug auf die H3K9-Acetylierung hat TSA somit den gleichen Effekt wie die Herunterregulation in den 12Z-Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten. In den qPCRs wurden das Primer-Set ChIP_CDH1_3 verwendet.

11 Publikation

„Shrew-1 prevents E-cadherin expression in endometriotic epithelial cells influencing their motile and invasive capacity“, in Vorbereitung

Hannah-Vanessa Paul^a, Petra Klemmt^a, Knut Engels^b, Jörn Lausen^c, Anna Starzinski-Powitz^a

^aInstitute for Cell Biology and Neuroscience, Molecular Cell Biology and Human Genetics, Goethe University, Max-von-Laue-Straße 13, 60438 Frankfurt (Main), Germany

^bZentrum für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Neuss, Am Hasenberg 44, 41462 Neuss, Germany

^cGeorg-Speyer-Haus, Institute for Tumor Biology and Experimental Therapy, Paul-Ehrlich-Straße 42-44, D-60596 Frankfurt (Main), Germany

12 Lebenslauf

13 Danksagung

Ich danke der Wilhelm Hahn und Erben-Stiftung für die finanzielle Unterstützung beim Druck meiner Dissertation.

14 Erklärung

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung im Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Bereich unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den _____

Unterschrift

Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation über

„Einfluss des Invasions-assoziierten Proteins Shrew-1 auf die E-Cadherin-Expression in epithelialen Endometriose-Zellen“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den _____

Unterschrift