Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität zu Lübeck Direktor: Herr Prof. Dr. med. A. Rody

Untersuchungen von Zellfunktionen an der Endometriose-Epithel-Zell-Linie Z-12 in einem Y-box-bindenden-Protein-1 Knock-Down Modell

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck -Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von Julia Lappe geb. Krampe aus Wismar

1. Berichterstatter/in :Prof. Dr. med. Daniela Hornung2. Berichterstatter/in:Prof. Dr. med. Jürgen GrabbeTag der mündlichen Prüfung:20.03.2015Zum Druck genehmigt. Lübeck, den:20.03.2015-Promotionskomission der Sektion Medizin-

Rostock, den 20.03.2015

Zusammenfassung

Die hier vorgelegte Arbeit befasst sich mit den spezifischen Zell/eigenschaften der Endometriose-Epithel-Zell-Linie Z-12 nach einem knock-down des Y-box-bindenden-Protein-1. YB-1 ist ein DNS/RNSbindender Transkriptionsfaktor, welcher die Genexpression in vielfältiger Weise reguliert. Er wird als potentielles Onkogen beschrieben und wurde in Tumorgewebe vermehrt nachgewiesen. YB-1 konnte auch in Endometriosezellen überexprimiert nachgewiesen werden. Dabei findet man vor allem eine erhöhte Rate von YB-1 in Epithelzellen von Endometrium von Patientinnen mit Endometriose sowie in endometriotischen Läsionen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein knockdown von YB-1 an der Endometriose-Epithel-Zell-Linie Z-12 durchgeführt werden. Bei dieser Zell-Linie handelt es sich um immortalisierte Endometriosezellen, die durch eine Biopsie gewonnen wurden. Sie besitzen nachweislich die gleichen Eigenschaften wie normale Endometriosezellen. Im Experiment schlossen sich dem erfolgreichen knockdown von YB-1 die Untersuchungen der Zellfunktionen an. Zunächst wurde die Proliferation der Zellen mit und ohne Transfektion der YB-1-siRNS betrachtet. Hierfür wurde ein MTT-Stoffwechseltest durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der Reduktion von YB-1 in den Zellen eine verminderte Proliferation der Zellen folgte. Gleichsinnig konnte mit einem Apoptoseassay eine Erhöhung der Zellapoptoserate nach TNF- α -Stimulation und YB-1-Reduktion beobachtet werden. YB-1 scheint demnach in Endometriosezellen das Zellwachstum zu fördern, indem es sowohl die Proliferationsrate steigert als auch die Apoptoserate senkt. Eine weitere Eigenschaft, die Endometrioseherde besitzen, ist die Fähigkeit zur Invasion. Diese wurde im Rahmen dieser Arbeit mit einem Filter-sandwichassay untersucht. Es konnte die Tendenz dargelegt werden, dass mit einem YB-1-knock-down eine verminderte Invasionsrate der Z-12-Zellen einhergeht.

Ein weiterer Aspekt, der in dieser Arbeit untersucht wurde, ist der Einfluss von inflammatorischen Modulatoren auf die Pathogenese von Endometriose. In Untersuchungen konnten vermehrte Mengen an inflammatorischen Mediatoren bei Endometriosepatientinnen gefunden werden. Insbesondere wurde das β -Chemokin RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*) in erhöhten Konzentrationen identifiziert. Es ist vor allem für die Chemoattraktion von zirkulierenden Monozyten, Makrophagen und anderen Immunzellen verantwortlich. RANTES wurde in dieser Untersuchung mittels eines RANTES-ELISAs quantifiziert, wobei die Z-12-Zellen vor dem Assay mit TNF- α stimuliert worden waren. Die Ergebnisse legen dar, dass durch die Reduktion von YB-1 in den Zellen eine vermehrte RANTES-Expression in den TNF- α stimulierten Zellen ausgelöst wird, was auf eine anti-inflammatorische Eigenschaft von YB-1 hindeutet.

Eine hohe YB-1 Konzentration scheint diesen Untersuchungen nach eine Schlüsselfunktion in der Entstehung und Entwicklung von Endometriose zu besitzen. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten zukünftig für neue Ansatzpunkte in der Therapie von Endometriose dienen.

Abstract

This thesis deals with the specific cell functions of the endometriotic cellline Z-12 after the knock-down of an DNA/RNA binding transcription factor, called YB-1 (Y box binding protein 1). It regulates the expression of different genes in specific ways and is described as an oncogene, which was found overexpressed in tumor tissue. YB-1 was found increased in tissue of endometrium, which was analyzed after biopsies of patients with endometriosis and as well in endometriotic lesions. Furthermore, different cell functions after knock-down of YB-1 were in focus during the performed analysis. First, the proliferation rate was detected by a MTT-test. It showed a decreased proliferation rate of the Z-12 cells after knock-down of YB-1. Corresponding to this observation, the study of apoptosis showed increased apoptotic function after a stimulation with TNF- α and YB-1 knock-down in Z-12 cells. This was investigated in an sandwich-immuno-assay. A further aspect of endometriotic cells is the ability of invasion into tissue. A tendency of decreased invasion after knock-down of YB-1 in Z-12 cells could be shown. In the development of endometriosis the significance of inflammatory modulators was found. Notably is the β chemokine RANTES, which is reliable for the chemoattraction of monocyts, macrophages and further immune cells. RANTES was found in an increased amount in peritoneal fluid of patients with endometriosis. The β -chemokine was analyzed in RANTES-ELISA after stimulation of the Z-12 cells with TNF- α . The result showed an increase of RANTES-concentration in the cells after downregulation of YB-1. A high concentration of YB-1 appears to be a keyfactor in the pathogenesis and development of endometriosis, which could imply a pitch point to strategize a new therapy of endometriosis.

vi

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einl	Einleitung		
	1.1	Klinisc	he Aspekte der Endometriose	4
	1.2	Sympt	omatik	4
	1.3	Pathog	genese	5
	1.4	Inflam	matorische Mediatoren bei Endometriose	7
	1.5	Famili	e der Y-box-bindenden-Proteine	8
	1.6	Aufba	u eukaryontischer Y-box-bindender-Proteine	8
	1.7	Funkti	onen von YB-1	9
	1.8	Lokali	sationen von YB-1	12
	1.9	Zielset	zung der Arbeit	13
	1.10	Dieser	Arbeit vorausgehende Untersuchungen	14
2	Met	hoden	und Materialien	19
	2.1	Materi	alien	19
		2.1.1	Materialien für die Zellkultur	19
		2.1.2	Materialien für die Transfektion	20
		2.1.3	Materialien zur Effizienzüberprüfung	20
		2.1.4	Materialien für den Westernblot	20
		2.1.5	Materialien für die Proliferationsuntersuchung	23
		2.1.6	Materialien für die Apoptoseuntersuchungen	23
		2.1.7	Materialien für die RANTES Bestimmung	23
		2.1.8	Materialien für die Invasionsuntersuchungen	24
	2.2	Techni	sche Geräte	24
		2.2.1	Software	25
	2.3	Eigens	chaften der Zell-Linie	25
	2.4	Kultivi	erung der Z-12-Zellen	26
		2.4.1	Transfektion der kultivierten Z-12-Zellen	27

	2.5 Prüfung der Transkriptionseffizienz mit fluoreszierender siRNS 27			
	2.6 Prüfung des YB-1- <i>knock-downs</i> auf Proteinebene 28			
		2.6.1 Westernblot	28	
	2.7	Analyse der Zellproliferation in Z-12-Zellen nach Transfektion	29	
	2.8	Analyse der Zellinvasion	30	
		2.8.1 Herstellung des Filtersandwiches	30	
		2.8.2 Auftragung und Färbung der Zellen	31	
		2.8.3 Messung der Emission/Zellzählung	32	
		2.8.4 Berechnung der Invasionsraten	32	
		2.8.5 Berechnung der totalen Adhäsion:	33	
	2.9	Apoptoseanalyse an transfizierten Z-12-Zellen nach Stimulierung mit		
		$TNF\alpha$	33	
	2.10	RANTES-Quantifizierung in stimulierten und transfizierten Z-12-Zellen .	34	
		2.10.1 RANTES-ELISA	34	
	2.11	Statistische Auswertung der Daten	36	
0	Euro	1	07	
3	Erge	Dnisse	3/	
	3.1	Nachweis der <i>knock-adwn</i> -Effizienz	3/	
		3.1.1 Mikroskopische Emzienzuberprufung des <i>knock-down</i> -Experiments	3/	
	2.0	3.1.2 <i>knock-down</i> -Effekt von YB-1 auf Proteinebene	3/	
	3.2	Beennussung der Proliferation von Z-12-Zellen nach YB-1-knock-down .	41	
		Findless das VD 1 burgh daums auf die Anantassin dubtien in 7.19.7-Illen	11	
	3.3	Einfluss des YB-1- <i>knock-downs</i> auf die Apoptoseinduktion in Z-12-Zellen	41	
	3.3 3.4	Einfluss des YB-1- <i>knock-downs</i> auf die Apoptoseinduktion in Z-12-Zellen Einfluss der YB-1-Expression auf die RANTES-Expression durch TNF- α .	41 44	
	3.3 3.4 3.5	Einfluss des YB-1-knock-downs auf die Apoptoseinduktion in Z-12-Zellen Einfluss der YB-1-Expression auf die RANTES-Expression durch TNF- α . Beeinflussung der Invasion von Z-12-Zellen durch den YB-1-knock-down	41 44 46	
4	3.3 3.4 3.5 Disk	Einfluss des YB-1- <i>knock-downs</i> auf die Apoptoseinduktion in Z-12-Zellen Einfluss der YB-1-Expression auf die RANTES-Expression durch TNF- α . Beeinflussung der Invasion von Z-12-Zellen durch den YB-1- <i>knock-down</i> ussion	41 44 46 49	
4	3.3 3.4 3.5 Disk	Einfluss des YB-1- <i>knock-downs</i> auf die Apoptoseinduktion in Z-12-Zellen Einfluss der YB-1-Expression auf die RANTES-Expression durch TNF- α . Beeinflussung der Invasion von Z-12-Zellen durch den YB-1- <i>knock-down</i> ussion	41 44 46 49	
4 A	3.3 3.4 3.5 Disk	Einfluss des YB-1- <i>knock-downs</i> auf die Apoptoseinduktion in Z-12-Zellen Einfluss der YB-1-Expression auf die RANTES-Expression durch TNF- α . Beeinflussung der Invasion von Z-12-Zellen durch den YB-1- <i>knock-down</i> ussion	 41 44 46 49 57 57 	
4 A	3.3 3.4 3.5 Disk	Einfluss des YB-1- $knock$ - $downs$ auf die Apoptoseinduktion in Z-12-Zellen Einfluss der YB-1-Expression auf die RANTES-Expression durch TNF- α . Beeinflussung der Invasion von Z-12-Zellen durch den YB-1- $knock$ - $down$ ussion	 41 44 46 49 57 57 57 	
4 A	3.3 3.4 3.5 Disk	Einfluss des YB-1-knock-downs auf die Apoptoseinduktion in Z-12-Zellen Einfluss der YB-1-Expression auf die RANTES-Expression durch TNF-α Beeinflussung der Invasion von Z-12-Zellen durch den YB-1-knock-down ussion Lebenslauf A.1.1 Veröffentlichung	41 44 46 49 57 57	
4 A	3.3 3.4 3.5 Disk A.1	Einfluss des YB-1-knock-downs auf die Apoptoseinduktion in Z-12-Zellen Einfluss der YB-1-Expression auf die RANTES-Expression durch TNF-α Beeinflussung der Invasion von Z-12-Zellen durch den YB-1-knock-down ussion Lebenslauf A.1.1 Veröffentlichung	41 44 46 49 57 57	

Abkürzungsverzeichnis

YB-1	Y-box-bindendes-Protein-1	
RANTES	regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted	
rAFS	revised american fertility society	
TNF α	Tumornekrosefaktor α	
DNS	Desoxyribonukleinsäure	
RNS	Ribonukleinsäure	
mRNS	messenger RNS	
dsRNS	doppelsträngige RNS	
siRNS	small interfering RNS	
Rt	Raumtemperatur	
ECL-Reagenz	elektrochemilumineszierendes Reagenz	
DbP b	DNA binding protein b	
CSP	cold shock protein	
CSD	cold shock domain	
MSY1	mouse Y-box-Protein-1	
FRGY1,2	frog Y-box-Protein- 1,- 2	
GST	Gluthation-S-Transferase	
EGFR	epidermal growth factor receptor	
MMP	Matrixmetalloprotease	

МАРК	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
MHC-2	major histocompatibility complex
HLA-DR	human leucocytes antigen
MDR-1	multidrug resistance Gene 1
CRS	cytoplasmatic retention signal
МТТ	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NT-siRNS	non targeting small interfering Ribonukleinsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
NSCLC	non small cell lung cancer
BAX	BCL-2 X protein
NOXA	NADPH oxidase activator
IL-1 α	Interleukin-1 α
MMP-1	Matrixmetalloprotease-1 (intestinale Kollagenase)
MMP-3	Matrixmetalloprotease-3 (Stromelysin-1)
MMP-9	Matrixmetalloprotease-9 (Gelatinase-B)
MMP-10	Matrixmetalloprotease-10 (Stromelysin-2)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
HRP	horse raddish peroxidase
PBS	phosphate buffered saline
FKS	Fetales Kälberserum
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Serum
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween 20

Kapitel 1

Einleitung

Endometriose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung von Frauen, die im klinischen Alltag große therapeutische sowie diagnostische Probleme aufwirft. Eine vollständige Erklärung der Pathogenese, eine zuverlässige nicht-invasive Diagnostik sowie eine kausale Therapie existieren nicht. Es besteht ein großes Interesse, die Entität von Endometriose weiter aufzuklären. Der Transkriptionsfaktor YB-1 wurde bisher insbesondere im Zusammenhang mit verschiedenen Tumorgeschehen und chronischen Erkrankungen untersucht und konnte als wichtiger Einflussfaktor identifiziert werden.

In Experimenten, die dieser Arbeit vorausgingen, konnte YB-1 in Endometriosegewebe nachgewiesen und selektiert werden. Eine Verknüpfung von YB-1 mit der Entwicklung und Entstehung von Endometriose liegt nahe. Es ist das Ziel dieser Dissertation, diese interessante Verbindung weiter zu untersuchen, um spezifische Eigenschaften von Endometrioseherden genauer erklären zu können. Auch in Hinblick auf neue therapeutische Konzepte wäre eine tiefreichende Untersuchung von Nutzen.

Im ersten Abschnitt werden zunächst klinische sowie pathophysiologische Aspekte der Endometriose dargestellt. Außerdem gibt er eine Synopsis über den Aufbau und die Lokalisation des Transkriptionsfaktors YB-1 und dessen wichtigste Funktionen in der Zelle. Ebenso wird eine Übersicht über den inflammatorischen Mediator RANTES gegeben. Im Speziellen wird hierbei sowohl der Einfluss von RANTES auf den pathophysiologischen Prozess von Endometriose betrachtet als auch der Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor YB-1 erläutert.

1.1 Klinische Aspekte der Endometriose

Endometriose ist eine gutartige Erkrankung von Frauen, bei der endometriales Gewebe (Endometrium, Drüsen und Stromagewebe) außerhalb der Gebärmutter (griech. ektop) auftritt.

Von dieser in der Gynäkologie häufigen und oft problematischen Erkrankung sind bis zu 10% der Frauen im reproduktionsfähigen Alter betroffen. Besonders unter Patientinnen mit Fertilitätsproblemen kann man ein verstärktes Vorkommen von ektopem Endometriosegewebe beobachten (20-50%).

Die tatsächliche Prävalenz dieser Erkrankung ist aufgrund der schwierigen Diagnostik unbekannt. Eine eindeutige Diagnose kann nur durch eine Laparoskopie bzw. Laparotomie gestellt werden.

Endometriosegewebe besitzt Eigenschaften, die dem eines malignen Tumors ähneln. Es weist eine tiefe Invasion ins Gewebe, eine verstärkte Angiogenese sowie eine Dissemination und eine hohe Rezidivhäufigkeit auf.

1.2 Symptomatik

Im Durchschnitt vergehen ca. 6-9 Jahre zwischen dem Auftreten erster Symptome und einer Diagnosestellung, was für die Patientinnen einen verlängerten Leidensweg und stärkere Einschränkung der Lebensqualität bedeutet. Bei Patientinnen mit Endometriose treten häufig sekundäre Dysmenorrhoen, Dyspareunie, Defäkationsschmerzen sowie Infertilität auf. Der organische Befund korreliert dabei häufig nicht mit der Heftigkeit der Schmerzen und dem Ausmaß der Beschwerden.

Patientinnen mit einem massiven Befund können über mäßige Beschwerden berichten, während Patientinnen mit einem dezenten Befund über starke Beschwerden klagen. Die Rezidivhäufigkeit ist stark variabel und korreliert ebenfalls nicht mit dem organischen Befund bzw. dem Ausmaß der Herdstrukturen. Es wurde jedoch eine Häufung von Rezidiven im Stadium IV nach der rAFS-Klassifikation (*revised american fertility society*) (Tabelle 1.1) festgestellt. Eine Assoziation von Endometriose mit einem erhöhten Risiko einer Tumorentstehung insbesondere dem Ovarialkarzinom wird diskutiert. Bei ca. 2 % der Patientinnen mit ovariellen Endometriomen kann sich ein Ovarialkarzinom vom endometrialen Typ entwickeln, welches dann häufig einen höheren Differenzierungsgrad aufweist und schlechter auf Chemotherapie anspricht (Ridley, 1966), (Czernoblisky et al., 1970), A (2010). Frauen mit Endometriose besitzen im Gegensatz zu gesunden Frauen ein höheres Risiko, an verschiedensten Tumoren zu erkranken. Sie erkranken beispielsweise häufiger an Tumoren mit endokriner Aktivität, Hirntumoren oder Non-Hodgkin-Lymphomen (Ulrich et al., 2003).

1.3 Pathogenese

Die Entstehung der Endometriose bleibt bis heute unvollständig geklärt. Es existieren tatsächlich verschiedene pathogenetische Mechanismen. Keine der bisher bestehenden Theorien kann jedoch die Pathogenese ausreichend beschreiben.

- 1. Die Theorie der retrograden Menstruation (**Transplantationstheorie**) beruht auf der Annahme, dass während der Menstruation Endometriumgewebe retrograd über die Tuben in die Bauchhöhle gelangt. Bei operativen Untersuchungen konnte man bei 90 % der Frauen, die zum Zeitpunkt der Menses operiert wurden, eine retrograde Menstruation feststellen. Die vitalen Endometriumzellen implantieren sich jedoch nur bei einem geringen Prozentsatz von Frauen (Sampson, 1927). Es ist daher anzunehmen, dass weitere Faktoren daran beteiligt sind, weshalb nicht alle ektopen Schleimhautfragmente eliminiert werden können und sich Endometriose entwickelt.
- 2. Die **Theorie der Metaplasie** beschreibt, dass wiederholte Irritationen des Zölomepithels zur Metaplasie der entsprechenden Gewebeart (z.B. Endometriosezellen) führen (Meyer, 1919).
- 3. **Die Stammzelltheorie** nimmt in der heutigen Forschung einen wichtigen Stellenwert ein. Die Feststellung, dass in Menstruationsblut Stammzellen vorhanden sind, führte zu weiteren Schlussfolgerungen und Vorstellungen über die Entstehung von Endometriose. Meng et al. konnten spezifische Marker für embryonale Stammzellen bzw. adulte multipotente Zellen in Menstruationsblut nachweisen (Meng et al., 2007). Dieselben Zellen zeigten eine stark erhöhte Proliferationsrate sowie die Fähigkeit, sich in mesodermale, ektodermale und endodermale Zell-Linien zu differenzieren. Diese Theorie unterstützt die von Sampson entwickelte Theorie der retrograden Menstruation (Sampson, 1927).

Endometriose		<1 cm	1-3 cm	>3cm
Peritoneum	oberflächlich	1	2	4
	tief	2	4	6
Ovar	rechts oberflächlich	1	2	4
	rechts tief	4	16	20
	links oberflächlich	1	2	4
	links tief	4	16	20
Douglasobliterationen			teilweise	komplett
			4	40
Adhäsionen		1/3	2/3	>2/3
	rechts zart	1	2	4
	rechts dicht	4	8	16
	links zart	1	2	4
	links dicht	4	8	16
Tube	rechts zart	1	2	4
	rechts dicht	4*	8*	16
	links zart	1	2	4
	links dicht	4*	8*	16*

Tabelle 1.1: rAFS	Klassifikation

*bei komplettem Tubenverschluss \Longrightarrow 16 Punkte

AFS-Grad I	1-5	Punkte
AFS-Grad II	6-15	Punkte
AFS-Grad III	16-40	Punkte
AFS-Grad IV	>40	Punkte

- 4. Inflammatorische Ansätze: Bei der Makrophagenhypothese wird davon ausgegangen, dass sich im Peritonealraum eine erhöhte Makrophagenanzahl befindet. Diese spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung eines lokalen Entzündungsprozesses.
- weitere Konzepte: Archimetra-Konzept/*tissue-injury-and-repair*-Konzept (TIAR) (Leyendecker et al., 1998), Aromatasekonzept (Ebert et al., 2003).

1.4 Inflammatorische Mediatoren bei Endometriose

Im Laufe der letzten Jahrzehnte konnte anhand verschiedener Untersuchungen eine erhöhte Anzahl an Makrophagen in der Peritonealflüssigkeit von infertilen Frauen mit Endometriose nachgewiesen werden (Haney et al., 1981),(Badawy et al., 1984),(Olive et al., 1985). Auch andere Studien stützen die These, dass Endometriose ein entzündlicher Prozess ist, an welchem Immunzellen beteiligt sind (Ho et al., 1997),(Oral et al., 1996),(Dadawy et al., 1984). Als ein wichtiges Zytokin wurde das 8 kDa große β -Chemokin RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*) identifiziert. Es ist unter anderem für die Chemoattraktion von zirkulierenden Monozyten, Makrophagen, aktivierten T-Zellen und eosinophilen Granulozyten verantwortlich.

In der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose befinden sich vorrangig aktivierte T-Zellen und Monozyten, die von RANTES angelockt werden. Bei Patientinnen mit Endometriose werden ca. 70 % der Chemoattraktion durch RANTES reguliert (Hornung et al., 2001). Dem β -Chemokin RANTES wurde weiterhin bei der Pathogenese anderer entzündlicher Erkrankungen eine Bedeutung beigemessen (z.B. bei der Entstehung von Atherosklerose (Krohn, 2008)).

Krohn et al. konnten einen Transkriptionsfaktor (YB-1) ausmachen, der an dem Promotor von RANTES bindet und die Expression in glatten Muskelzellen positiv beeinflusst (Krohn, 2008). Hornung et al. konnten das RANTES-Protein immunhistochemisch und RANTES-mRNS per in situ-Hybridisierung im Stroma von eutopem Endometrium sowie in Geweben von ektopen endometrialen Läsionen nachweisen (Hornung et al., 2001). Von Lebovic et al. wurde ebenfalls eine erhöhte Expression von RANTES in Gewebeproben von Endometrioseherden festgestellt (Lebovic et al., 2001). Die Epithelzellen per se zeigten keine Produktion von RANTES, jedoch ist anzunehmen, dass sie durch parakrine Sekretion von TNF α die Stromazellen zu einer vermehrten Produktion von RANTES anregen können (Zhao et al., 2002). Es konnte eine Proportionalität zwischen der Konzentration von Zytokinen in der Peritonealflüssigkeit und dem Krankheitsstadium nachgewiesen werden. Die höchste Konzentration von RANTES wurde in der Peritonealflüssigkeit von Patientinnen im Stadium IV (rAFS-Klassifikation) von Endometriose gefunden (Khorram et al., 1993).

1.5 Familie der Y-box-bindenden-Proteine

Die Familie der Y-box-bindenden-Proteine umfasst eine Gruppe von prokaryontischen und eukaryontischen Proteinen, die spezifisch an eine Region der DNS oder RNS binden. Die Konsensussequenz der Y-box lautet: CTG<u>ATTGG</u>. In der Y-box ist die inverse Sequenz CCAAT enthalten, über welche verschiedene Gene reguliert werden können (Wolffe et al., 1992). Bei den prokaryontischen Proteinen konnte man feststellen, dass die Expression von YB-1 stark zunahm, wenn die prokaryontischen Organismen in kürzester Zeit von 37 °C auf 10 °C abgekühlt wurden. Die Transkriptions- und Translationsrate sank in den untersuchten prokaryontischen Zellen auf den Kältereiz hin stark ab. Dieser Mechanismus dient den Bakterien als Schutz vor Stress bei Kälteexposition. Auf diese Beobachtung zurückführend benannte man die prokaryontischen Proteine Kälteschockproteine (*cold shock proteins*, CSP) (Goldstein et al., 1990).

Ein in den letzten Jahren an Bedeutung gewinnender Vertreter der Y-box-bindenden Protein-Familie ist das Y-box-bindende-Protein-1 (YB-1), auch bekannt als DNS-

bindendes-Protein B (DbP B). YB-1 besitzt eine Größe von 35kDa und ist ein sehr stark konserviertes Protein (Didier et al., 1988). Weitere ähnlich dem YB-1 aufgebauten Vertreter sind das MSY1 der Maus und FRGY1 und FRGY2, welche beim glatten Krallenfrosch (Xenopus laevis) entdeckt wurden (Tafuri et al., 1993), (Tafuri and Wolffe, 1990). Y-box-bindende-Proteine konnten in allen bisher untersuchten Eukaryonten nachgewiesen werden.

1.6 Aufbau eukaryontischer Y-box-bindender-Proteine

Der Transkriptionsfaktor YB-1 ist aus drei verschiedenen Domänen aufgebaut: Ein variabler Prolin/Alanin-reicher N-Terminus, eine hochkonservierte zentrale nukleinsäu-

Einleitung

rebindende Domäne von ca. 70 Aminosäuren (Kälteschock-Domäne) und ein hydrophiles C-terminales Ende, welches abwechselnd aus aromatischen und basischen Regionen aufgebaut ist. Die zentrale hochkonservierte Region zeigt eine starke Übereinstimmung mit den Kälteschock-Proteinen der prokaryontischen Zellen, weswegen die zentrale Domäne als Kälteschockdomäne (cold shock domain, CSD) bezeichnet wird. Man konnte diese bei fast allen bisher untersuchten Eukaryonten (außer bei Saccharomyces cerevisiae) nachweisen. Die CSD besteht aus oligonukleotid- und oligosaccharidbindenden Strukturen, die aus fünf β -Strängen bestehen, welche eine β -Fass-Struktur bilden. In die β -Stränge sind zwei RNS-bindende Sequenzen eingebaut (Graumann and Marahiel, 1996). Tafuri und Wolffe et al. konnten in Deletionsversuchen feststellen, dass allein die Kälteschock-Domäne für die Erkennung der Einzelstrang-DNS, Doppelstrang-DNS und RNS verantwortlich ist (Tafuri and Wolffe, 1992),(Kolluri et al., 1992). 2001 konnten Okamoto et al. jedoch darlegen, dass die CSD allein nicht ausreichend für die Bindung ist (Okamoto et al., 2001). Sie erarbeiteten mit Hilfe von GST-YB-1 Fusionspoteinen (Gluthation-S-Transferase) sowie 5 Deletionsmutanten die verschiedenen Bindungseigenschaften. Dabei zeigte sich, dass das YB-1-Protein in kompletter Ausprägung sowie die Mutanten 1 und 2, die jeweils alle drei Domänen in unterschiedlicher Ausprägung enthielten, an die Y-box binden konnten. Die anderen GST Fusionsproteine, die entweder keine CSD, keine N-terminale Domäne oder keine C-terminale Domäne enthielten, konnten nicht oder nur in einem geringen Anteil an die doppelsträngige DNS binden. Dies führte zu der Annahme, dass die Kälteschockdomäne benötigt wird, jedoch für die Bindung an Nukleinsäuren nicht allein verantwortlich ist. Kohno et al. entdeckten eine weitere Region neben der C-terminalen Domäne gelegen, die eine ähnlich hohe Bindungskapazität für DNS aufweist (Okamoto et al., 2001).

Im Gegensatz zu den eukaryontischen Vertretern agieren die prokaryontischen Proteine als RNS-Chaperone. Sie destabilisieren die Sekundärstruktur der RNS und können auf diesem Wege die Translation bei niedrigen Temperaturen regulieren (Jiang et al., 1997).

1.7 Funktionen von YB-1

Das eukaryontische YB-1 ist ein vielfältiges Protein, welches sowohl die Transkription als auch die Translation regulieren kann. Um dies zu ermöglichen, ist es in der Lage, an DNS und RNS (Doppel- und Einzelstrangelemente) zu binden (Ladomery and Sommerville, 1995). Y-box-bindende-Proteine fungieren des Weiteren als DNS-Reparaturproteine und beeinflussen Chromatin-Modifikationsproteine sowie DNS-Verpackungsproteine.

Die Y-box-Sequenzen befinden sich in vielen DNS-Transkriptions-Kontroll-Regionen verschiedener Gene. Viele dieser Gene sind mit Zelltodmechanismen assoziiert. Beispiele dafür sind das FAS-Gen oder das Tumorsupressorgen p53, welches in Zusammenhang mit der Duplikation der Zentromerregion gebracht wird. Die Hemmung von YB-1 mit *antisense* Oligonukleotiden induziert den p53-abhängigen Zelltod (Okamoto et al., 2000), (Homer et al., 2005).

YB-1 reguliert des Weiteren positiv Gene, die mit der Zellproliferation verknüpft sind. Beispiele hierfür sind der epidermal growth factor receptor (EGFR),

die Matrixmetalloproteinase-2, die DNS Topoisomerase 2a α , PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und die Thymidinkinase (Sakura et al., 1988), (Mertens et al., 1999), (Shibao et al., 1999), (Travali et al., 1989), (Lipson et al., 1989). YB-1 ist in Zellen mit hoher Zellproliferationsrate stärker exprimiert als in Gewebe mit normaler Proliferationsrate, so zum Beispiel in Embryogewebe, in fetalem Lebergewebe sowie in Lebergewebe, welches sich nach einem Gewebeschaden regeneriert, und in kolorektalem Mukosagewebe mit einer hohen Proliferationsrate (Grant and Deeley, 1993), (Ladomery and Sommerville, 1995). Wichtige Proteine, die unter anderem von YB-1 als Transrepressor oder Transaktivator reguliert werden und eine Rolle in der Entstehung von Endometriose spielen, sind die Matrixmetalloproteinase und die Gelatinase A. Sie übernehmen bei der Angiogenese, der Metastasierung und auch bei der chronischen Inflammation eine wichtige Rolle. Eine negative Regulierung durch YB-1 wurde als erstes von Didier et al. bereits schon 1988 an Genen des MHC2 (*major histocompatibility complex 2*) beschrieben (Didier et al., 1988). Sie beobachteten, dass die Konzentration von YB-1-mRNS invers zur Expression von HLA-DR (*human leucocytes antigen*) ist.

Ferner reguliert YB-1 das Zytokin RANTES, das eine wichtige Rolle beim inflammatorischen Prozess von Endometriose spielt. Krohn et al. konnten nachweisen, dass nach einem *knock-down* von YB-1 an glatten Muskelzellen eine verminderte RANTES Promotoraktivität vorherrschte (Krohn, 2008). Sie konnten dies mit einem *luciferase reporter assay*, in einer *realtime*-PCR und auch bei Untersuchungen mit einem ELISA zeigen. An der proximalen RANTES-Sequenz an der Position -214/-173 identifizierten sie eine Y-box-bindende-Region. YB-1 reguliert diesen Ergebnissen nach das CC Chemokin RANTES in glatten Muskelzellen.

Gleichermaßen konnte gezeigt werden, dass YB-1 sowohl eine große Rolle für die Pro-

gnose von Tumoren als auch bei Resistenzentwicklungen in der Chemotherapie spielt (Bargou et al., 1997). In Zell-Linien, die gegen das Zytostatikum Cisplatin resistent waren, ließ sich eine überproportionale YB-1 Expression nachweisen. YB-1 bindet an eine Region am Promotor des MDR1-Gens und induziert die Expression dieses Gens. MDR1 ist eine energieabhängige Pumpe, die zellschädigende Substanzen aus der Zelle hinaus befördert. Eine verminderte Expression von YB-1 erhöht die Sensitivität von Cisplatin (Uchiumi et al., 1993),(Asakuno et al., 1994),(Ohga et al., 1996),(Ohga et al., 1998). Als weitere Funktionen von YB-1 werden beschrieben:

- 1. Einfluss auf posttranslationale Modifikation (Matsumoto and Wolffe, 1998), (Sommerville, 1999)
- 2. Translationale Maskierung von mRNS (Ranjan et al., 1993)
- 3. Beeinflussung von eukaryontischen Redoxsignalwegen (Duh et al., 1995)
- 4. Chaperonisierung von RNS (Jiang et al., 1997)
- 5. DNS-Reparatur (Gaudreault et al., 2004)



Abbildung 1.1: Die wichtigsten Funktionen des Y-box-bindenden-Proteins-1

1.8 Lokalisationen von YB-1

Die Gene für YB-1 sind auf den Chromosomen 12p13 und 1p34 (Kudo et al., 1995), (Makino et al., 1996) lokalisiert. Das Protein YB-1 kommt hauptsächlich im Zytoplasma vor, wo es mit der mRNS und Translationsvorgängen assoziiert ist. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass YB-1 unter bestimmten Voraussetzungen im Nukleus zu finden ist (Shibahara et al., 2001). Im Zytoplasma kann sich YB-1 an das 20S Proteosom binden, welches durch eine Abspaltung einer am C-Terminus befindlichen Region das CRS (cytoplasmatic retention signal) herbeiführt (Sorokin et al., 2005). Diese Region scheint dafür verantwortlich zu sein, dass YB-1 im Zytoplasma verbleibt. Nach der Abspaltung häufte sich gekürztes YB-1 im Nukleus an. 2003 konnten Jürchott et al. die Einwanderung in den Zellkern in der G1- bis S-Phase ausmachen (Jürchott et al., 2003). Es wird dabei angenommen, dass YB-1 am Anfang der S-Phase in den Nukleus einwandert und am Ende der S-Phase wieder austritt. YB-1 präsentiert sich somit als ein zellzyklusspezifischer Transkriptionsfaktor. Werden Zell-Linien genotoxischen Stressfaktoren wie dem Chemotherapeutikum Cisplatin oder UV-Strahlen ausgesetzt, kann diese Aktivierung zur Einwanderung in den Kern führen. Dies konnte jedoch in vitro nur in ca. 10% der Messungen beobachtet werden (Craig et al., 2005). Bei der Exposition mit DNS-schädigenden Substanzen spaltet das Proteosom die CRS-Region ab. Das N-terminale 32kDa Polypeptid reichert sich anschließend im Zellkern an (Sorokin et al., 2005).

Mehrere Studien zeigten, dass die Einwanderung in den Zellkern von großer Bedeutung für die Funktion von YB-1 als Transkriptionsfaktor ist. Sowohl bei dem Tumorsuppressorprotein p53 als auch dem Spleißfaktor SRp30c konnte eine Einwanderung in den Kern festgestellt werden (Okamoto et al., 2001). Durch weitere Untersuchungen an Gewebeproben von Tumorpatienten konnte beobachtet werden, dass Zellen mit einem hohen Anteil von YB-1 im Nukleus eine schlechtere Überlebensprognose aufwiesen als jene mit einer geringeren Konzentration von YB-1 im Nukleus. Die schlechtere Prognose ist auf ein aggressiveres Wachstum des Tumors, eine erhöhte Rezidivwahrscheinlichkeit sowie entstehende Medikamentenresistenzen zurückzuführen (Janz et al., 2002). Patientinnen mit Brustkrebs ohne Chemotherapiebehandlung und niedriger YB-1 Expression bleiben im Durchschnitt nach 5 Jahren rezidivfrei, wobei bei Patientinnen ohne Chemotherapiebehandlung mit nachgewiesenem YB-1 im Kern eine Rezidivrate von 30 % aufwiesen (Janz et al., 2002). Versetzt man andere Zell-Linien mit rekombinantem YB-1, konnte eine gesteigerte Zellproliferation und Migration beobachtet werden.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollte die Effizienz des *knock-downs* an der Z-12-Zell-Linie nachgewiesen werden. Dazu wurde die Implementation der dsRNS in die Zelle mittels der Alexa Fluor BLOCK-IT Färbung dargestellt. Diese fluoreszenzmarkierte dsRNS wurde deutlich in die verwendete Epithelzell-Linie Z-12 integriert.

Im nächsten Schritt konnte die Effizienz des *knock-downs* auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Hierzu wurden Westernblots durchgeführt, die die *knock-down*-Effizienz nach 24-96 Stunden belegen. Die Expressionsrate des Y-box-bindenden-Proteins wurde analysiert und abschließend quantifiziert.

Zweites Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Untersuchung der Zellen. Bestimmte Zellfunktionen stehen in der Entwicklung von Endometriose besonders im Vordergrund. Es sollte der Beweis erbracht werden, dass in Endometriosegewebe durch einen YB-1-*knock-down* eine veränderte Apoptoseregulierung verursacht werden kann. Durch eine Stimulation der Z-12-Zellen mit TNF- α wurde die Apoptose induziert. Hierdurch sollte ein Zusammenhang zwischen YB-1, einem apoptotischen Geschehen sowie der Pathogenense von Endometriose offen gelegt werden.

Ebenso spielt eine erhöhte Proliferations- und Invasionsrate der Zellen in der Entwicklung von Endometriose eine tragende Rolle. Abgeleitet aus diesem Zusammenhang soll gezeigt werden, dass eine Reduktion der Expressionsrate von YB-1 ebenso eine verringerte Proliferation sowie Invasionsfähigkeit in Z-12-Zellen zur Folge hat.

Als letztes Ziel dieser Arbeit wurde die Expressionsrate von RANTES nach dem *knockdown* an der Endometriose-Epithelzell-Linie Z-12 untersucht. YB-1 kann an den Promotor von RANTES binden, was einen regulativen Effekt von YB-1 auf RANTES erklärt (Krohn et al., 2007). Bei Untersuchungen an Endometriosegewebe konnte postuliert werden, dass die Stromazellen und in geringerem Maße auch Epithelzellen RANTES sekretieren können, was einen Einfluss von RANTES auf die Pathogenese von Endometriose nahelegt (Hornung et al., 2001). Bisher konnte jedoch noch keine direkte Assoziation zwischen der Expressionsrate von RANTES nach einem YB-1*-knock-down* in Endometriosegewebe dargestellt werden. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit dieser Aspekt weitergehend an der Endometriose-Epithelzell-Linie Z-12 dargelegt werden.

1.10 Dieser Arbeit vorausgehende Untersuchungen

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Endometriose von Frau Prof. Dr. D. Hornung Endometriosegewebe, Peritonealflüssigkeit und Endometrium, welches aus Biopsien gewonnen wurde, immunzytochemisch und immunhistochemisch untersucht. Außerdem wurde die Expressionsrate von YB-1 in peritonealen Makrophagen und kultivierten Zellen aus Endometriumgewebe in einem Westernblot (Abb.1.3) sowie die mRNS in einer RT-PCR ermittelt (Abb.1.2). Die Ergebnisse der PCR und des Westernblots belegten, dass in den Geweben von Patientinnen mit Endometriose eine signifikant höhere Expressionsrate von YB-1 existiert. Gleichfalls konnte eine gesteigerte Gen-Expression an ovariellen endometriotischen Läsionen im Vergleich zu normalem Endometrium festgestellt (Abb.1.2) sowie der Unterschied der Expressionsraten von kultiviertem Stroma und Epithelgewebe deutlich gemacht werden. Die Stromazellen zeigten eine signifikant geringere Gen-Expression von YB-1 als die kultivierten Epithelzellen.

Immunhistochemisch sowie immunzytochemisch konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Es wurde nachgewiesen, dass YB-1 in Endometrium, welches Proben von Endometriosepatientinnen entstammt, stärker exprimiert wird. In Kontrollendometrium wurde immunhistochemisch kein bzw. ein geringeres YB-1-Vorkommen beobachtet (Abb.1.4). Ebenso wurde an Stromazellen, welche Patientinnen mit Endometriose entstammten, eine geringere YB-1-Rate im Vergleich zu den Epithelzellen beobachtet. Eine verminderte Expression von YB-1 konnte auch in Epithelzellen und Stromazellen aus Kontrollgewebe nachgewiesen werden (Abb.1.5) (Silveira et al., 2011).



Abbildung 1.2: YB-1 Gen-Expressionsrate (mRNS YB-1/HPRT) in Relation zum housekeeping-Gen (HPRT). Die YB-1 Gen-Expressionsrate (mRNS YB-1/HPRT) in Relation zum housekeeping-Gen (HPRT) und verschiedenen Kontrollen wurde nach 1 normiert. A. In Endometrium von Patientinnen (Altersdurchschnitt: 34,82 \pm 7,18) mit Endometriose (Eo) (n=43) und ovariellen endometriotischen Läsionen (Ov) (n=16) konnten im Vergleich zum Kontrollendometrium (Co) (n=38, Altersdurchschnitt: 33,52 ± 11,31; **p < 0,001, *p < 0,05) erhöhte YB-1 Raten gefunden werden. B. Ebenso konnte in Epithelzellen, welche aus Proben von Patientinnen (Epithelzellen, n=23, Stromazellen n=29, Eo, Altersdurchschnitt: $36,18 \pm 10,39$) mit Endometriose kultiviert wurden, eine signifikant höhere Expressionrate im Vergleich zu den Stromazellen gleichen Ursprungs festgestellt werden (p = 0.0285; Eo Epithel vs. Eo Stroma *p < 0.05; Eo Epithel vs. Co Epithel *p<0,05, Eo Epithel vs. Co Stroma *p<0,05, Student-Newman-Keul-Test). Eine niedrigere Expressionsrate von YB-1 in Stroma- und Epithelzellen wurde in der Kontrollgruppe (Epithelzellen, n=13; Stromazellen, n=20; Co; Alterdurchschnitt: $36,18 \pm 10,39$) detektiert.



Abbildung 1.2	VD 1 Evenessionstation
Additional 1.3:	ib-i-Expressionsrate in
	Endometrium. Die YB-1-
	Expression in Endometrium
	von Patientinnen mit Endo-
:	metriose (Eo; n=16; 138 \pm
	21,23) ist im Vergleich zu
	Endometrium der Kontrollen
	(Co; $n=11$; 28,23 \pm 9,65;
	*p > 0,002) deutlich erhöht
	(p<0,001, Welch-t-Test).
	In einem Westernblot wur-
	de die Protein-Expression
	bestimmt und ins Verhält-
	nis zum Referenzprotein
	β -Aktin gesetzt. Die Proben
	stammten von Patientinnen,
	die ein Endometriosestadi-
	um I-IV aufwiesen sowie von
	gesunden Kontrollen.
	-



Abbildung 1.4: YB-1-Expression in Endometrium in immunhistochemischer Färbung.

YB-1 Expression in Endometrium von Patientinnen mit Endometriose (Eo) und Kontrollproben (Co) in immunhistochemischen Färbungen. In den Proben von Patientinnen mit Endometriose im Stadium III (A) und ovarieller Endometrioseläsionen (Endometriosestadium IV) (B) ist eine deutliche Färbung, die durch die YB-1 Bindung des Antikörpers hervorgerufen wurde, zu erkennen. (C) In Endometrium von gesunden Frauen ist keine signifikante Expression von YB-1 darstellbar gewesen (Co, n=7). Es wurde für jede Probe eine Negativkontrolle (ohne YB-1 Antikörperbehandlung) angefertigt (rechte Kolumne). Vergrößerung, X 100



Abbildung 1.5: Immunhistochemischer Nachweis von YB-1. In Primärkulturen aus Endometriumbiopsien (Eo,n=6; Co,n=6) wurde ein immunhistochemischer Nachweis von YB-1 erbracht. Die rechte Spalte zeigt jeweils die Negativkontrollen.
(A) zeigt den Unterschied zwischen den Epithelzellen (linke Spalte) und den Stromazellen (rechte Spalte) mittels CK18-Färbung (Vergrößerung, X 400).
(B) Endometriale Epithelzellen der Kontrollen wurden mit einem YB-1 Antikörper behandelt. (C) In den Epithelzellen, die Endometrium von Patientinnen mit Endometriose des Stadiums I entstammten, wurde eine deutliche Expression von YB-1 beobachtet (Vergrößerung, X 200).(D) Im Vergleich dazu fehlt eine Färbung der Stromazellen in Endometriosegewebe Stadium I durch den YB-1-Antikörper.

Kapitel 2

Methoden und Materialien

2.1 Materialien

Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Materialien und Chemikalien der einzelnen Versuche aufgelistet.

2.1.1 Materialien für die Zellkultur

RPMI 1640	
Fetal Bovin Serum Mycoplex	
Trypsin-EDTA 1x, 0,05%/0,02% in PBS, UV irrad	PAA Laborataries GmbH,
Penicillin (100 Units/ml)	Deutschland
Streptomycin (0,1 mg/ml)	
Gentamycin (0,1mg/ml)	
Dulbeccot's PBS (1*) ohne Ca und Mg	

2.1.2 Materialien für die Transfektion

Peqlab, Deutschland
QIAGEN GmbH, Deutschland
Pharmacon/Thermo Fisher Scientific,
Deutschland

2.1.3 Materialien zur Effizienzüberprüfung

BLOCK-iT [™] Alexa Fluor [®]	Invitrogen Life Technologies GmbH,	
Red Fluorescent Oligo	Deutschland	

2.1.4 Materialien für den Westernblot

RIPA-Lyse-Puffer	Hersteller
PBS	PAA Laborataries, Deutschland
1% Igepal CA-630 Detergenz I-3021	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
0,5% Na-Desoxycholat D-6750	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
0,1% SDS	
3% Aprotinin A6279	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
1% Na-Orthovanadat S-6508 100 mM	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
1% PMSF P-7626 10 mg/ml Stocklösung in Isopropanol	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland

_

Trägermembran	
Nitrocellulosemembran	Whatman GmbH, Deutschland
Porengröße 0,45 µm	

Zusammensetzung des Auftragspuffers Glycerol 100% ig Bromphenolblau 1% ig SDS 10% ig TRIS 0,5 M pH 6,8 β-Mercaptoethanol

Trenngel 30 ml	10%
Acrylamid-Stammlösung 30%	10 ml
TrisHCL 1,5 M pH 8,8	7,5 ml
10% SDS	0,3 ml
A.dest.	11,7 ml
10% APS	0,40 ml
TEMED	0,09 ml
	\sum 29,99 ml
Sammelgel	4%
Acrylamid-Stammlösung 30%	0,67 ml
TrisHCL 0,5 M pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS	0,05 ml
A.dest.	3 ml
10% APS	0,10 ml
TEMED	0,01 ml
	\sum 5,08 ml

Elektrophoresepuffer 10 X	Transferpuffer
Tris FW 121,2 [0,25 M (30,275 g)]	Tris FW 121,2 [25 mM (12 g)]
Glycin FW 75,07 [1,92 M (144,1 g)]	Glycin FW 75,07 [192 mM (57,6 g)]
SDS Sodiumdodezylsulfat FW 288,4 [35 mM (10,0 g)]	Methanol 20%
in 11 deionisiertem Wasser	
pH ca. 8,3	рН 8,3

Antikörper	Hersteller
Polyklonaler rabbit anti-YB-1-Antikörper	Antikörper-Online
(200µg/ml)	
donkey-anti-rabbit HRP-konjugierter-Antikörper	GE Healthcare
Monoklonaler mouse-anti-human β -Aktin-Antikörper	GE Healthcare
sheep-anti-mouse-Antikörper	GE Healthcare

TBST-Puffer 1X	
Tris	50 mM
HCl	pH 7.4
NaCl	150 mM
Tween 20	0.1%
chemiluminescent HRP Substrate	Millipore Cooperation Immobilion ™Western, USA
"Precision Plus Protein Standard"	BioRAD, Deutschland
Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE	
(Range: 10-250 kD)	

2.1.5 Materialien für die Proliferationsuntersuchung

GIBCO [®] Dulbecco's	Invitrogen ™,
Modified Eagle's Medium (DMEM) 21083	Deutschland
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	
Stopplösung (50% N,N-Dimethylformamid, 10% SDS)	

2.1.6 Materialien für die Apoptoseuntersuchungen

CellDeath Detection ELISA	Peprotech,
$TNF\alpha$	New Jersey, USA

2.1.7 Materialien für die RANTES Bestimmung

Quantikine human CCLR5/RANTES ELISA	RB-Systems Europe, UK

2.1.8 Materialien für die Invasionsuntersuchungen

Materialien für den Filter-Sandwichassay

Thrombin T-6759 Fibrinogen F-4883 Casein 48005 Matrigel™Matrix Vectashield Mountingmedium DAPI-Lösung (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) Isopore Membran Filter 5,0 μm TMTP01300 MF ™Membran Filter 5,0 μm SMWP01300 Nitrozellulosefilter 0,45 μm Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland Serva, Deutschland BD Biosience, Deutschland Vector Laboratories, Inc. U.S. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland Millipore, Deutschland

GE Healthcare (Whatman), Deutschland

2.2 Technische Geräte

Rotanta/RP Zentrifuge Biofuge fresco Combispin FVL-2400 Wilovert A Mikroskop Mikroplatten-Leser *autoflow CO*₂ *waterjacketed incubator* Synergy HT (Fluoreszenzplatten-Leser) *electrophoresis power supply EPS 200*

Abzug Thermomixer compact Analysenwaage SBC21 Schüttler S4 Schüttler ZMD 201 Axiovert 135 M, Fluoreszensmikroskop Hettich DJB Labcare Ltd., U.K. Heraeus Holding GmbH, Deutschland G. Kisker, Deutschland Hund, Deutschland Dynatech Laboratories, Kanada Nuaire, USA Biotek, Deutschland Biotech GE Healthcare EU GmbH, Deutschland Koltermann, Deutschland Eppendorf AG, Deutschland Scaltec Instruments GmbH, Deutschland ELMI laboratory equipment, Lettland Amersham International plc, U.K. Kamera, Canon 350D digital

Canon Deutschland GmbH, Deutschland

2.2.1 Software

Gen5 ™Datenanalyse Software ImageJ E.A.S.Y Win Analysesoftware Biotek, Deutschland Java software Herolab GmbH Laborgeräte, Deutschland

2.3 Eigenschaften der Zell-Linie

Bei der verwendeten Zell-Linie (Entwicklung und Schenkung von Frau Prof. Dr. Starzinski-Powitz, Universität Frankfurt, Deutschland) handelt es sich um immortalisierte Endometriosezellen, die durch eine Biopsie entnommen und mittels eines Plasmids mit dem DNS Tumor Virus SV40 T-Antigen transfiziert wurden (Zeitvogel et al., 2001). Das T-Antigen interferiert mit Proteinen, die den Zellzyklus kontrollieren sollen (RB-1, p107, p130 sowie p53 (DeCaprio et al., 1988),(Ewen et al., 1989),(Zalvide and DeCaprio, 1995),(Lin and Simmons, 1991),(Kierstead and Tevethia, 1993)). Die zellzyklusabhängige Apoptose wird hierdurch verhindert und die Zelle in einem Proliferationsstatus gehalten. Bemerkenswert bei der Entwicklung der Endometriose-Epithel-Zell-Linien war, dass nur Zellen aus Biopsien von hellroten Endometrioseläsionen überleben und proliferieren konnten, während Zellen aus inaktiven Läsionen mit dunkelroter Farbe kein Wachstum in der Primärkultur aufwiesen.

In den Biopsien aus peritonealen Läsionen konnten 3 verschiedene Zelltypen identifiziert werden. Zum einen wurden Epithelzellen identifiziert, die Cytokeratin und Vimentin, jedoch kein E-Cadherin exprimieren (CK+, E-Cad-, Vimentin+). Zum anderen wurden gleichfalls Zellen mit einer fibroblastoiden Morphologie (CK-, E-Cad-, Vimentin+) und Zellen, die sowohl Cytokeratin, E-Cadherin und Vimentin positiv waren, gefunden. Die E-Cadherin negativen Zellen wiesen im Gegensatz zu den E-Cadherin positiven Zellen invasive Eigenschaften auf. Z-12-Zellen zeigten ein Cytokeratin und Vimentin positives sowie ein E-Cadherin negatives Muster. Eine weitere Eigenschaft ist die verlängerte Überlebenszeit der Zellen im Vergleich zu den nicht-SV40-transfizierten Kulturen. Nach einer bestimmten Passagezahl fand bei den verschiedenen Zell-Linien ein Proliferationsstopp statt. Nur wenige Zellen konnten diese Krise überwinden und sich zu tatsächlich immortalisierten Zellen entwickeln. Die frühen Zellpassagen besitzen eine Verdopplungszeit von ca. 50 Stunden. Die späten Passagen, die nach der Proliferationskrise entstanden waren, besitzen nur noch eine 31-stündige Verdopplungszeit. In einem Invasionsassay konnten Zeitvogel et al. unter anderem für Z-12 eine erhöhte Motilität und Invasivität feststellen, die mit der Invasivität von EJ28 (*human urinary bladder carcinoma celline*) vergleichbar ist (Gaetje et al., 1997).

Zu der von uns verwendeten Z-12-Zell-Linie ist abschließend zu sagen, dass sie einige wichtige Proteine exprimiert (insbesondere ist hier das N-Cadherin zu nennen), die für die Invasion unerlässlich sind (Zeitvogel et al., 2001),(Hazan et al., 2000). Ergänzend zu dieser Annahme belegen verschiedene Studien, dass die Abwesenheit von E-Cadherin in Karzinomzellen für die gesteigerte Invasion und Metastasierung benötigt wird, wie ebenfalls bei Z-12-Zellen zu sehen ist.

Weitere Eigenschaften der Z-12-Zellen sind das Vorkommen von verschiedenen Rezeptoren, wie des Oestrogenrezeptors α und β sowie des Progesteron- und Aromatase-P450 Rezeptors.

2.4 Kultivierung der Z-12-Zellen

Zur Kultivierung der Z-12-Zellen wurde RPMI 1640 (PAA) verwendet, welches mit 10% fetalem Kälberserum und 1% Gentamicin, 1% Streptomycin/Penicillin versetzt war. Die Zellen wurden bei 37 °C in einer mit 5% CO₂ und mit Wasserdampf abgesättigten Atmosphäre inkubiert. Zur Gewinnung der Zellen wurden diese vom Medium befreit, ein bis zweimal mit PBS gespült, mit Trypsin für 5-7 Minuten behandelt und anschließend zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in RPMI 1640 (2% FKS, 1% PSG) resuspendiert und, sofern nicht anders beschrieben, sofort weiterverarbeitet.

2.4.1 Transfektion der kultivierten Z-12-Zellen

Die Zellen wurden für das jeweilige Experiment spezifisch ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Tag der Transfektion erreichten die vorher ausgesäten Zellen eine Konfluenz von 30-5 0%. Die *transiente-forward*-Transfektion wurde mit Interferin [™] (*polyplus transfection*) in einer Konzentration von jeweils 10 nM YB-1-siRNS nach dem Herstellerprotokoll *interferin polyplus tranfection* durchgeführt. Als negative Kontrolle wurde eine *non-targeting*-siRNS (NT-siRNS) eingesetzt, die keinerlei Homologien zu Säugetieren aufweist. Sie dient zur Festlegung einer *baseline*. Durch diese wird ausgeschlossen, dass die beobachtete Abweichung der YB-1 Expression durch den Einbau einer siRNS oder das Transfektionsmedium verursacht wird. Durch die Behandlung der Zellen mit dem Transfektionsmedium und der siRNS erfährt die Zelle Stress, was YB-1 als Stressprotektor erhöht. Das Transfektionsverfahren stellt einen zellschädigenden Effekt dar, welcher durch die Wahl der Bezugsgröße (NTsiRNS-transfizierte Zellen) korrigiert wird.

Weitere Kontrollenproben:

- 1. untransfiziert: unbehandelte Zellen
- mock: Behandlung der Zellen mit Transfektionsmedium und RPMI 1640 (2% FKS, 1% PSG)
- CellDeath: Transfektion mit einer den phänotypischen Zelltod induzierenden siRNS als Positivkontrolle.
 Die Kontrollproben der unbehandelten Zellen dienen der Überprüfung der basalen Genevpression nativer Zellen. Nach jeweils 24-96 Stunden wurden die Zellen

len Genexpression nativer Zellen. Nach jeweils 24-96 Stunden wurden die Zellen für die verschiedenen Experimente weiterverwendet.

2.5 Prüfung der Transkriptionseffizienz mit fluoreszierender siRNS

Zur Kontrolle der Effizienz der Transfektion wurde eine Färbung mittels BLOCK-iT ™Alexa-Fluor [®] *red fluorescent oligo* durchgeführt. Diese Methode, bei welcher das rot-555nm-markierte dsRNS Oligomer in die Zelle eingebracht wird, ist ein guter Indikator dafür, ob die siRNS während der Transfektion in die Zellen aufgenom-
men werden kann. Der Doppelstrang besitzt die gleiche Länge, Charge und Konfiguration wie standartisierte siRNSs. Die Transfektion erfolgte mit Interferin™nach Herstellerprotokoll mit einer Konzentration der RNS von 1 nM. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte 24-72 Stunden nach der Transfektion mittels Fluoreszensmikroskops (555 nm).

2.6 Prüfung des YB-1-knock-downs auf Proteinebene

2.6.1 Westernblot

Isolierung des Proteoms

Zur Isolation der Proteine wurden die Zellen mit Trypsin gewonnen, das Pellet mit dem frisch hergestellten RIPA-Lyse-Puffer behandelt (je $300 \,\mu$ l pro Well in einer 6-Wellplatte) und für 30-60 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde anschließend bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und auf Eis gelagert oder bei -20 °C aufbewahrt.

Zur chemischen Denaturierung wurden die Proteine mit dem Auftragspuffer (5X) behandelt und zur thermischen Denaturierung in einem Heizblock bei 95 °C für 5 Minuten gelagert.

Die Proben wurden schließlich in die Kammern der zuvor gegossenen Gele (Sammelgel 4%, Trenngel 10%) pipettiert. Pro Gel wurde jeweils ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt. Die Kammern wurden für die elektrophoretische Auftrennung in ein alkalisches Milleu gebracht, was durch den Elektrophoresepuffer gewährleistet wurde. In der alkalischen Umgebung wanderten die jetzt negativ geladenen Proteine zur Anode und wurden ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte pro Gel bei ca. 30-40 V und wurde gestoppt, sobald die Front am unteren Ende des Gels hinaus zu laufen begann. Nach einem Waschschritt mit dem Transferpuffer wurde der Transfer im *semi-dry* Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran für 1-2 Stunden gestartet. Der Transfer erfolgte im elektrischen Feld, wobei eine konstante Stromstärke von ca. 34 mA pro Membran angelegt wurde.

Als Primärantikörper wurde der polyklonale *rabbit-anti-human-*YB-1-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in 5% Magermilch verwendet. Nach dem Hinzufügen des Antikörpers wurde das Gel über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Spülen der Membranen mit TBST-Puffer. Nach diesem Waschschritt wurde der Sekundärantikörper, ein HRP-konjugierter *donkey-anti-rabbit*-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000, aufgetragen und bei 1 Stunden RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt mit TBST-Puffer erfolgte die Behandlung mit der chemilumineszierenden ECL-Reagenz. Die Detektion des Signals wurde auf Kodak Röntgenfilm mit Kodakchemikalien durchgeführt.

Nach der Detektion wurde das ECL-Reagenz gründlich mit Hilfe des TBST-Puffers abgespült.

Für das Referenzprotein β -Aktin wurde in gleicher Weise vorgegangen. Als Primärantikörper gegen das Referenzprotein wurde ein monoklonaler *mouse-anti-human-\beta*-Aktin-Antikörper in einer Verdünnung 1:50000 in 5% Magermilchserum verwendet und dieser 1/2- 1 Stunden inkubiert. Für den Sekundärantikörper wurde ein *sheepanti-mouse-HRP*-konjugierter-IgG-Antikörper in einer Konzentration von 1:2000 eingesetzt. Die Detektion der HRP erfolgte ebenfalls mittel des ECL-Reagenzes. Die Auswertung und Messung aller Banden erfolgte mit Hilfe der E.A.S.Y Win Analysesoftware (Herolab).

2.7 Analyse der Zellproliferation in Z-12-Zellen nach Transfektion

Zur Analyse der Proliferation wurde 72-96 Stunden nach der Transfektion ein MTT-Stoffwechseltest durchgeführt. Dieser Test beruht auf der Fähigkeit von vitalen Zellen, das gelbe wasserlösliche Tetrazoliumsalz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in bläuliches wasserunlösliches Formazan zu reduzieren. Ursächlich für die Reduktion wurde lange Zeit mitochondrialen Succinat-Dehydrogenasen eine Beteiligung zugesprochen. Neuere Studien belegen jedoch, dass die Reduktion hauptsächlich außerhalb der Mitochondrien stattfindet und von pyridinhaltigen Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH übernommen wird (Berridge and Tan, 1993). Die Menge des umgesetzten Farbstoffes ist proportional zu der metabolischen Aktivität der Zelle und kann dadurch als Vitalitätsmarker genutzt werden. 72-96 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium durch jeweils 100 μ l 10%ige MTT/-DMEM Lösung ersetzt und für weitere 4 Stunden bei 37 °C und 5%CO₂ in feuchter Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde die 96-Wellplatte nach Zugabe von je 100 μ l Stopp-Solution lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 10-20 Stunden inkubiert. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid wurde nun ausreichend in das bläuliche Formazan umgesetzt. Die Extinktion des Farbstoffes wurde mittels ELISA-readers bei einer Wellenlänge von 560 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) gemessen.

2.8 Analyse der Zellinvasion

Zur Analyse der Zellinvasion wurde ein Filtersandwich hergestellt und anschließend die Invasion gemessen.

2.8.1 Herstellung des Filtersandwiches

Zur Herstellung des Filtersandwiches wurden alle notwendigen Bestandteile mit einer $0,22 \,\mu\text{m}$ - $0,45 \,\mu\text{m}$ Filterspitze steril gefiltert, entweder sofort verarbeitet oder bei -20 °C (Thrombin bei -80 °C) tiefgefroren. In Abbildung 2.1 ist der Aufbau eines Filtersandwiches schematisch dargestellt.



Abbildung 2.1: Schematische Darstellung

des Filtersandwiches. Der Filter-Sandwich setzt sich zusammen aus einem Tropfen Fibringel, auf welchen der Nitrozellulosefilter, ein Tropfen Matrigel und der Membranfilter sowie je Well und Filter-Sandwich 100.000 Zellen aufgetragen werden.

Herstellung des Fibringels:

250 μ l Caseinlösung	Casein in einer Konzentration von 10 mg/ml
	in RPMI 1640 ohne FKS lösen.
	Um es optimal in Lösung zu bringen, wurde das Casein
	mit NaOH angereichert und alkalisiert.
100 μ l Fibrinogenlösung	Fibrinogen in einer Konzentration von
	25 mg/ml in PBS lösen. Ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur
	rühren oder schütteln lassen,

	dann bei 12000 g abzentrifugieren und durch einen
	0,45 μ l Spritzenfilter filtrieren.
50 μ l Thrombinlösung	Thrombin in einer Konzentration
	von 10 U/ml in Citratpuffer lösen.
	Ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur rühren oder schütteln
	lassen,dann bei 12000 g abzentrifugieren
	und durch einen 0,45 μ l Spritzenfilter filtrieren.
100 μ l serumfreies RPMI	

 $\sum = 500 \,\mu l$ Fibringel

Der Ansatz wurde in eine auf Eis liegende Petrischale als dicker Tropfen pipettiert. In diesen vorgelegten Tropfen wurden die Nitrozellulosefilter (Nc-Filter) mit dem Fibringel von unten benetzt und auf einer 24-Wellplatte platziert. Für die Polymerisierung des Gels wurde die Wellplatte mit den bestückten Filtern 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Anschließend wurden ca. 15 μ l Matrigel, welches stets gekühlt gehandhabt wurde, auf den Nitrozellulosefilter pipettiert. Der Membranfilter (Polycarbonatfilter (Pc)) wurde nun vorsichtig auf den Matrigeltropfen aufgebracht. Die fertig bestückte 24-Wellplatte wurde nochmals bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer zur Polymerisierung belassen.

Für die Emissionsmessung wurden spezielle schwarze Platten verwendet, die der Streuung des fluoreszierenden Lichts an den Plattenrändern entgegen wirken sollen.

2.8.2 Auftragung und Färbung der Zellen

Die Zellen wurden 96 Stunden vor der Durchführung des Filtersandwich-Assays transfiziert, mittels Trypsin abgelöst und pellettiert. Die Zellen eines Pellets wurden nach Resuspendierung gezählt und je 100.000 Zellen auf einen vorbereiteten Filtersandwich aufgetragen.

Die Hälfte der mit den Sandwiches bestückten Wells wurde nach 10-20 Minuten mit Glutardialdehyd bei 4 °C für 24 Stunden fixiert. 6 Stunden nach Auftragen der Zellen auf die Sandwiches (Inkubation bei 37 °C und 5% CO_2) wurden die restlichen Zellen auf die gleiche Weise fixiert. Während dieser Versuchszeit durchdringen die Zellen die Filter.

Die Färbung der Zellen erfolgte, nachdem das Glutardialdehyd abgesaugt und mit

Aquadest das restliche Glutaraldehyd aus den Wells entfernt wurde. In jedes Well wurde 0,5 ml DAPI-Lösung (2,5 μ g/ml) geträufelt und anschließend lichtgeschützt 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) bindet spezifisch an GC- und AT-Basenpaare der DNS. Dadurch wird es möglich, einzelne Zellen zu identifizieren und die Emission zu messen. Nach 30 Minuten wurde DAPI abgesaugt und die Filter mit Aquadest benetzt. Mit einer Pinzette wurden die Polycarbonatfilter von den Nitrozellulosefiltern getrennt. Zur Messung wurden die Filter einzeln auf die schwarzen 24-Wellplatten positioniert und anschließend die Emission gemessen.

2.8.3 Messung der Emission/Zellzählung

Zur Messung der Zellen wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Im ersten Versuch wurden die Zellen auf den Filtern mikroskopiert und in repräsentativen Abschnitten fotografiert. Dazu wurden pro Filter je 5 Fotos aus 4 Quadranten und der Mittelposition aufgenommen. Die Bilder wurden anschließend mit dem Programm Image J optimiert, um die Zellen zählen zu können und die Fläche, die sie repräsentieren, zu ermitteln. Aus den Ergebnissen der 5 Bilder wurde der Mittelwert der relativen Zellzahl berechnet, woraus sich die relative und absolute Invasionsrate sowie die Adhäsion ermitteln ließen (siehe Formeln 2.1, 2.2, 2.3)

In der zweiten Variante wurde die Emission der auf den Filtern befindlichen Zellen mittels eines Fluoreszenzplatten-Lesers bei einer Wellenlänge von 360 nm, 460 nm/Ref. und mittels der Gen5[™]-Datenanalyse-Software ausgewertet. Die Proliferationskontrollen wurden den Nitrozellulosefiltern gegenübergestellt und die relative Invasion berechnet.

2.8.4 Berechnung der Invasionsraten

$$relative Invasionsrate = 100 \cdot \frac{\text{Nitrozellulose-Filter}}{\text{Proliferationskontrolle}}$$
(2.1)
absolute Invasionsrate = $100 \cdot \frac{\text{Nitrozellulose-Filter}}{\text{Polycarbonat-Filter} + \text{Nitrozellulose-Filter}}$ (2.2)

2.8.5 Berechnung der totalen Adhäsion:

 $totale Adhäsion = 100 \cdot \frac{\text{Nitrozellulose-Filter} + \text{Polycarbonat-Filter}}{\text{Proliferationskontrolle}}$ (2.3)

2.9 Apoptose analyse an transfizierten Z-12-Zellen nach Stimulierung mit ${\rm TNF}\alpha$

Für die Apoptosequantifizierung wurden die Z-12-Zellen, nachdem diese eine Konfluenz von 30-50% erreicht hatten (nach ca.72-96 Stunden), wie beschrieben, kultiviert und transfiziert. Um die Apoptose in der Zell-Linie zu induzieren, wurden die Zellen mit TNF α in abgestuften Konzentrationen (40 ng/ml; 20 ng/ml; 0 ng/ml) stimuliert und für 4 Stunden inkubiert. Für die Analyse wurde der *celldeath detection* ELISA von Protech verwendet. Dieser basiert auf dem Prinzip eines Sandwich-Enzym-Immunoassays, bei welchem monoklonale Antikörper gegen DNS und Histone verwendet werden

(Abb.2.2). Der Kit nutzt das Übertreten von Nukleosomen aus dem Kern ins Zytoplasma während der Apoptose aus. Nachdem die Apoptose der Zellen durch TNF α stimuliert worden war, wurde zunächst das Nährmedium mit den nekrotischen Bestandteilen entfernt. AnschlieSSend wurden die Zellen mit einem vom Hersteller eigenen Lysepuffer behandelt und für weitere 30 Minuten inkubiert. Der Lysepuffer bewirkt selektiv die Zerstörung der Zellmembranen, jedoch nicht der Kernmembranen, sodass anschließend die extranukleären Mono- und Oligonukleosomen von den Antikörpern gebunden wurden. Es geht ausschließlich dieser Anteil in die Messung mit ein und ist damit repräsentativ für die apoptotische Fraktion. Nach der Lyse wurde die Platte bei 200*g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in eine mit Streptavidin-beschichtete 96-Wellplatte aufgebracht. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle und eine background-Kontrolle mitgeführt (im Kit enthalten). Eine Mischung aus Anti-Histon-Antikörpern und Anti-DNS-POD-Antikörpern wurde in die Wells gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem MP-Schüttler (300 rpm) inkubiert. Der Anti-Histon-Antikörper bindet durch seine Biotinylisierung an das Streptavidin über sein Fc-Fragment und gleichzeitig an die Histone der Nukleosomen über das Fab-Fragment des Antikörpers. Spezifisch werden die Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4 gebunden, die im Nukleosom enthalten sind. Nukleosomen bilden mit den Histonen (H2A, H2B, H3, H4) das Nukleosomencore. Der Anti-DNS-POD-Antikörper bindet DNS-Komponenten (Einzel- und Doppelstrangelemente) der Nukleosomen. Alle ungebundenen Substrate werden durch mehrfaches Waschen entfernt. Die Farbentwicklung wird durch das ABTS-Substrat (im Kit enthalten) mittels der *horse-raddish*-Peroxidase ermöglicht. Das ABTS-Stoppreagenz beendet die Reaktion der Peroxidase und somit die Farbentwicklung.

Abschließend wurde die Extinktion in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm (Referenzwellenlänge 490 nm) gemessen.



Abbildung 2.2: schematische Darstellung der Funktionsweise des cell death detection ELISAs

2.10 RANTES-Quantifizierung in stimulierten und transfizierten Z-12-Zellen

2.10.1 RANTES-ELISA

Die Z-12-Zellen wurden, wie oben beschrieben, kultiviert und auf 12-Wellplatten zu je 100.000 Zellen ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion der Zellen mit je 10 nM YB-1-siRNS, 10 nM *non-targeting*-RNS, einer Behandlung nur mit Transfektionsmedium sowie als Transfektionskontrolle mit einer *cell death*-induzierenden

siRNS. Der phänotypische Zelltod wurde unter einem Lichtmikroskop beurteilt. Das Transfektionsmedium und die siRNSs wurden für 96 Stunden auf den Zellen belassen und anschließend einige Wells mit $\text{TNF}\alpha$ in einer Konzentration von 100 ng/ml stimuliert. Die übrigen Wells blieben unstimuliert. Nach weiteren 24 Stunden wur-



Abbildung 2.3: schematische Darstellung des RANTES-Assays

de das Medium abpipettiert und scharf abzentrifugiert. Der Überstand wurde nun entweder gleich verarbeitet oder bis zur RANTES-Bestimmung durch den Quantikine human-RANTES-ELISA-Test bei -20 °C eingefroren. Der verwendete Assay beruht auf dem Prinzip eines quantitativen sandwich-enzym-Immunoassays, bei welchem eine Platte verwendet wurde, die mit RANTES-spezifischen monoklonalen Antikörpern beschichtet ist. Alle Reagenzien, Kontrollen und Standards wurden- wie im Herstellerprotokoll beschrieben- vorbereitet. In die Wells wurde ein Verdünnungsmittel (assay diluent RD1W) pipettiert, zu welchem anschließend die Proben und der Standard dazu gegeben wurde. Alles in der Probe vorhandene RANTES wird von den monoklonalen Antikörpern auf der Mikroplatte gebunden. Nach 2 Stunden Inkubation und mehreren Waschschritten wurden alle ungebundenen Substrate entfernt und ein enzymgebundener polyklonaler Antikörper, welcher spezifisch für RANTES ist, in die Mikroplatte hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde und weiteren Waschvorgängen, welche zur Entfernung ungebundener Antikörper-Enzym Reagenzien dienen, wurde eine Substratlösung (stabiles Wasserstoffperoxid- und Tetramethylbenzidin-Gemisch enthaltend) hinzu pipettiert. Diese ermöglicht eine Farbentwicklung, die proportional zur RANTES-Konzentration ist. Die Farbentwicklung wurde anschließend mit einer Stoppreagenz (Schwefelsäure enthaltend) begrenzt und die Intensität in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 560 nm) gemessen.

2.11 Statistische Auswertung der Daten

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurde das Signifikanzniveau auf p<0,05 festgelegt. Für die Auswertung der nicht normalverteilten Daten wurden nichtparametrische Tests, wie der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Friedman-Test oder der Kruskal-Wallis-Test, verwendet. Eine α -Fehler-Kumulierung wurde hier mittels Dunns Post Hoc Test adjustiert. Für alle normalverteilten Daten wurde eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Der α -Fehler wurde mit einem Bonferroni Post Hoc Test adjustiert.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Nachweis der knock-down-Effizienz

3.1.1 Mikroskopische Effizienzüberprüfung des knock-down-Experiments

Die Effizienz des geplanten Experiments wurde vorausgehend mittels 3'-Alexa Fluor 488 modifizierter Hs YBX1 HP siRNS (in rot) geprüft. Diese belegte die Fähigkeit zur Aufnahme einer siRNS in die Zellen. Jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden wurde lichtund fluoreszenzmikroskopisch der Einbau der fluoreszenzmarkierten siRNS in die Zelle kontrolliert (Abb. 3.1).

3.1.2 knock-down-Effekt von YB-1 auf Proteinebene

Nach der transienten Transfektion mit Hb YBX 1 Hs siRNS wurden Westernblots durchgeführt. Durch die Analyse der Westernblots lässt sich der *knock-down* des Y-boxbindenden-Proteins-1 bis auf Proteinebene darstellen. Für die Untersuchung wurde die Endometriose-Epithelzell-Linie Z-12 verwendet, aus welcher 24 -96 Stunden nach der Transfektion das Proteom isoliert und für den Westernblot vorbereitet wurde. Es wurden fünf unabhängige Experimente statistisch ausgewertet. Eine signifikante Reduktion der Expressionsrate von YB-1 konnte in den YB-1-siRNS-transfizierten Z-12-Zellen nach 72- 96 Stunden detektiert werden. Hierbei ließ sich eine Reduktion beobachten, welche nach 72 Stunden *post transfectionem* eine maximale Reduktion auf 36,54% \pm 11,87 (Wilcoxon-2-Stichproben-Test, *p=0.029) betrug. Nach 96 Stunden konnte



Abbildung 3.1: Einbau von fluoreszenzmarkierter **BLOCK-iT** ™Alexa Fluor®gekoppelter **YB-1-siRNS** in die Zellen der **Endometriose-**Epithel-Zell-Linie-Z-12. Native Zellen (Vergrößerung von 200 X),linke Spalten und Z-12-Zellen nach Einbau der fluoreszenzmarkierten BLOCK-iT ™Alexa Fluor®gekoppelten YB-1-siRNS (555 nm), rechte Spalte. Die Fotografien wurden 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion **INTERFERin**[™] mit aufgenommen.

eine Reduktion auf 51,26% \pm 16,51 (Wilcoxon-2-Stichproben-Test,**p=0.0079) erreicht werden. Alle weiteren Experimente erfolgten diesen Erkenntnissen nach in der Zeit zwischen 72 Stunden und 96 Stunden. Die Untersuchungen der Proteinexpression zeigten auch einen deutlichen Unterschied zwischen den untransfizierten und mock- sowie NT-siRNS-transfizierten Zellen. Die verminderte Expression ist qualitativ in Abb.3.6 zu sehen. Zu begründen ist dieser Effekt durch die Eigenschaft von YB-1 als Stress-regulierendes Protein, welches unter dem Einfluss von Stressfaktoren aktiviert wird. Nimmt man an, dass das Transfektionsmedium einen Stressstimulus für die Zelle darstellt, so erklärt sich, warum unter normalen Bedingungen der Zelle YB-1 nur in geringerer Menge nachweisbar ist. Um das Experiment korrekt auszuwerten, muss deshalb die NT-siRNS als Bezugsgröße gewählt werden, da nur so für alle Stressfaktoren korrigiert werden kann.



Abbildung 3.2: Die Proteinexpression von YB-1 und β -Aktin (Referenzprotein) in YB-1siRNS,- NT-siRNS-transfizierten, mock- und untransfizierten Z-12-Zellen nach 24, 48, 72 und 96 Stunden. Im Bild sind beispielhaft Banden der YB-1-Expressionsrate (obere Banden) von YB-1-siRNS-transfizierten und NT-siRNStransfizierten Zellen aus zwei von fünf unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Banden der mock- und untransfizierten Proben sind zur Vollständigkeit als Einfachdarstellung abgebildet. Die unteren Banden zeigen die korrelierende β -Aktin-Proteinexpression. Jede Bande entspricht der Proteinexpression eines Wells nach 24 Stunden (links Spalte oben), 48 Stunden (rechte Spalte oben), 72 Stunden (linke Spalte unten) und 96 Stunden (rechte Spalte unten).





3.2 Beeinflussung der Proliferation von Z-12-Zellen nach YB-1-*knock-down*

In den Untersuchungen ließ sich feststellen, dass eine Reduktion von YB-1 einen signifikant inhibitorischen Effekt auf die Endometriose-Epithel-Zell-Line Z-12 hatte (Abb.3.4, $83,93\% \pm 10,62$; **p < 0,01, einseitige ANOVA, Bonferroni Post Hoc Test). Die Proliferationsrate der YB-1-knock-down-Zellen (3 unabhängige Experimente mit jeweiliger Bestimmung von 23 Wells) wies eine konstante Reduktion der Vitalität von 16 % im Vergleich zu den NT-siRNS-transfizierten Zellen (3 unabhängige Experimente mit jeweiliger Bestimmung von 24 Wells) auf. Der Einfluss des Transfektionsmediums lässt sich aus der relativen Reduktion der Zellzahl der mock-transfizierten Zellen (121 % \pm 15,72; 3 unabhängige Experimente mit jeweiliger Bestimmung von 24 Wells) im Vergleich zu den untransfizierten Zellen (159 $\% \pm 31,18$, 3 unabhängige Experimente mit jeweiliger Bestimmung von 10 Wells) ableiten (**p < 0,01). In der Differenz zwischen den NT-siRNS-transfizierten zu den untransfizierten Zellen zeigt sich die zellschädigende Wirkung, welche durch den Einbauprozess einer siRNS in diese Zellen ausgelöst wird. Die Positivkontrolle (cell death control, 3 unabhängige Experimente mit jeweiliger Bestimmung von 8 Wells) zeigt eine deutliche Verringerung der Zellzahl.

3.3 Einfluss des YB-1-*knock-downs* auf die Apoptoseinduktion in Z-12-Zellen

Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwiefern die Proliferationsrate im Zusammenhang mit einer gesteigerten Apoptoserate steht. Hierfür wurde die Apoptoserate der Z-12-Zellen nach dem YB-1-*knock-down* und der Stimulierung durch TNF- α beurteilt. Um die Apoptoserate an Z-12-Zellen zu bewerten, wurde ein einstufiger Immunoassay benutzt, welcher die DNS-Fragmentierung und die Histonfreisetzung aus dem Nukleus mittels biotinyliertem Anti-Histon-Antikörper und Peroxidase-gekoppeltem Anti-DNS-Antikörper bestimmt. Die Zellen wurden in 3 verschiedenen Gruppen untersucht. Es wurden jeweils YB-1-siRNS-, NT-siRNS-, mock-transfizierte und untransfizierte Zellen mit 0 ng, 20 ng und 40 ng TNF α stimuliert. Die Normierung erfolgte auch hier nach den NT-siRNS-transfizierten Zellen, um isoliert den Effekt des *knock-downs* darstellen





zu können. Es konnte in allen 3 Gruppen eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate in YB-1-*knock-down*-Zellen im Vergleich zu den NT-siRNS-transfizierten Zellen nachgewiesen werden (125 % \pm 18,43 (0 ng/ml); 134 % \pm 12,15 (20 ng/ml) und 135 % \pm 11,93 (40 ng/ml);***p < 0,005, einseitige ANOVA, Bonferroni Post Hoc Test). Ebenso wurde eine signifikante Steigerung innerhalb der Kontrollgruppe mock-behandelter Zellen im Vergleich zu den untransfizierten Zellen deutlich. Zwischen mock- und NTsiRNS-transfizierten Proben konnte nur in der Kontrollgruppe ohne TNF α -Stimulation ein signifikanter Unterschied der Apoptoseraten verzeichnet werden (Abb. 3.5). Ein Einfluss von TNF- α im Sinne einer weiteren Steigerung der Apoptose konnte nicht festgestellt werden.



Abbildung 3.5: Auswertung der Messungen des *cell death detection ELISAs.* Die Apoptoseraten der YB-1-*knock-down*-Zellen und der Kontrollen (mock-transfizierte, untransfizierte Zellen) wurden nach der Apoptoserate der NT-siRNS-transfizierten Zellen (*scrambled*) normiert. Die Ergebnisse wurden aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweiliger 4-fach Bestimmung nach Stimulation mit TNF- α in abgestuften Konzentrationen (0 ng/ml (linke Balkengruppe); 20 ng/ml (mittleree Balkengruppe) und 40 ng/ml (rechte Balkengruppe)) zusammengefasst. Es zeigt sich eine gesteigerte Rate der Apoptose bei den YB-1-siRNS-transfizierten Zellen im Vergleich zu den NT-siRNS-transfizierten Zellen ** p < 0,005.

3.4 Einfluss der YB-1-Expression auf die RANTES-Expression durch TNF- α

Weiterführend wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von YB-1 im inflammatorischen Geschehen von Endometriose untersucht. Für die Bestimmung der RANTES-Expressionsrate wurde der RANTES ELISA verwendet. Die Z-12-Zellen wurden analog zu den vorangegangenen Experimenten vorbereitet und mit TNF- α (100 ng/ml) stimuliert oder blieben unstimuliert. 24 Stunden nach der Stiumlierung mit TNF- α wurde der ELISA durchgeführt, welcher die Konzentration von RANTES im Überstand misst. Die Untersuchungen zeigten folgende Ergebnisse: TNF- α scheint die Rate des RANTES-Protein in den Z-12-Zellen zu steigern. Durch TNF- α stimulierte Z-12-Zellen exprimieren nach YB-1-*knock-down* im Vergleich zu den NT-siRNS-transfizierten Zellen deutlich mehr RANTES (*p < 0,05, Kruskal-Wallis Test, Dunn's Post Hoc Test). Die untransfizierten Zellen bildeten nach der Induktion durch TNF- α mehr RANTES als die NT-siRNS-transfizierten Zellen (Abb. 3.6), dieser Effekt erwies sich als nicht signifikant. Ebenfalls konnte zwischen den Zellen, die nicht durch TNF- α stimuliert wurden, eine signifikante Steigerung zwischen den NT-siRNS-transfizierten Zellen und den YB-1-siRNS-transfizierte Zellen gemessen werden (Abb. 3.6).



Abbildung 3.6: RANTES-Expression in Z-12. RANTES-Expressionsrate von YB-1-siRNStransfizierten, NT-siRNS-transfizierten und untransfizierten Z-12-Zellen nach Stimulation mit TNF- α (dunkelgraue Balken) und ohne TNF- α -Stimulation (hellgraue Balken). Eine signifikante Steigerung der RANTES-Expression wurde zwischen den YB-1-siRNS-transfizierten und NT-siRNS-transfizierten Zellen (*p< 0,05) festgestellt. Die nicht mit TNF- α stimulierten Zellen zeigten eine signifikante Steigerung der RANTES-Expression zwischen den YB-1-siRNStransfizierten und NT-siRNS-transfizierten Zellen (*p< 0,05).

3.5 Beeinflussung der Invasion von Z-12-Zellen durch den YB-1-*knock-down*

Zur Bestimmung der Invasionsrate fanden zwei Auswertungsmethoden Anwendung (siehe Kapitel 2). Die fluoreszierenden Zellen wurden mikroskopiert, photographiert und mit dem Programm Image J ausgewertet. Die relative Invasion (Abb. 3.7) und die absolute Invasion (Abb. 3.8) sowie die totale Adhäsion (Abb. 3.9) wurden, wie in Abschnitt 2.8.4 beschrieben, berechnet. In der Auswertung konnten keine bezeichnenden Unterschiede zwischen den YB-1-siRNS-transfizierten Zellen und den Kontrollproben festgestellt werden.

In Abbildung 3.10 ist die relative Invasionsrate abgebildet, welche mittels der zweiten Auswertungsmethode (*microplatereader*), ermittelt wurde. Die Ergebnisse wurden gegen die NT-siRNS-transfizierten Kontrollen normiert. Für die Erhebung dieser Daten wurden drei unabhängige Versuche mit jeweiliger doppelter bis dreifacher Bestimmung der Emission der Nitrozellulosefilter und der Proliferationskontrollen durchgeführt. Die Invasivität der Z-12-Zellen verminderte sich nach einer Reduktion von YB-1 auf etwa 50-60% der NT-siRNS-transfizierten Proben der Endometriose-Epithel-Zell-Linie. Die untransfizierten Zellen unterschieden sich nur in geringem Maße von den YB-1-siRNS-transfizierten Zellen. Die Unterschiede zwischen den drei Proben erwiesen sich als nicht signifikant (p = 0,19).



Abbildung 3.7: Relative Invasion. Die relative Invasion in Prozent (2.1) von YB-1-siRNS-, NT-siRNS-transfizierten, mock-behandelten und untransfizierten Z-12-Zellen.



Abbildung 3.8: Absolute Invasion. Die absolute Invasion in Prozent (2.2)von YB-1-siRNS-, NT-siRNS-transfizierten, mock-behandelten und untransfizierten Z-12-Zellen.



Abbildung 3.9: Totale Adhäsion. Die totale Adhäsion in Prozent (2.3) von YB-1-siRNS-, NTsiRNS-transfizierten, mock-behandelten und untransfizierten Z-12-Zellen.



Abbildung 3.10: Relative Invasionsrate nach Emissionsmessung mittels microplatereaders. Die relative Invasionsrate (2.1) von YB-1-siRNS-transfizierten Z-12-Zellen, NT-siRNS-transfizierten Z-12-Zellen (NT-siRNS) und untransfizierten Z-12 Zellen (untrans) wurde nach 72 Stunden nach der Transfektion bestimmt. Die Werte ermitteln sich aus jeweiliger doppelter bis dreifacher Bestimmung der Emissionsrate. Die Invasionsrate vermindert sich nach einer Expressionsreduktion von YB-1 in den Z-12-Zellen tendenziell um ca. 60%.

Kapitel 4

Diskussion

Der Transkriptionsfaktor YB-1 wird derzeit in verschiedenen Forschungsbereichen untersucht. Er gilt als Onkogen, welches sowohl das Tumorwachstum beeinflusst als auch die Ansprechrate auf Chemotherapie senkt. Tumore, in denen eine gesteigerte Expressionsrate von YB-1 festgestellt wurde, erwiesen sich als aggressiver im Wachstum; die betroffenen Patientinnen hatten ein schlechteres *outcome* (Habibi et al., 2008). YB-1 wurde bei unterschiedlichen Karzinomen untersucht, so beim NSCLC (*non small cell lung cancer*), Ovarialkarzinom und Prostatakarzinom (Shibahara et al., 2001), (Kamura et al., 1999), (Giminez-Bonafe et al., 2004). AuSSerdem wurde YB-1 als prognostischer Faktor in bestimmten Arten von Krebs detektiert (Kashihara et al., 2009). Ebenfalls wird YB-1 mit verschiedenen Erkrankungen, wie z.B. der Arterosklerose, Nierenerkrankungen verschiedener Entitäten (z.B. der mesangioproliferative Nephritis und der entzündlichen Nierentransplantatabstoßung) in Verbindung gebracht (Krohn et al., 2007), (van Roeyen et al., 2005), (Raffetseder et al., 2009). Wenig bekannt ist jedoch der Einfluss auf andere chronisch entzündliche Erkrankungen wie der Endometriose.

Die Arbeitsgruppe Endometriose von Frau Prof. Dr. Hornung konnte bereits im Vorfeld das YB-1-Gen und -Protein in Endometriosegewebe sowie in Endometrium und peritonealen Makrophagen von Patientinnen mit Endometriose identifizieren. Hier wurde eine signifikant höhere Expression von YB-1 nachgewiesen im Vergleich zu Frauen ohne Endometriose. Es ist anzunehmen, dass YB-1 in der Entwicklung von Endometriose eine entscheidende Rolle spielt. Die Entstehung und Progression von Endometriose konnte bisher jedoch noch nicht abschließend aufgeklärt werden. Mögliche Theorien wurden im Rahmen dieser Arbeit beschrieben. Verschiedene biologische Funktionen in der Zelle werden von YB-1, welches die Expression von bestimmten Proteinen reguliert, beeinflusst. Insbesondere sind hiervon Wachstumsfaktoren betroffen, die die Proliferation regulieren können (EGFR, MMP-2, DNS-Topoisomerase 2α , PCNA und Mitglieder der MAP-Kinase-Familie (Sakura et al., 1988), (Mertens et al., 1999), (Jürchott et al., 2010), (Travali et al., 1989), (Shibao et al., 1999)).

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich zeigen, dass YB-1 ein Einflussfaktor in der Entstehung und Progression von Endometriose ist. Andere Forschungsgruppen hatten bereits an Zell-Linien, die von Tumorgeweben abstammen, entsprechende Ergebnisse erbracht. Diese konnten ebenfalls eine Veränderung der Proliferationsrate nach einem knock-down von YB-1 durch eine siRNS feststellen (Shiota et al., 2008), (Basaki et al., 2010). YB-1 konnte in Endometrium weder immunhistochemisch noch immunzytochemisch detektiert werden, jedoch in Endometriose-Epithel- und Stromazellen (Silveira et al., 2011). Endometriosegewebe besitzt eine gesteigerte Proliferationsrate, was zur Progression der Herde beiträgt (Donnez et al., 1994). Diese Beobachtungen bekräftigen die Ergebnisse dieser Arbeit, welche darlegen, dass YB-1 ein wachstumsfördernder Faktor in Endometriose-Epithel-Zellen ist. Anhand des durchgeführten Proliferationsassays ließ sich nachweisen, dass durch die Behandlung der Zellen mit der Hs-YBX-1 Hp siRNS im Gegensatz zu den mit NT-siRNS behandelten Zellen eine signifikant verminderte Proliferation hervorgerufen wird. Darüber hinaus kann anhand der Ergebnisse des Proliferationsassays der Einfluss des Transfektionsmediums auf die Z-12-Zellen beschrieben werden. Die untransfizierten Zellen proliferierten in den untersuchten Gruppen am stärksten. Im Vergleich dazu wiesen die mock-Zellen eine geringere Proliferationsrate auf. Eine nochmals geringere Proliferationsrate wird erzielt durch die Behandlung der Zellen mit NT-siRNS. Hieraus lässt sich ableiten, dass bereits die Behandlung der Zellen mit dem Transfektionsmedium sowie einer NT-siRNS das Zellwachstums beeinträchtigt. Festzustellen ist, dass der durch die Behandlung mit Hs-YBX-1 Hp siRNS hervorgerufene YB-1-knock-down die stärkste Proliferationshemmung der Zellen im Vergleich zu den mit NT-siRNS behandelten Zellen bewirkt. Dies lässt schließen, dass YB-1 in der Endometriose-Epithel-Zell-Linie ein wachstumsfördernder Faktor ist, welcher durch den knock-down gehemmt werden konnte. Wie die genauen molekularbiologischen Zusammenhänge in der Zelle ablaufen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Es kann aber aus Untersuchungen zu anderen Gewebetypen angenommen werden, dass auch die oben genannten Wachstumsfaktoren in Z-12-Zellen in gleicher Weise von YB-1 beeinflusst werden. Da eine Steigerung oder Reduktion der Proliferationsrate mit einer Veränderung der Apoptoserate einhergeht, wurde diese in der voliegenden Arbeit ebenfalls untersucht.

Der programmierte Zelltod wird von allen Zelltypen zur Eliminierung von alten oder nutzlos gewordenen Zellen sowie im Rahmen biologischer Prozesse (z.B. bei der Embryogenese oder in der Entwicklung und Verschaltung neuer Neuronen) verwendet. Im Unterschied zur Nekrose kann die Apoptose sowohl extern als auch im Inneren der Zelle eingeleitet werden, ohne ein inflammatorisches Signal auszulösen. Eine Fehlsteuerung der Apoptose ist häufig ein Verursacher schwerwiegender pathologischer Prozesse. So ließ sich ebenfalls bei der Pathogenese von Endometriose ein vermindertes Apoptosepotential identifizieren. Epithelzellen der peritonealen Endometrioseherde zeigten sich gegenüber makrophagenvermittelter Zell-Lyse weniger empfindlich als die Epithelien aus eutopem Endometrium (Steck et al., 2004). Apoptose wird durch verschiedene externe Stimuli induziert, die einen *pathway*-Mechanismus zur Apoptose auslösen. Ein wichtiger Stimulus ist das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α , welches hier bei der Untersuchung der Apoptose Verwendung fand.

Nachdem die Zelle das Signal zum programmierten Zelltod erhalten hat, durchläuft sie typische morphologische, biochemische und physiologische Veränderungen, die charakteristisch für den Ablauf der Apoptose sind. Die DNS wird fragmentiert und in 180 bp große Bruchstücke zerschnitten, welche einem Nukleosom oder einem Vielfachen davon (Mono-, Oligonukleosom) entsprechen. Ein Nukleosom besteht aus einem Oktamer von Histonen (Typ 2A, 2B, 3 und 4) sowie einer umwindenden DNS-Schleife. Die Menge der freigesetzten Histone und umspannenden DNS-Fragmente wurde von dem in dieser Arbeit angewendeten Apoptose-Assay detektiert. Hierdurch konnte die Apoptoserate bestimmt werden. Bei Endometriose wurden verschiedene Mediatoren, die zur Verringerung der Apoptoserate führen, in veränderten Konzentrationen gemessen. Es ließ sich eine Erhöhung des Bcl-2 und eine Verringerung des BAX-Proteins sowie eine Erhöhung von Matrixmetalloproteasen (MMP) feststellen (Meresman et al., 2000), (Ria et al., 2002), (Ueda et al., 2002). Die Untersuchungen dieser Arbeit erbrachten den Nachweis, dass in Z-12-Zellen, in denen YB-1 erfolgreich herunter reguliert wurde, eine signifikant gesteigerte Apoptoserate zu verzeichnen war. Für die YB-1-siRNS-transfizierten Zellen ließ sich im Vergleich zu NT-siRNS-transfizierten Zellen eine erhöhte Apoptoserate zeigen. Aus den Ergebnissen lässt sich interessanterweise ablesen, dass der Effekt des knock-downs auf die Apoptose nicht mehr zusätzlich durch die Stimulation mit TNF- α verstärkt werden kann. Auch über die Behandlung der Zellen mit TNF- α in unterschiedlichen Konzentrationen konnte keine signifikante Steigerung der Apoptoserate erreicht werden. Es zeigte sich auch eine signifikante Steigerung der Apoptoserate von NT-siRNS-transfizierten und mit Transfektionsmedium behandelten Zellen (mock) im Vergleich zu den nativen Zellen. Wie schon zuvor dargelegt, lässt sich dieser Effekt durch den Einfluss der zur Transfektion verwendeten Substanzen erklären, wodurch in diesem Experiment die Anhebung der Apoptoserate mit verursacht wird.

Die Feststellung der Apoptosesteigerung durch YB-1 lässt zusammen mit den Ergebnissen aus den Proliferationsuntersuchungen auf den progressionsfördernden Effekt von YB-1 in Endometriosezellen schließen (Meresman et al., 2000), (Ria et al., 2002), (Ueda et al., 2002). In den Westernblots konnte zuvor eine Steigerung der

YB-1-Proteinexpression dargelegt werden, nachdem die Zelle Stress in Form der Transfektion ausgesetzt wurde. Angesichts der erhobenen Daten zur Proliferation und Apoptose lässt sich jedoch schlussfolgern, dass diese Expressionssteigerung nicht ausreichend ist, um für den zellschädigenden Effekt der Transfektion zu kompensieren. Der Zusammenhang, dass YB-1 sowohl die Proliferation als auch die Apoptose beeinflusst, wurde bereits in verschiedenen Tumorgeschehen nachgewiesen. In Brustepithelzellen konnte eine direkte Verbindung zwischen YB-1 und dem Tumorsupressorgen p53 gefunden werden (Homer et al., 2005). Durch die Hemmung von YB-1-antisense-Oligonukleotiden wird eine gesteigerte Expression der pro-apoptotischen Promotoren (z.B. BAX, NOXA) eingeleitet. Dies hat letztendlich eine erhöhte Zelltodrate zur Folge. Weiter scheint sich über die Bindung von YB-1 an p53 die Fähigkeit zur Promotorbindung zu verringern. P53 kann in diesem Zustand nicht mehr so leicht an Promotoren mit geringerer Bindungskapazität andocken. Promotoren wie der anti-apoptotische CDKN1A-Promotor weisen eine höhere Bindungskapazität auf, wohingegen z.B. der pro-apoptotische Promotor BAX eher die Fähigkeit verliert, an p53 zu binden. Andere anti-apoptotische Promotoren (z.B. MDM2) werden jedoch nicht durch YB-1 beeinflusst. In der Summe entsteht somit ein Ungleichgewicht der Regulatoren der Genexpression zu Gunsten der anti-apoptotischen Promotoren, was zur Verringerung der Apoptoserate durch YB-1 führt. Überträgt man diese Erkenntnisse auf Endometriosezellen, korrelieren sie mit den Resultaten dieser Arbeit. In Untersuchungen an anderen Zellkulturen ließ sich allerdings keine Stimulierung der Apoptose durch einen knockdown von YB-1 nachweisen: In HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) wurde ein vermehrter Zellzyklusarrest in der G1-Phase festgestellt, eine vermehrte Induzierung der Apoptose konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Takahashi et al., 2010).

Um die beschriebenen Mechanismen in Endometriosezellen noch weiter zu bestätigen und tiefgründiger zu erforschen, sind weiterführende Untersuchungen und Experimente notwendig. Indem wir an den Z-12-Zellen nachweislich zeigen konnten, dass YB-1 die Apoptose negativ beeinflusst, ist der erste Schritt auf diesem Weg bereits erfolgreich getan worden.

Eine weitere Eigenschaft von Endometriosegewebe ist die Fähigkeit, durch die Basalmembranen in umgebendes Gewebe zu invadieren. Metastasen und Tumoren benötigen die Fähigkeit, durch Zellbarrieren hindurch zu wandern. Jedoch verfügen auch bestimmte Zellen des Immunsystems (z.B. T-Zellen invadieren durch die Blut-Hirn-Schranke) und Zellen in entwicklungsspezifischen Vorgängen über die Fähigkeit der Invasion. Tumoren sekretieren dafür unter anderem verschiedene MMPs, mit deren Hilfe sie durch die Basalmembranen dringen. Verschiedene Studien konnten den Nachweis erbringen, dass die Aktivität von einigen MMPs (MMP-9, MMP-2) in Endometriose stark erhöht ist (Mizumoto et al., 2002), (Wenzl and Heinzl, 1998), (Hudelist et al., 2005). In eutopen Endometrium von menstruierenden Frauen fanden sie verschiedene MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3) in gesteigerten Konzentrationen. Diese spielen in den zyklusbedingten Umbauprozessen eine ausschlaggebende Rolle (Kokorine et al., 1996). Proteolytische Faktoren wurden auch außerhalb der Menstruationsphase in endometriotischen Läsionen nachgewiesen, was einen Hinweis auf die Ursache der Invasivität von endometriotischen Zellen gibt (Irwin et al., 1996). YB-1 wird als ein wichtiger Regulator von verschiedenen MMPs (MT1-MMP) beschrieben (Lovett et al., 2010).

Des Weiteren wurde ein geringerer Besatz von Progesteronrezeptoren an endometriotischen Läsionen beobachtet. Progesteron hemmt normalerweise in eutopem Endometrium die Sezernierung von verschiedenen MMPs (MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-10). Durch den verminderten Besatz mit Progesteronrezeptoren auf ektopem Endometrium verringert sich bzw. entfällt der hemmende Effekt des Hormons auf die MMPs und lässt diese verstärkt in peritonealen endometriotischen Läsionen auftreten. MMPs werden in einer inaktiven Vorstufe sezerniert. Die Vorstufe kann unter anderem von IL-1 α aktiviert werden, das von Epithelzellen sezerniert wird. In ektopem Endometrium konnte ebenfalls eine erhöhte Konzentration von IL-1 α gemessen werden (Hudelist et al., 2005).

Betrachtet man diese Beobachtungen insgesamt, so lässt sich die Neigung des ektopen Endometriums zu einer verstärkten peritonealen Invasivität sowie die proteolytische Aktivität von endometriotischen Infiltraten erklären.

Im Zusammenhang mit diesen gesammelten Erkenntnissen ist anzunehmen, dass durch einen *knock-down* von YB-1 die Invasivität der Z-12-Zellen *in vitro* beeinflusst werden

kann. Um sich diesem Zusammenhang anzunähern, wurde ein Sandwich-Immuno-Assay durchgeführt, bei dem die Zellen durch mehrere Filter hindurch dringen müssen. Die Schichtung des Sandwiches stellt bei diesem Experiment die Basalmembran im Gewebe nach, durch welche die Zellen invadieren. Untersucht wurden die relative Invasion (Formel 2.1) berechnet. Sie stellt prozentual die Menge der Zellen dar, die nach einer bestimmten Zeit auf den Nitrozellulosefiltern gemessen werden konnten. Die absolute Invasion (Formel 2.2) stellt die Fraktion der Zellen dar, die von der Gesamtmenge der Zellen bis auf den Nitrozellulosefilter durchgedrungen sind. Die totale Adhäsion (Formel 2.3) zeigt, wie viele der Zellen in Abgleich mit der Proliferationskontrolle zur Adhäsion an die im Versuch gegebenen Filter befähigt sind. Die Adhäsion stellt die Voraussetzung zur weiteren Invasion dar. Im Experiment konnte leider kein direkter Effekt des *knock-downs* auf die Invasion festgestellt werden, was u. a. an der multifaktoriellen genetischen sowie hormonellen Regulierung und Aktivierung von Invasion regulierenden Faktoren wie z.B. den beschriebenen MMPs liegen könnte.

Die geringen Erfolge dieses Experimentes wurden zunächst auf etwaige Ungenauigkeiten in der Methodik zurückgeführt. Um unspezifische Messmethoden auszuschließen, wurde versucht, das Verfahren zur Zählung der Zellen zu optimieren. Anfangs wurden die invadierten und fluoreszenzmarkierten Zellen fotografiert, mittels des Programms Image J ausgewertet und die relative Invasionsrate, totale Adhäsion und absolute Invasion berechnet. Hierbei ließ sich kein Unterschied zwischen den Zellen des YB-1-*knock-downs* und den nativen Zellen erkennen. Zur Optimierung der Zählung der fluoreszenzmarkierten invadierten Zellen wurde die Messung mittels fluoreszensfähigem *microplatereaders* eingeführt, welche eine genauere Zählung der invadierten Zellen ermöglicht. Bei dieser genaueren Messmethode ließ sich durchaus eine Tendenz darstellen, die einen Unterschied zwischen den YB-1 *knock-down*-Zellen und Kontrollgruppen darlegt. Allerdings konnte auch hier kein signifikanter Effekt von YB-1 auf die Invasionsfähigkeit von Endometriosezellen bewiesen werden.

Die Entwicklung von Endometriose steht in enger Beziehung zu einem inflammatorischen Prozess, in den Immunzellen, die ihre ursprüngliche Funktion verändert haben, involviert sind. Dieser Prozess entwickelt sich vor allem im Abdomen. Ob die Veränderung des Immunsystems lediglich eine Folge der langjährigen Einnistung der Endometioseherde oder eine kausale Ursache der Pathogenese ist, bleibt weitgehend unklar. Interessanterweise wurden in der Peritonealflüssigkeit von Patientinnen mit Endometriose erhöhte Mengen von aktivierten Makrophagen, sezernierten Zytokinen und Wachstumshormonen gefunden. Die Konzentration dieser Zytokine korreliert mit dem

Diskussion

Stadium der Erkrankung. Eines dieser Zytokine ist RANTES, welches in Zusammenhang mit der Pathogenese von Endometriose gebracht wird (Khorram et al., 1993). Krohn et al. zeigten, dass das Y-box-bindende Protein 1 ein zellspezifischer Regulator von RANTES ist, wodurch ein Einfluss von YB-1 auf entzündliche Prozesse angenommen werden kann (Krohn et al., 2007).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Hemmung von YB-1 die RANTES-Expression beeinflusst werden kann. Durch den *knock-down* von YB-1 steigerte sich die RANTES-Expression, wenn die Zellen zuvor mit TNF- α stimuliert wurden. Gleiche Zusammenhänge konnten bereits in glatten Muskelzellen demonstriert werden (Krohn et al., 2007). Angesichts der durchgeführten Experimente konnte die regulative Fähigkeit von YB-1 auf RANTES auch in Endometriosezellen bewiesen werden.

Die Datenlage in der Literatur zum Einfluss von YB-1 auf inflammatorische Prozesse ist widersprüchlich. Krohn et al. beschrieben hierfür einen pro-inflammatorischen Effekt von YB-1, welcher in der Entwicklung von bestimmten Erkrankungen eine Rolle spielt (Krohn et al., 2007). Die Konzentration von RANTES konnte besonders in Stadium IV (rAFS) von Endometriose erhöht gemessen werden (Khorram et al., 1993). Zusätzlich kann YB-1 nach inflammatorischem Signal auf einem nicht-klassischen Weg sekretiert werden und besitzt extrazellulär mitogene und pro-migratorische Eigenschaften im Entzündungsgeschehen (Frye et al., 2009). Im Widerspruch dazu zeigten die Untersuchungen dieser Arbeit einen anti-inflammatorischen Effekt von YB-1 auf die Z-12-Zellen. Dies ist mit verschiedenen Aspekten in Verbindung zu bringen. Zum einen wurde von Hornung et al. belegt, dass hauptsächlich die Stromazellen von Endometrium und Endometriosegewebe für die Exkretion von RANTES verantwortlich sind (Hornung et al., 1997). In Stromazellen konnte allerdings im Vergleich zu Epithelzellen aus Endometrioseläsionen nur in geringem Maße YB-1 nachgewiesen werden (Silveira et al., 2011), weshalb sich diese Arbeit auf Experimente mit der Epithel-Zell-Line-Z-12 beschränkt. Epithelzellen besitzen modulierende Eigenschaften in der lokalen Immunabwehr und gewährleisten eine verbesserte Gewebeintegrität (Polito and Proud, 1998). Möglicherweise kann durch die Epithelzellen das Überleben des ektopen Endometriosegewebes auch dadurch gefördert werden, dass sie über die Regulation von YB-1 pro-inflammatorische Signale hemmen. Anti-inflammatorische Eigenschaften von YB-1 konnten ebenfalls in anderen Zellarten dargelegt werden (Inagaki et al., 2005), (Dooley et al., 2006).

Die verschiedenen, teils widersprüchlichen Ergebnisse zu YB-1 zeigen letztendlich, dass die Zusammenhänge sehr komplex sind und bereits gesammelte Erkenntnisse nicht allgemeingültig auf andere Zelltypen und Pathologien übertragen werden können. Die Beziehung zwischen RANTES, YB-1 und anderen Immunmodulatoren muss noch weiter erforscht werden, um eine zufriedenstellende Aussage über die Wechselbeziehungen machen zu können. Erst im Anschluss daran können neue therapeutische Optionen in Erwägung gezogen werden, um Endometriose zu bekämpfen. Künftig sollte ein besonderes Augenmerk auf das Verständnis der inflammatorischen Prozesse gelegt werden, da die chronische Inflammation des Peritoneums größtenteils zur Schmerzentstehung beiträgt. Auf diese Weise könnte Patientinnen mit starken Schmerzen eventuell eine neue hilfreiche Therapie angeboten werden.

Abschließend ist zu diskutieren, ob das Modell der Z-12-Zellen mit den Entwicklungsprozessen *in vivo* übereinstimmt. Tatsächlich konnte durch verschiedene Studien bewiesen werden, dass Z-12-Zellen annähernd gleiche Eigenschaften wie Endometriosegwebe besitzen. Banu et al. konstatierten, dass die Z-12-Zellen ihre mitogenetische, angiogenetische, migrative und invasive Natur beibehalten (Banu et al., 2008), (Banu et al., 2009). Für diesen Nachweis implantierten sie Z-12-Zellen in die Peritonealhöhle von Nacktmäusen. Dort gelang es den Zellen, sich anzuheften, zu proliferieren, zu invadieren und letztendlich peritoneale Endometrioseherde zu entwickeln. Wenngleich man das tatsächliche Verhalten von Zellen aus Endometriosegewebe im menschlichen Organismus nicht vollständig mit diesen Erkenntnissen gleichsetzen kann, zeigen Banu et al. dennoch, dass die Z-12-Zellen ein potentes Modell für die tatsächliche Situation *in vivo* sind.

Der Transkriptionsfaktor YB-1 konnte als ein wichtiger Einflussfaktor auf die Pathogenese verifiziert werden. Nach der Hemmung von YB-1 wurden veränderte Zelleigenschaften beobachtet. Verschiedene Forschungsgruppen konnten bereits einen Zusammenhang zwischen YB-1 und unterschiedlichen Tumorerkrankungen herstellen. Im Rahmen dieser Dissertation konnte nunmehr der Einfluss von YB-1 auf die Entstehung und Progression von Endometriose nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde der Einfluss von RANTES auf das inflammatorische Geschehen bekräftigt.

In der weiteren Erforschung des Einflusses von YB-1 auf Endometriose könnte ein wichtiger Ansatzpunkt zur Entwicklung einer neuen Therapie sowie zur Klärung der Pathogenese von Endometriose liegen.

Anhang A

A.1 Lebenslauf

persönliche Angaben

Name Anschrift

Geburtsdatum/-ort Familienstand

Julia Lappe, geb. Krampe Kufsteinerstrasse 4, 18069 Rostock, Deutschland 22.01.1986 in Wismar verheiratet, 1 Kind



allgemeine Schulbildung

August 1996-2005

Große Stadtschule

Studium der Humanmedizin

Dezember Juni 2012

Oktober 2 August 20

August 20

Oktober 2007-Juli 2008

"Geschwister-Scholl-Gymnasium" Wismar

r 2013	2. Staatsexamen an der Universität Rostock
2-Mai 2013	Praktisches Jahr an der Universität zu Rostock
	1. Tertial: Heliosklinikum Wismar Innere Medizin
	2. Tertial: Universitätsfrauenklinik Rostock
	3. Tertial: Unfallchirurgie Südstadtklinikum Rostock
2011-Juni 2012	Urlaubssemester/Elternzeit
009-September 2011	Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums
	an der Universität zu Lübeck
008-Juli 2009	Auslandsjahr im Medizinstudium
	an der Rigas Stradins Universitate, Lettland
2007-Juli 2008	Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums

	an der Universität Lübeck
September 2007	1. Staatsexamen (Physikum)
Oktober 2005-September 2007	Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums
	an der Universität zu Lübeck

Famulaturen

August-September 2010	Röntgenpraxis Laube, Wismar
August 2010	Gynäkologie/Geburtshilfe, Gemeinschaftskrankenhaus
	Havelhöhe, Berlin
März 2010	Abt. Neonatologie und neonatologische Intensivstation,
	Südstadt Klinikum, Rostock
Februar 2008-März 2010	Universitätsfrauenklinik, Klinikum Südstadt, Rostock
September 2009-Oktober 2009	Gynäkologie/Geburtshilfe,
	Krankenhaus Göttlicher Heiland, Wien
September 2009	Anästhesie, Krankenhaus Göttlicher Heiland, Wien
Februar 2008	Gemeinschaftliche Praxis für Allgemeinmedizin
	Dres. Ehrhardt, Evert, Rott, Rostock

studentische Arbeitsstellen

2009-2010	Studienmitbetreuung in der Abteilung für Kinderendokrinologie und Diabetesberatung der Universität zu Lübeck
Arbeitsstellen	
ab März 2014	Assistenzärztin der Universitätsfrauenklinik Rostock
Fremdsprachen	
Englisch Lettisch	fließend Grundkenntnisse

A.1.1 Veröffentlichung

Silveira, C. G. T., Krampe, J., Ruhland, B., Diedrich, K., Hornung, D., and Agic, A. Cold-Shock domain family member YB-1 expression in endometrium and endometriosis. Human Reproduction, 27(1):173-182, 2011.

Literaturverzeichnis

- A, A. Endometriosis-associated ovarian cancer: A ten-year cohort study of women living in the estrie region of quebec, canada. *J of Ovarian Research*, 3, 2, 2010.
- Asakuno, K., Kohno, K., Uchiumi, T., Kubo, T., Sato, S., Isono, M., and Kuwano, M. Involvement of a DNA binding protein, MDR-NF1/YB-1, in human MDR1 gene expression by actinomycin D. *Biochem Biophys Res Comm*, 199(3):1428–1435, 1994.
- Badawy, S. Z., Cuenca, V., Marshall, L., Munchback, R., Rinas, A. C., and A, C. D. Cellular components in peritoneal fluid in infertile patients with and without endometriosis. *Fertil Steril*, 42(5):704–708, 1984.
- Banu, S. K., Lee, J., Starzinski-Powitz, A., and Arosh, J. A. Gene expression profiAles and functional characterization of human immortalized endometriosis epithelial and stromal cells. *Fertil Steril*, 90:972–987, 2008.
- Banu, S. K., Starzinski-Powitz, A., Speights, V. O., Burghardt, R. C., and Arosh, J. A. Induction of peritoneal endometriosis in nude mice with use of human immortalized endometriosis epithelial and stromal cell: A potential experimental tool to study molecular pathogenesis of endometriosis in humans. *Fertil Steril*, 91:2199–2209, 2009.
- Bargou, R. C., Jürchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., Mapara, M. Y., Winzer, K. J., Dietel, M., Dörken, B., and Royer, H. D. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat Med*, 3(4):447–450, 1997.
- Basaki, Y., Taguchi, K., Izumi, H., Murakami, Y., Kubo, T., Hosoi, F., Watari, F., Nakano, K., Kawaguchi, H., Ohno, S., Kohno, K., Ono, M., and Kuwano, M. Y-box binding protein-1 (YB-1) promotes cell cycle progression through CDC6-dependent pathway in human cancer cells. *European Journal of Cancer*, 46(5):954–965, 2010.
- Berridge, M. V. and Tan, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Biochem Biophys*, 303(2):474–482, 1993.
- Craig, H., Knight, D. A., and Hannaneia, L. Y-box factor YB-1 controls apoptotic function. *Oncogene*, 24:8314–8325, 2005.

- Czernoblisky, B., Silverman, B. B., and Enterline, H. T. Clear-cell carcinoma of the ovary. A clinicopathologic analysis of pure and mixed forms and comparison with endometroid carcinoma. *Cancer*, 25(4):762–772, 1970.
- Dadawy, S. Z., Cuenca, V., Marshall, L., Munchback, R., Rinas, A. C., and Coble, D. A. Cellular components in peritoneal fluid in infertile patients with and without endometriosis. *Fertil Steril*, 42:704–708, 1984.
- DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J., Huang, C., Lee, W., Mario, E., Paucha, E., and Livingstone, D. M. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*, 54:275–283, 1988.
- Didier, D. K., Schiffenbauer, J., Woulfe, S. L., Zacheis, M., and Schwartz, B. D. Charakterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex 2 Y-box. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:7322–7326, 1988.
- Donnez, J., Nisolle, M., and Casanas-Roux, F. Peritoneal endometriosis: twodimensional and three-dimensional evaluation of typical and subtile lesions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 734:342–351, 1994.
- Dooley, S., Said, H. M., Gressner, A. M., Floege, J., En-Nia, A., and Mertens, P. R. Y-box binding protein-1 is the crucial mediator of antifiĄbrotic interferon gamma effects. *J Biol Chem*, 281:1784–1795, 2006.
- Duh, J. L., Zhu, H. A., Shertzer, H. G., Nebert, D. W., and Puga, A. The Y-box motif mediates redox dependent transcriptional activation in mouse cells. *J Biol Chem*, 270:30499–30507, 1995.
- Ebert, A. D., Bartley, J., David, M., and Schweppe, K. W. Aromatase inhibitorstheoretical concept and present experiences in the treatment of endometriosis. *Zentralbl Gynakol*, 125(7-8):247–51, 2003.
- Ewen, M. E., Ludlow, J. W., Marsilio, E., DeCaprio, J. A., Millikan, R. C., Cheng, S. H., Paucha, E., and Livingston, D. M. An N-terminal transformation-governing sequence of SV40 large t-antigen contributes to the binding of both p110Rb and a second cellular protein, p120. *Cell*, 58:257–267, 1989.
- Frye, B. C., Halfter, S., Djudjaj, S., Muehlenberg, P., Weber, S., Raffetseder, U., En-Nia, A., Knott, H., Baron, J., Dooley, S., Bernhagen, J., and Mertens, P. R. Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen. *EMBO rep*, 10:783–789, 2009.
- Gaetje, R., Kotzian, S., Herrmann, G., Baumann, R., and Starzinski-Powitz, A. Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. *Am J Pathol*, 150:461–467, 1997.
- Gaudreault, I., Guay, D., and Lebel, M. YB-1 promotes strand separation in vitro of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifiAcations, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins. *Nucl Ac Res*, 32(1):

316-327, 2004.

- Giminez-Bonafe, T., Fedoruk, M. N., Withmore, T. G., Akbari, M., Ralph, J. L., Ettinger, S., Gleave, M. E., and Nelson, C. C. YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increase P-glycoprotein activity. *Prostate*, 59(3):337–349, 2004.
- Goldstein, J., Pollit, N. S., and Inouye, M. Major cold shock protein of Escherichia Coli. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:283–287, 1990.
- Grant, C. E. and Deeley, R. G. Cloning and characterization of chicken YB-1. Regulation of expression in the liver. *Mol Cell Biol*, 13:4186–4196, 1993.
- Graumann, P. and Marahiel, M. A. A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules. *BioEssays*, 18:309–315, 1996.
- Habibi, G., Leung, S., Law, J. J. H., Gelmon, K., Masdouid, H., Turbin, D., Pollack, M., Nielsen, T. O., Huntsman, D., and Dunn, S. RedefiAning prognostic factors for breast cancer: YB-1 is a stronger predictor of relapse and disease-specifiAc survival than estrogen receptor or HER-2 across all tumor suptypes. *Breast Cancer Res*, 10: R86, 2008.
- Haney, A. F., Muscato, J. J., and Weinberg, J. B. Peritoneal fluid cell populations in infertility patients. *Fertil Steril*, 35:696–698, 1981.
- Hazan, R. B., Phillips, G. R., Qiao, R. F., Norton, L., and Aaronson, S. A. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol*, 148:779–790, 2000.
- Ho, H. N., Wu, M. Y., and Yang, Y. S. Peritonel cellular immunity and endometriosis. *AM J Reprod Immunol*, 38:400–412, 1997.
- Homer, C., Knight, D. A., Hananeia, L., Sheard, P., Risk, J., Lasham, A., Royds, J. A., and Braithwaite, A. W. Y-box factor YB-1 controls p53 apoptotic function. *Oncogene*, 24(56):8314–8325, 2005.
- Hornung, D., Bentzien, F., Wallwiener, D., Kiesel, L., and Taylor, R. N. Chemokine bioactivity of RANTES in endometriotic and normal endometrial stromal cells and peritoneal fluid. *Mol Hum Reprod*, 7(2):163–168, 2001.
- Hornung, D., Ryan, I. P., Chao, V. A., Vigne, J. L., Schriock, E. D., and Taylor, R. N. Immunolocalization and regulation of the chemokine rantes in human endometrial and endometriosis tissue and cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 82(5):1621–8, 1997.
- Hudelist, G., Lass, H., Keckstein, J., Walter, I., Wieser, F., Wenzl, R., Mueller, R., Czerwenka, K., Kubista, E., and Singer, C. F. Interleukin 1 alpha and tissue-lytic matrix metalloproteinase-1 are elevated in ectopic endometrium of patients with endometriosis. *Human Reproduction*, 20(6):1695–1701, 2005.
- Inagaki, Y., Kushida, M., Higashi, K., Itoh, J., Higashiyama, R., Hong, Y. Y., Kawada, N., Namikawa, K., Kiyama, H., Bou-Gharios, G., Watanabe, T., Okazaki, I., and Ikeda, K. Cell type-specific intervention of transforming growth factor beta/Smad signaling suppresses collagen gene expression and hepatic fibrosis in mice. *Gastroenterology*, 129(1):259–268, 2005.
- Irwin, J. C., Kirk, D., Gwatkin, R. B., Navre, M., Cannon, P., and Giudice, L. C. Human endometrial matrix metalloproteinase-2, a putative menstrual proteinase. hormonal regulation in cultured stromal cells and messenger RNA expression during the menstrual cycle. J Clinic Invest, 97:438–347, 1996.
- Janz, M., Harbeck, N., Dettmar, P., Berger, U., Schmidt, A., Jurchott, K., Schmitt, M., and Royer, H. D. Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int J Cancer*, 97(3):278–282, 2002.
- Jiang, W. N., Hou, Y., and Inouye, M. CspA, the major cold-shock protein of escherichia coli, is an RNA chaperone. *J Biol Chem*, 272:196–202, 1997.
- Jürchott, K., Bergmann, S., Stein, U., Walther, W., Janz, M., Manni, I., Piaggio, G., Fietze, E., Dietel, M., and Royer, H. YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J Biol Chem*, 278:27988–27996, 2003.
- Jürchott, K., Kuban, R., Krech, T., Blüthgen, N., Stein, U., Walther, W., Friese, C., Kielbasa, S. M., Ungethüm, U., Lund, P., Knösel, T., Kemmner, W., Morkel, M., Fritzmann, J., Schlag, P. M., Birchmeier, W., Krüger, T., Sperling, S., Sers, C., Royer, H., Herzel, H., and Schäfer, R. IdentifiAcation of Y-box binding protein 1 as a core regulator of MEK/ERK pathway-dependent gene signatures in colorectal cancer cell. *PLoS Genet*, 12(6):e1001231, 2010.
- Kamura, T., Yahata, H., Amada, S., Ogawa, S., Sonoda, T., Kobayashi, H., Mitsomoto, M., Kohno, K., Kuwano, M., and Nakano, H. Is nuclear expression of Y-box binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma? *Cancer*, 85 (11):2450–2454, 1999.
- Kashihara, M., Azuma, K., Kawahara, A., Basaki, Y., Hattori, S., Yanagawa, T., Terazaki, Y., Takamori, S., Shirouzu, K., Aizawa, H., Nakano, K., Kage, M., Kuwano, M., and Ono, M. Nuclear Y-box binding protein-1, a predictive marker of prognosis, is correlated with the expression HER2/ErbB3 in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 4(9):1066–1074, 2009.
- Khorram, ., Taylor, R. N., Ryan, I. P., Schall, T. J., and Landers, D. V. Peritoneal fluid concentration of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis. *J Obstet Gynecol*, 169:1545–1549, 1993.
- Kierstead, T. D. and Tevethia, M. J. Association of p53 binding and immortalization of primary C57B/6 mouse embryo fiAbroblasts using SV40 T antigen mutants bearing

internal overlapping deletion mutations. J Virol, 65:1817–1829, 1993.

- Kokorine, I., Marbaix, E., Henriet, P., Okada, Y., Donnez, J., Eeckhout, Y., and Courtoy, P. J. Focal cellular origin and regulation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) are related to menstrual breakdown in the human endometrium. *J Cell Science*, 8:2151–2160, 1996.
- Kolluri, R., Torrey, T. A., and Kinniburgh, A. H. A (ct) promoter element binding protein: defiAnition of a doubbelstrand and a novel single-strand DNA binding moti.f. *Nucleic Acids Research*, 20:111–116, 1992.
- Krohn, R. IdentifiAcation of Novel Chemokine and Chemokine-like mechanism in leucocyts adhesion and atherosklerotic lesion formation. PhD thesis, RWTH Aachen University, 2008.
- Krohn, R., Raffetseder, U., Bot, I., Zernecke, A., Shagdarsuren, E., Liehn, E. A., van Sant-brink, P. J., Nelson, P. J., Biessen, E. A., Mertens, P. R., and Weber, C. Y-Box binding protein-1 controls CC chemokine ligand-5 (CCL5) expression in smooth muscle cells and contributes to neointima formation in Atherosclerosis-Prone mice. *Circulation*, 116:1812–1820, 2007.
- Kudo, S., Mattei, M. G., and Fukuda, M. Characterization of the gene for dbpA, a family member of the nucleic-acid-binding proteins containing a cold-shock domain. *Eur J Biochem*, 231:72–82, 1995.
- Ladomery, M. and Sommerville, J. A role for Y-box proteins in cell proliferation. *BioEssays*, 17:9–11, 1995.
- Lebovic, D. I., Mueller, M. D., and Taylor, R. N. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril*, 5(1):1–10, 2001.
- Leyendecker, G., Kunz, G., Noe, M., Herbertz, M., and Mall, G. Endometriosis: A dysfunction and disease of the archimetra. *Hum Reprod Update*, 4(5):752–62, 1998.
- Lin, J. Y. and Simmons, D. T. The ability of large T antigen to complex with p53 is necessary for the increased lifespan and partial transformation of human cells by SV40. *J Virol*, 65:6447–6453, 1991.
- Lipson, K. E., Chen, S.-T., Koniecki, J., Ku, D.-H., and Baserga, R. S-phase specific regulation by deletion mutants of the human thymidine kinase promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:6848–6852, 1989.
- Lovett, D. H., Cheng, S., Cape, L., Pollock, A. S., and Mertens, P. R. YB-1 alters MT1-MMP trafiAcking and stimulates MCF-7 breast tumor invasion and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*, 298(3):482–488, 2010.
- Makino, Y., Ohga, T., Toh, S., Koike, K., Okumra, K., Wada, M., Kuwano, M., and Kohno, K. Structural and functional analysis of human Y box-binding protein (YB-1) gene promoter. *Nucleic Acid Res*, 24:1873–1878, 1996.

- Matsumoto, K. and Wolffe, A. P. Gene regulation by Y box proteins:coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol*, 8:318–323, 1998.
- Meng, X., Ichim, T. E., Zhong, J., Rogers, A., Yin, Z., Jackson, J., Wang, H., Ge, W., Bogin, V., Chan, K. W., Thebaud, B., and Riordan, N. H. Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. *J Translat Med*, 5:57, 2007.
- Meresman, G. F., Vighi, S., Buquet, R. A., Contreras-Ortiz, O., Tesone, M., and Rumi, L. S. Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril*, 74:760–766, 2000.
- Mertens, P. R., Alfonso-Jaume, M. A., Steinmann, K., and Lovett, D. H. YB-1 regulation of the human and rat Gelatinase A genes via similar enhancer elements. *J Am Soc Nephrol*, 10:2480–2487, 1999.
- Meyer, R. Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenomyome im Allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa. *Zentralbl Gynakol*, 43:745–750, 1919.
- Mizumoto, H., Saito, T., Ashihara, K., Nishimura, M., Takehara, M., Tanak, R., Ito, E., and Kudo, R. Expression of matrix metalloproteinases in ovarian endometriomas: Immunohistochemical study and enzyme immunoassay. *Life science*, pages 259–273, 2002.
- Ohga, T., Koike, K., Ono, M., Makino, Y., Itagaki, Y., Tanimoto, M., Kuwano, M., and Kohno, K. Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light. *Cancer research*, 56:4224–4228, 1996.
- Ohga, T., Uchiumi, T., Makino, Y., Koike, K., Wada, M., Kuwano, M., and Kohno, K. Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *J Biol Chem*, 273:5997–6000, 1998.
- Okamoto, T., Izumi, H., Imamura, T., Takano, H., Ise, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., and Kohno, K. Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene*, 19(54):6194–6202, 2000.
- Okamoto, T., Uchimi, T., Kuwano, M., and Kohno, K. Y box binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3t²->5t² exonuclease activity. *Nucleic Acids Research*, 29(5):1200–1207, 2001.
- Olive, D. L., Weinberg, J. B., and Haney, A. F. Peritoneal macrophages and infertility: The association between cell number and pelvic pathology. *Fertil Steril*, 44:772–777, 1985.
- Oral, E., Olive, D. L., and Arici, A. The peritoneal environment in endometriosis. *Hum Reprod Update*, 2:385–398, 1996.

- Polito, A. and Proud, D. Epithelial cells as regulators of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 102:714–718, 1998.
- Raffetseder, U., Rauen, T., Djudjaj, S., Kretzler, M., En-Nia, A., Tacke, F., Zimmermann, H. W., Nelson, P., Frye, B. C., Floege, J., Stefanidis, I., Weber, C., and Mertens, P. R. Differential regulation of chemokine CCL5 expression in monocytes/macrophages and renal cells by Y-box protein-1. *Kidney Int*, 75(2):185–196, 2009.
- Ranjan, M., Tafuri, S., and Wolffe, A. P. Masking mRNA from translation in somatic cells. *Genes & Dev*, 7:1725–1736, 1993.
- Ria, R., Loverro, G., Vacca, A., Ribatti, D., Cormio, G., Roccaro, A. M., and Selvaggi, L. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 agree with progression of ovarian endometriomas. *Europ J Clinic Invest*, 32:199–206, 2002.
- Ridley, J. H. Primary adenocarcinoma in implant of endometriosis. *Obstet Gynecol*, 27: 261–267, 1966.
- Sakura, H., Maekawa, T., Imamoto, F., Yasuda, K., and Ishii, S. Two human genes isolated by a novel method encode DNA-binding proteins containing a common region of homology. *Gene*, 73(2):499–507, 1988.
- Sampson, J. A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrium tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*, 14:422–469, 1927.
- Shibahara, K., Sugio, K., Osaki, T., Uchiumi, T., Maehara, Y., Kohno, K., Yasumoto, K., Sugimachi, K., and Kuwano, M. Nuclear expression of the Y-box binding protein YB-1, as a novel marker of the disease progression in non-small cell lung cancer. *Clin cancer research*, 7(10):3151–3155, 2001.
- Shibao, K., Takano, H., Nakamyama, Y., Okazaki, K., Nagata, N., Izumi, H., Uchimi, T., Kuwano, M., Kohno, K., and Itoh, H. Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II genes in human colorectal carcinomas. *Int J Cancer*, 83:732–737, 1999.
- Shiota, M., Izumi, M., Onitsuka, T., Miyamoto, N., Kashiwagi, E., Kidani, A., Yokomizo, A., Naito, S., and Kohno, K. Twist promotes tumor cell growth through YB-1 expression. *Cancer research*, 68:98–105, 2008.
- Silveira, C. G. T., Krampe, J., Ruhland, B., Diedrich, K., Hornung, D., and Agic, A. Cold-Shock domain family member YB-1 expression in endometrium and endometriosis. *Human Reproduction*, 27(1):173–182, 2011.
- Sommerville, J. Activities of cold-shock domain proteins in translation control. *BioEssays*, 21:319–325, 1999.
- Sorokin, A. V., Selyutina, A. A., Skabkin, M. A., Guryanov, S. G., Nazimov, I. V., Richard, C., Thťng, J., Yau, J., Sorensen, P. H. B., Ovchinnikov, L. P., and Evdokimova, V. Proteasome-mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-

damage stress response. EMBO Journal, 24:3602-3612, 2005.

- Steck, T., Felberbaum, R. E., Küpker, W., Brucker, C., and Finas, D. F. *Endometriose: Entstehung, Diagnose, Verlauf und Therapie*. Springer, Wien, 1 edition, 2004.
- Tafuri, S. R., Familari, M., and Wolffe, A. P. A mouse Y-box protein, MSY1, is associated with paternal mRNA in spermatocytes. *J Biol Chem*, 268(16):12213–12220, 1993.
- Tafuri, S. R. and Wolffe, A. P. Xenopus Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis, and developmental regulation. *Proc of the Nat Acad of Sci USA*, 87:9028–9032, 1990.
- Tafuri, S. R. and Wolffe, A. P. DNA binding, multimerization and transcription simulation by the Xenopus Y Box proteins in vitro. *New Biologist*, 4:349–359, 1992.
- Takahashi, M., Shimajiri, S., Izumi, H., Hirano, G., Kashiwagi, E., Yasuniwa, Y., Wu, Y., Han, B., Akiyama, M., Nishizawa, S., Sasaguri, Y., and Kohno, K. Y-box binding protein-1 is a novel molecular target for tumor vessels. *Cancer Sci*, 101(6):1367– 1373, 2010.
- Travali, S., Ku, D.-H., Rizzo, M. G., Ottavio, L., Baserga, R., and Calabretta, B. Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem*, 264:7466– 472, 1989.
- Uchiumi, T., Kohno, K., Tanimura, H., Matsuo, K., Sato, S., Uchida, Y., and Kuwano, M. Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth Differ*, 4:147–157, 1993.
- Ueda, M., Yamashita, Y., Takehara, M., Terai, Y., Kumagai, K., Ueki, K., Kanda, K., Yamaguchi, H., Akise, D., Hung, Y., and Ueki, M. Survivin gene expression in endometriosis. *J Clinic Endocrin and Metabol*, 87:3452–3459, 2002.
- Ulrich, U., Richter, O., Wardelmann, E., Valter, M., Schmutzler, R., Sillem, M., Possover, M., and Mallmann, P. Endometriose und Malignom. *Zentralbl Gynakol*, 125:239– 242, 2003.
- van Roeyen, C. R., Eitner, F., Martinkus, S., Thieltges, S. R., Ostendorf, T., Bokemeyer, D., Lüscher, B., Lüscher-Firzlaff, J. M., Floege, J., and Mertens, P. R. Y-box protein 1 mediates PDGF-B effects in mesangioproliferative glomerular disease. *J Am Soc Nephrol*, 16(10):2985–2996, 2005.
- Wenzl, R. and Heinzl, H. Localization of matrix metalloproteinase-2 in uterine endometrium and ectopic implants. *Gynecol Obstet Invest*, 45:253–257, 1998.
- Wolffe, A. P., Tafuri, S., Ranjan, M., and Familari, M. The Y-box factors: A family of nucleic acid binding proteins conserved from Escherichia coli to man. *New Biologist*, 4:290–298, 1992.
- Zalvide, J. and DeCaprio, J. A. Role of pRb-related proteins in simian virus 40 large-Tantigen-mediated transformation. *Mol Cell Biol*, 15:5800–5810, 1995.

- Zeitvogel, A., Baumann, R., and Starzinski-Powitz, A. Identification of an invasive, N-Cadherin-Expressing epithelial cell type in endometriosis using a new cell culture model. *A J of Path*, 159(5):1839–1852, 2001.
- Zhao, D., Pritts, E. A., and Hornung, D. Epithelial-stromal interactions induce RANTES expression in endometriosis. *Fertil Steril*, 77:075, 2002.

Danksagung

Ich bedanke mich von Herzen bei allen, die mich auf dem Weg zur Verfassung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben. An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. med. Hornung, die mir mit ihrem Fachwissen zur Seite stand und mich im inhaltlichen sowie experimentellen Arbeiten unterstützt hat. Ich danke ihr auch dafür, dass sie mir immer wieder einen Anstoß zum Weitermachen gegeben hat sowie für die kritische Durchsicht dieser Arbeit. Mein Dank geht an Frau Gabriele Marschner für die geduldige Einarbeitung und Unterstützung bei meiner praktischen Tätigkeit, für hilfreiche Tipps und die vielen Gespräche. Ich danke auch allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppen an der Klinik für Frauenheilkunde der Universität zu Lübeck, die mich so herzlich in ihr Team aufgenommen haben, sodass ich sehr gerne im Labor gearbeitet habe: Dipl. Biol. Silke Klocke, Claudia Tappehorn, Katja Heinrich, Stefan Polack, PD Dr. rer. nat. Frank Köster sowie insbesondere Dr. Cassia Silveira für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung. Besonders danke ich Frau Dr. Anne Grünewald für ihre Unterstützung und hilfreichen Tipps sowie mit der freundlichen Genehmigung von Frau Prof. Dr. med. Klein aus der Klinik für Neurologie für die Nutzung des Microplatereaders. Mein Dank geht an meine Freunde und meinen Bruder, die mir mit Korrekturlesen und Computertipps behilflich waren. Ein besonderer Dank geht an meinen Mann, der mir stets Freiräume geschaffen hat, um diese Arbeit fertig zu stellen und mich bei allen kleineren und größeren Problemen bei der Erstellung der Arbeit unterstützt hat. Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern für die Grundlagen und die Rahmenbedingungen, die meine Dissertation erst ermöglichten.

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Julia Lappe geb. Krampe, versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 01.11.2014