

**Funktionelle Analyse des Transkriptionsfaktors  
*„Grainyhead-like 2“ (GRHL2)*  
und dessen pathophysiologische Relevanz  
beim humanen Mammakarzinom**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

**SABRINA FREY**

HAMBURG 2013

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2009 bis Oktober 2013 am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf im Institut für Tumorbiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Edzard Spillner

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Pantel

Tag der Disputation: 18. Oktober 2013

*Für meine Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das humane Mammakarzinom</b>	<b>1</b>
1.1.1 Die Klassifizierung humaner Mammakarzinome	2
1.1.2 Tumorprogression und Metastasierung beim Mammakarzinom	4
<b>1.2 Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) in der Tumorprogression</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Die Familie der <i>Grainyhead</i>-Transkriptionsfaktoren</b>	<b>8</b>
1.3.1 Struktur, Ursprung und Einteilung der <i>Grainyhead</i> -Transkriptionsfaktoren	8
1.3.2 Die <i>Grainyhead-like</i> -Gene in entwicklungsbiologischen und pathophysiologischen Prozessen	10
1.3.3 Die Rolle von GRHL2 bei der Entstehung und Progression von Tumoren	12
<b>1.4 Fragestellung</b>	<b>16</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>17</b>
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	17
<b>2.2 Zellkulturmethoden</b>	<b>17</b>
2.2.1 Kulturmedien	17
2.2.2 Herkunft der Zelllinien	18
2.2.3 Standardkulturbedingungen	19
2.2.4 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen	19
2.2.5 Mycoplasmen-Test	19
2.2.6 Transfektion eukaryontischer Zellen	19
2.2.7 Retroviraler Gentransfer	20
2.2.8 Produktion lentiviraler Partikel und Infektion humaner Mammakarzinomzellen	21
2.2.9 Bestimmung der Zellproliferationsrate	21
2.2.10 Untersuchung des klonogenen Wachstums	22
2.2.11 Untersuchung des verankerungsunabhängigen Wachstums im Weich-Agar	22

---

2.2.12	Bestimmung des Migrationsverhaltens	22
2.2.13	Bestimmung des Invasionsverhaltens	23
2.2.14	Implantation von Zellen in immundefiziente Mäuse	23
2.2.15	Induktion einer EMT mit <i>Transforming Growth Factor</i> $\beta$ (TGF- $\beta$ )	23
<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>24</b>
2.3.1	Kultivierung von <i>E.coli</i>	24
2.3.1.1	Verwendete Bakterienstämme	24
2.3.1.2	Vermehrung von <i>E.coli</i>	24
2.3.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	25
2.3.3	Transformation von <i>E.coli</i>	25
2.3.4	Plasmidisolierung im analytischen Maßstab	25
2.3.5	Plasmidisolierung im präparativen Maßstab	26
2.3.6	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA	26
2.3.7	Restriktionsverdau	26
2.3.8	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	26
2.3.9	Gelelektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren	27
2.3.10	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	27
2.3.11	Ligation von DNA-Fragmenten	27
2.3.12	Isolierung von genomischer DNA	28
2.3.13	Isolierung von Gesamt-RNA	28
2.3.14	Reverse Transkription	29
2.3.15	DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Hilfe von <i>proofreading</i> -Enzymen	29
2.3.15.1	Amplifikation mit der Phusion <sup>®</sup> High Fidelity DNA-Polymerase	29
2.3.15.2	Amplifikation mit der Taq DNA-Polymerase	30
2.3.16	Klonierung von PCR-Produkten	30
2.3.17	Zielgerichtete Mutagenese	31
2.3.18	Automatische DNA-Sequenzierung	32
2.3.19	Quantitative <i>Realtime</i> -PCR (qRT-PCR)-Analyse und relative mRNA-Quantifizierung	32
<b>2.4</b>	<b>Zellbiologische und immunologische Methoden</b>	<b>34</b>
2.4.1	Western Blot-Analyse von Proteinen	34
2.4.1.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten mit NP40-Lysispuffer	34
2.4.1.2	Herstellung von Gesamtzellextrakten mit SDS-Lysispuffer	35
2.4.1.3	Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten	35

---

2.4.1.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.4.1.5	Semidry-Transfer auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membran	37
2.4.1.6	Immunoblot-Analyse	37
2.4.2	Untersuchung des Phosphorylierungszustandes von Proteinen	39
2.4.2.1	Herstellung phosphospezifischer Antikörper	39
2.4.2.2	Dephosphorylierung von Proteinen mit Lambda Protein Phosphatase	39
2.4.2.3	Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung mit Hilfe des MEK1-Inhibitors	40
2.4.2.4	Bestimmung der Halbwertszeit eines Proteins	40
2.4.3	Chromatin-Immunopräzipitations-Assay (ChIP)	41
2.4.3.1	Herstellung der DNA-Abschnitte	41
2.4.3.2	Immunpräzipitation	42
2.4.3.3	Analyse über PCR	42
2.4.4	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	43
2.4.4.1	Herstellung von Zellkern-Extrakten	43
2.4.4.2	Gekoppelte in vitro Transkriptions-/Translationsreaktion	44
2.4.4.3	Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden	44
2.4.4.4	Herstellung von [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-markierten Oligonukleotiden	44
2.4.4.5	Bindungsreaktion	45
2.4.4.6	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
2.4.5	Immunhistochemische Analysen	46
<b>2.5</b>	<b>Bioinformatische Analysen</b>	<b>46</b>
<b>2.6</b>	<b>Statistik</b>	<b>46</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Funktionelle Analyse des Transkriptionsfaktors GRHL2 in humanen Mammakarzinomzelllinien</b>	<b>48</b>
3.1.1	Etablierung und Charakterisierung von Mammakarzinomzelllinien mit stabiler GRHL2-Überexpression	48
3.1.2	Veränderungen in Mammakarzinomzelllinien mit <i>Knockdown</i> der <i>GRHL2</i> -Genexpression	55
3.1.3	Etablierung und Charakterisierung von Mammakarzinomzelllinien mit stabiler Überexpression eines dominant-negativ wirkenden GRHL2 <sub>168-625</sub> -Genprodukts	58
3.1.4	GRHL2-induzierte Veränderungen im Genexpressionsprofil humaner Mammakarzinomzelllinien	64

---

3.1.5	GRHL2 reprimiert die TGF- $\beta$ -induzierte EMT in MCF-10A-Zellen	67
<b>3.2</b>	<b>Regulation der GRHL2-Expression in humanen Mammakarzinomzelllinien durch ZEB1</b>	<b>70</b>
<b>3.3</b>	<b>GRHL2-Proteinexpression in humanen Mammakarzinomen</b>	<b>75</b>
<b>3.4</b>	<b>Regulation der GRHL2-Aktivität durch Phosphorylierung</b>	<b>78</b>
3.4.1	Identifizierung von Threonin <sup>211</sup> als mögliche Phosphorylierungsstelle des GRHL2-Proteins	78
3.4.2	Generierung phosphorylierungsspezifischer P <sup>211</sup> -GRHL2-Antikörper	81
3.4.3	GRHL2 wird vermutlich nicht über ERK1/2 phosphoryliert	82
3.4.4	Die Phosphorylierung an T <sup>211</sup> beeinflusst die Stabilität des GRHL2-Proteins	84
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>87</b>
4.1	Etablierung geeigneter Modellsysteme für die Analyse der Funktion von GRHL2 in humanen Mammakarzinomzellen	87
4.2	Hinweise auf eine pathophysiologische Relevanz von GRHL2 für das humane Mammakarzinom	92
4.3	Besitzt der Transkriptionsfaktor GRHL2 eine duale Rolle bei der Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms?	94
4.4	GRHL2 unterliegt verschiedenen regulatorischen Mechanismen	95
4.5	Fazit	98
4.6	Ausblick	99
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>105</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>A-1</b>
8.1	Laborgeräte	A-1
8.2	Vektoren und Expressionsplasmide	A-2

<b>8.3</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>A-4</b>
<b>8.4</b>	<b>Antikörper</b>	<b>A-8</b>
<b>8.5</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>A-9</b>
<b>8.6</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>A-10</b>
<b>8.7</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>A-11</b>
<b>8.8</b>	<b>Sicherheitstechnische Daten</b>	<b>A-14</b>
	<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>A-21</b>
	<b>WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>A-22</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>A-23</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>A-24</b>

# 1 Einleitung

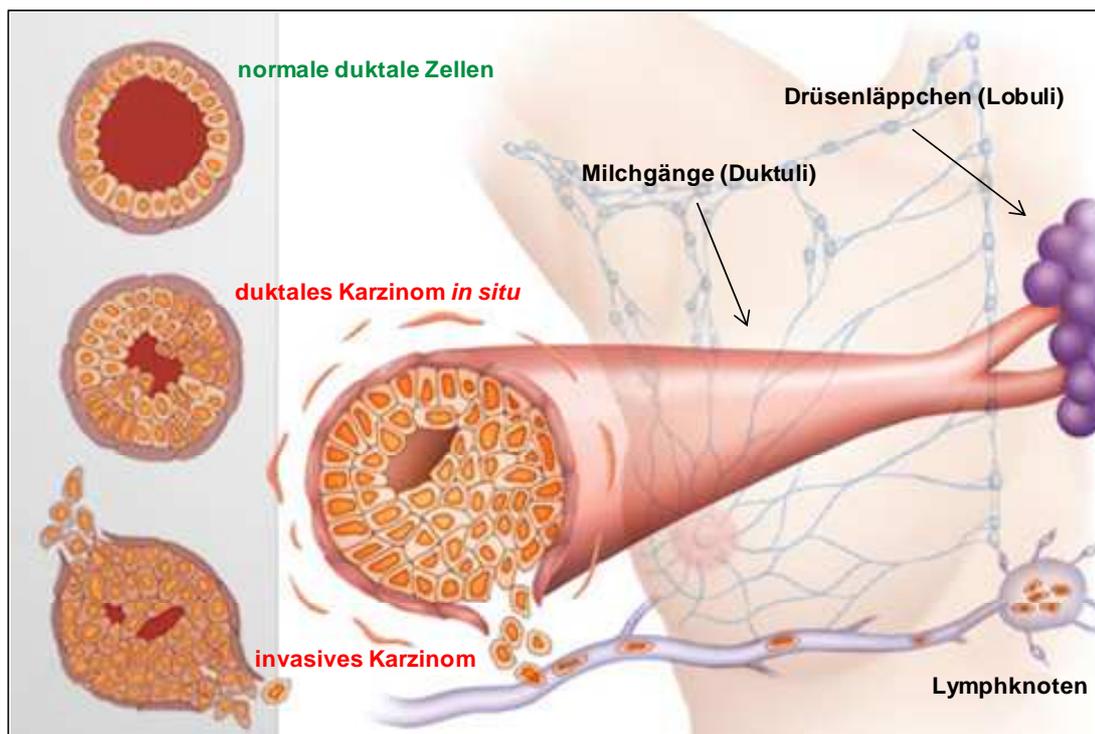
Das humane Mammakarzinom ist mit rund 74.500 prognostizierten Neuerkrankungen für 2012 und 17.000 Sterbefällen für 2008 die mit Abstand am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung der Frau in Deutschland (Robert Koch Institut, 2008). Im Jahr 2008 erkrankten etwa doppelt so viele Frauen wie noch 1980, so dass aktuell bei etwa jeder achten Frau im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom diagnostiziert wird. Trotz der gestiegenen Neuerkrankungen ist die Zahl der Todesfälle zurückgegangen. Dies ist vor allem auf deutlich bessere Früherkennungsmethoden und Therapiemöglichkeiten zurückzuführen (Robert Koch Institut, 2008).

In den vergangenen Jahrzehnten konnte durch den Fortschritt in analytischen und diagnostischen Verfahren eine Vielzahl von neuen Mammakarzinom-assoziierten Genen identifiziert werden. Trotzdem sind viele Prozesse, die beispielsweise zur Invasion und Metastasierung von Tumoren beitragen, bisher nur unzureichend verstanden und der direkte therapeutische Nutzen für die Patientinnen ist als eher gering einzustufen.

In umfangreichen Vorarbeiten konnte der bisher weitestgehend uncharakterisierte Transkriptionsfaktor *Grainyhead-like 2* (GRHL2) als ein neues, möglicherweise Mammakarzinom-relevantes Gen identifiziert werden. In dieser Arbeit sollte deshalb damit begonnen werden, seine mögliche Rolle bei der Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms zu untersuchen.

## 1.1 Das humane Mammakarzinom

Die Brustdrüse der Frau besteht hauptsächlich aus Fettgewebe, das von Blut- und Lymphgefäßen sowie Nerven durchzogen ist. Die Milchgänge (Duktuli) bilden ein enges Netzwerk, das sich Richtung Brustwarze zieht. Die meisten Mammakarzinome bilden sich in den duktulo-lobulären Einheiten, die den Übergang der Drüsenläppchen (Lobuli) zu den Milchgängen beschreibt (Abb. 1-1). Ist das Mammakarzinom in der Ausbreitung noch auf die Drüsenläppchen (lobuläres Karzinom) oder die Milchgänge (duktales Karzinom) beschränkt, wird es als *in situ*-Karzinom bezeichnet. Invasive Karzinome stellen Tumore dar, die bereits die Basalmembran der Milchgänge zerstört haben und in das angrenzende Stroma, später auch in die Lymph- und Blutgefäße, eingewandert sind (Weigelt, Peterse et al. 2005). Das duktales Karzinom *in situ* (DCIS) geht häufiger in die invasive Form über als das lobuläre Karzinom *in situ* (LCIS).



**Abb. 1-1: Anatomie der duktulo-lobulären Einheit der Brustdrüse mit histologischen Veränderungen.**

Die Vergrößerungen auf der linken Seite zeigen normale duktale Zellen (oben), ein duktales Karzinom *in situ* (Mitte) und ein invasives Mammakarzinom (unten). Invasive Tumorzellen durchbrechen die Basalmembran der Milchgänge, wandern über die Lymphgefäße in die Lymphknoten ein und sind so dazu fähig, Metastasen auszubilden. Modifiziert nach: [http://www.medicinenet.com/breast\\_cancer\\_pictures\\_slideshow/article.htm](http://www.medicinenet.com/breast_cancer_pictures_slideshow/article.htm); 04.08.2013.

Insgesamt lässt sich das Mammakarzinom in 12 verschiedene Typen einteilen, wobei die duktales (85%) und die lobulären (10%) Karzinome am häufigsten auftreten. Muzinöse, medulläre, papilläre und tubuläre Karzinome sind die seltenen invasiven Formen des Mammakarzinoms und haben eine eher günstige Prognose (Hellman 2000; Weigelt, Peterse et al. 2005).

### 1.1.1 Die Klassifizierung humaner Mammakarzinome

Die Stadieneinteilung und die damit einhergehende Therapieempfehlung des humanen Mammakarzinoms beruhte lange Zeit ausschließlich auf der Kombination der pTMN-Klassifikation (*Staging*), gemäß den Vorgaben der Internationalen Union gegen Krebs (UICC), und der Bestimmung des histologischen Differenzierungsgrades (*Grading*). Weiterhin haben sich auch die Einbeziehung des Östrogen (ER)- und Progesteronrezeptorstatus (PR) sowie des HER2-Status als klinisch nützlich herausgestellt (Wolff, Hammond et al. 2007; Hammond, Hayes et al. 2010; Davies, Godwin et al. 2011; Yin, Jiang et al. 2011). Neuere wissenschaftliche Erkenntnisse, die auf Microarray-Daten basieren, zeigten, dass ebenfalls eine molekulare Klassifizierung der Mammakarzinome sinnvoll ist. Zunächst beschrieb Perou et al. die vier Subtypen der Tumorentität als „Basal-like“ („triple negativ“),

„HER2-enriched“, „Luminal“ und „Normal-like“ (Perou, Sorlie et al. 2000). Folgende Studien empfahlen eine weitere Unterteilung in „Luminal A“ und „Luminal B“ (Sorlie, Perou et al. 2001; Sorlie, Tibshirani et al. 2003; Hu, Fan et al. 2006). Die aktuellen Empfehlungen für die Einteilung in die molekularen Subtypen des Mammakarzinoms (Parker, Mullins et al. 2009), die auf Genexpressionsanalysen beruhen, sind in Tab. 1-1 dargestellt. Die entsprechende Einteilung über immunhistologische Analysen (IHC), die zuletzt bei der 12. Internationale St-Gallen-Konferenz für Brustkrebs (2011) (Goldhirsch, Wood et al. 2011) festgelegt wurde und die zurzeit als der Goldstandard bei Therapieempfehlungen in der klinischen Praxis gilt, sind gegenübergestellt (Tab. 1-1) (Guiu, Michiels et al. 2012).

**Tab. 1-1: Molekulare Klassifizierung der Mammakarzinome.**

Subtyp*	IHC Klassifikation**	
Luminal A	„Luminal A“ ER <sup>1)</sup> und/oder PR <sup>2)</sup> positiv HER2 negativ Ki-67 < 14%	
Luminal B	„Luminal B (HER2 negativ)“ ER und/oder PR positiv HER2 negativ Ki-67 <sup>3)</sup> ≥ 14%	„Luminal B (HER2 positiv)“ ER und/oder PR positiv HER2 überexprimiert oder amplifiziert Ki-67 egal
HER2 positiv	„HER2 positiv (nicht luminal)“ ER und/oder PR positiv HER2 positiv Ki-67 ≥ 14%	
Basal-like	„Triple negativ“ ER und PR negativ HER2 negativ	

\* Einteilung basierend auf Genexpressionsanalysen

\*\* Einteilung basierend auf immunhistologischen Untersuchungen

<sup>1)</sup> ER: Östrogenrezeptorstatus

<sup>2)</sup> PR: Progesteronrezeptorstatus

<sup>3)</sup> Ki-67: Proliferations-assoziiertes Gen

In weiteren Untersuchungen wurden noch andere Subtypen des Mammakarzinoms identifiziert, beispielsweise „Claudin-low“ (Herschowitz, Simin et al. 2007) und „apokrin“ (Farmer, Bonnefoi et al. 2005), deren klinische Relevanz noch aufgeklärt werden muss. Insgesamt zeigte sich, dass die Einteilung über die molekulare Klassifizierung des humanen Mammakarzinoms deutlich komplexer ist als zunächst angenommen (Perou, Sorlie et al. 2000; Guiu, Michiels et al. 2012) und die Empfehlungen für die klinische Anwendung, vor allem in Bezug auf die Therapie, laufend überarbeitet werden müssen.

### 1.1.2 Tumorprogression und Metastasierung beim Mammakarzinom

Beim humanen Mammakarzinom beginnt der mehrstufige Prozess der Tumormetastasierung mit dem Verlust der Zell-Zell-Adhäsion epithelialer Zellen im Gewebeverband und der Invasion besonders motiler Tumorzellen durch die Basalmembran in das umgebende Stroma des Primärtumors. Tumorzellen, die damit beginnen umliegendes Gewebe zu infiltrieren, zeigen stets eine verminderte interzelluläre Adhäsion, die in der Vielzahl der Fälle auf den Verlust der E-Cadherin-vermittelten Adhäsion zu ihren Nachbarzellen zurückzuführen ist. Dokumentierte Mechanismen sind in diesem Zusammenhang ein epigenetisches Ausschalten der E-Cadherin-Expression und ein proteolytischer Abbau des Proteins (Cavallaro, Schaffhauser et al. 2002). Auch kann die E-Cadherin-Expression durch das Durchlaufen einer epithelialen mesenchymalen Transition (EMT) unterbunden werden (Sarrío, Rodríguez-Pinilla et al. 2008; Polyak and Weinberg 2009).

Im Anschluss daran sind die metastasierenden Tumorzellen dazu in der Lage, umliegendes Stroma und benachbartes Gewebe zu infiltrieren, indem sie die Basalmembran des Ursprungsgewebes durchbrechen. Dies führt schließlich zu einer Einwanderung der metastatischen Zellen in das Lymph- und Blutgefäßsystem sowie zur weiteren Ausbreitung der Tumorzellen (Chiang and Massague 2008). Die lymphogene und die hämatogene Disseminierung versteht man dabei als biologisch getrennte Vorgänge (Pantel and Brakenhoff 2004). Grundlage für diese Annahme bilden die genetischen Signaturen der disseminierten Tumorzellen (van 't Veer, Dai et al. 2002; Woelfle, Cloos et al. 2003). Bei der lymphogenen Disseminierung erfolgt zunächst die Infiltration eines dem Primärtumor benachbarten Lymphknotens (Cao 2005). Die Tumorzellen sind in diesem Stadium nicht dazu in der Lage, durch das Blutgefäßsystem zu entfernten Organen zu gelangen (Pantel and Brakenhoff 2004) und bilden daher auf die Lymphknoten beschränkte Metastasen. Während der Progression des Mammakarzinoms erlangen einzelne Tumorzellen die Fähigkeit, über das Blutgefäßsystem entfernte Organe zu erreichen und dort primäre Fernmetastasen auszubilden. Bei der hämatogenen Disseminierung treten Tumorzellen direkt in die an den Tumor grenzenden Blutgefäße ein. Dort können sie, wenn sie den physikalischen und physiologischen Belastungen durch die hämodynamischen Scherkräfte und das Immunsystem widerstehen, nach Austritt aus dem Blutgefäßsystem primäre Fernmetastasen bilden. Durch eine erneute hämatogene Disseminierung können sie weiter zu anderen Organen gelangen, um dort sekundäre Metastasen auszubilden (Chambers, Groom et al. 2002). Dieser Prozess beginnt schon in einem frühen Stadium der Krebserkrankung und ist äußerst komplex (Pantel, Brakenhoff et al. 2008). Bei verschiedenen Tumorentitäten können bereits Jahre vor dem Nachweis einer soliden Metastase einzelne Tumorzellen im Knochenmark und im Blut von Patienten nachgewiesen werden (Pantel, Brakenhoff et al. 2008). Die Existenz einzelner disseminierter Tumorzellen im Knochenmark wird als minimale

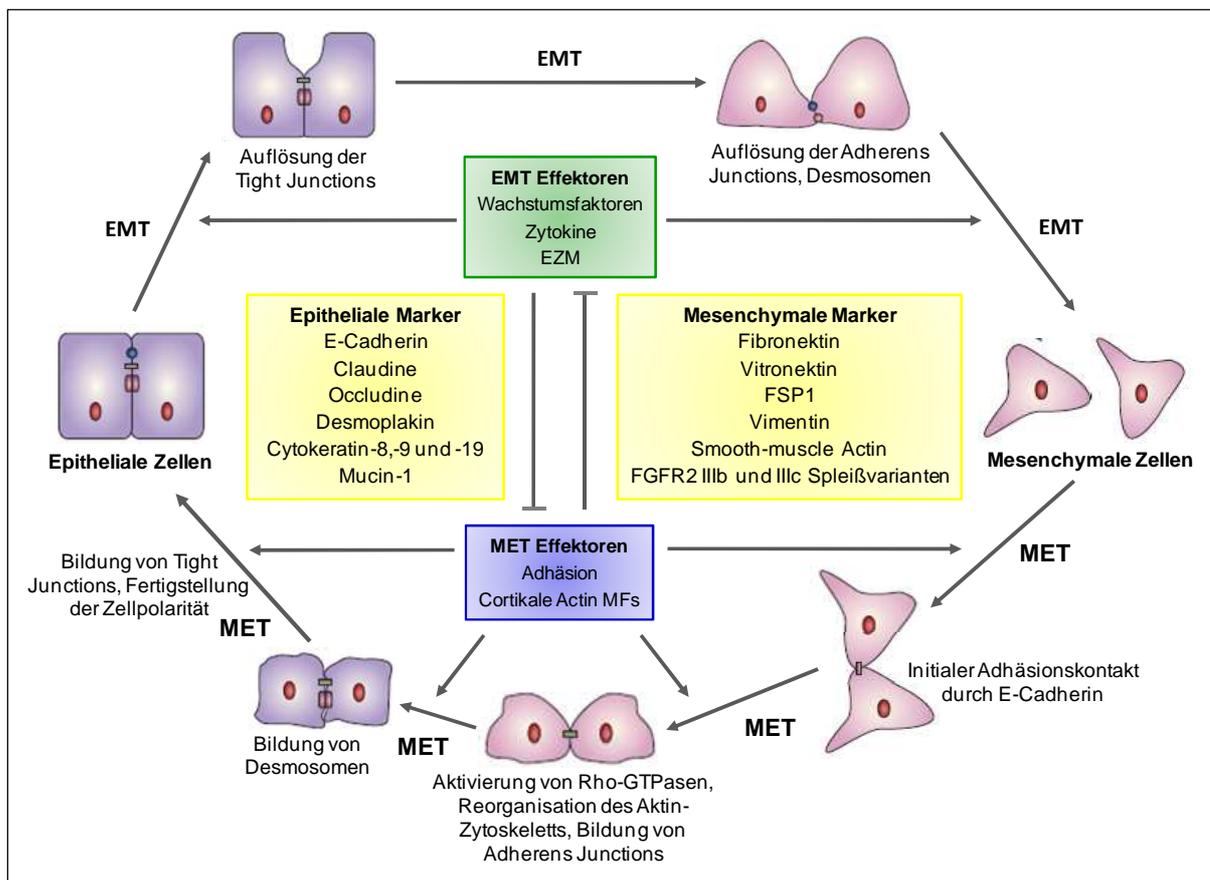
residuale Krebserkrankung (MRD) bezeichnet. Beim Mammakarzinom ist ein Nachweis der MRD ein unabhängiger Prognosefaktor für ein kürzeres rezidivfreies Intervall und eine kürzere Gesamtüberlebenszeit (Braun, Pantel et al. 2000; Janni, Rack et al. 2005). Der größte Teil der disseminierten Zellen ist im weiteren Verlauf der Krebserkrankung jedoch nicht dazu in der Lage, zu soliden Metastasen auszuwachsen. Man nimmt an, dass der überwiegende Teil dieser Zellen nicht zu einem Wiedereintritt in den Zellzyklus fähig ist und in einer Phase der Seneszenz verweilt, die als Dormanz bezeichnet wird (Aguirre-Ghiso 2007). Um klinisch relevante Metastasen zu bilden, müssen Tumorzellen demnach die gesamte Metastasierungskaskade durchlaufen und gleichzeitig dazu in der Lage sein, einer möglichen Immunantwort zu entgehen (Chiang and Massague 2008). Die Faktoren, die die Überwindung der Dormanz bewirken und zur Bildung einer soliden Metastase führen, sind bisher nicht bekannt und daher Gegenstand intensiver Forschung.

## 1.2 Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) in der Tumorprogression

Der Begriff der epithelialen-mesenchymalen Transition wurde 1968 erstmals durch Elizabeth Hay geprägt, die damit die Organisation des Epithels und des Mesenchyms im Hühnerembryo beschrieb (Hay 1968; Nieto 2011).

Bei der EMT handelt es sich um ein morphogenetisches Programm, das eine wichtige Rolle bei zahlreichen entwicklungsbiologischen Prozessen wie beispielsweise der Gastrulation sowie der Entwicklung von Geweben und Organen spielt (Nieto 2011). Ein ähnlicher Prozess läuft während der Wundheilung im adulten Gewebe ab, und es wird angenommen, dass die EMT auch im Tumorgeschehen reaktiviert wird (De Craene and Berx 2013). Zu den Hauptmerkmalen einer EMT gehören die Reorganisation des Zytoskeletts, eine erhöhte Fähigkeit zur Migration und Invasion, eine Resistenz gegen Apoptose und eine verringerte Zellproliferation (Thiery, Acloque et al. 2009). Diese phänotypischen Veränderungen beruhen auf zum Teil drastischen Alterationen in der Genexpression verschiedener Moleküle, die häufig auch als Markerproteine zur Detektion einer EMT eingesetzt werden (Kalluri and Weinberg 2009). Die Expression dieser Faktoren kann während der EMT entweder reduziert (epitheliale Marker) oder erhöht werden (mesenchymale Marker). Zu den häufig verwendeten EMT-Markerproteinen gehören u.a. die Oberflächenproteine wie die Claudine, die Occludine und E- sowie N-Cadherin, die Zytoskelettproteine wie die Keratine, Vimentin und *Smooth Muscle Actin* (SMA) (Thiery and Sleeman 2006), Wachstumsfaktoren wie der *Epidermal Growth Factor* (EGF) und der *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), microRNAs wie Mitglieder der miR-200-Familie und Transkriptionsfaktoren wie z.B. Snail, Twist, Slug, ZEB1 und FOXC2. Diese Ereignisse während der EMT führen zu einer Aufhebung der ursprünglichen Gewebsstruktur und -funktion (Hay

1995; Kalluri and Weinberg 2009; Bednarz-Knoll, Alix-Panabieres et al. 2012). Umgekehrt können mesenchymale Zellen auch eine Re-Epitheliasierung erfahren, die als mesenchymale-epitheliale Transition bezeichnet wird. Die verschiedenen Stadien der EMT/MET sind in Abb. 1-2 dargestellt.



**Abb. 1-2: Schematische Darstellung des Ablaufs der EMT und des reversen Prozesses, der MET.**

Die unterschiedlichen Stadien des Kreislaufes sind durch die Expression spezifischer Marker gekennzeichnet. Antagonistisch wirkende Effektoren regulieren die Übergänge zwischen dem epithelialen und dem mesenchymalen Phänotyp. Die Grafik wurde nach (Thiery and Sleeman 2006) modifiziert.

Zahlreiche Übersichtsartikel belegen, dass die EMT und die MET während der Tumorprogression und Metastasierung eine entscheidende Rolle spielen kann (Kalluri and Weinberg 2009; Thiery, Acloque et al. 2009; Nieto 2011). So ist beschrieben, dass sowohl differenzierte als auch undifferenzierte Metastasen in Folge einer EMT in Patienten mit Karzinomen auftreten können (Brabletz 2012). Brabletz beschreibt eine vereinfachte Einteilung, die zwei mögliche Wege zur Ausbildung dieser Metastasen benennt. Beim „Plastizität Typ I“ sind die Metastasen differenziert. Die Tumorzellen haben zunächst eine EMT durchlaufen, die ihnen die Invasion, Disseminierung und eine Ausbreitung erlaubt. Um primäre Fernmetastasen zu bilden, ist eine MET und eine Redifferenzierung der Tumorzellen notwendig. Dieser Prozess ist gekennzeichnet durch eine hohe phänotypische Plastizität, dem vermutlich eher reversible, epigenetische Modifikationen als fest verankerte

Genexpressionveränderungen relevanter Gene zu Grunde liegen (Brabletz 2012). Metastasen mit einem dedifferenzierten Phänotyp, die sowohl auf einen differenzierten oder undifferenzierten Primärtumor zurückgehen können, werden mit einem durchgehend mesenchymalen, stammzellähnlichen Charakter der disseminierten Tumorzellen beschrieben, die kaum redifferenzieren können oder müssen, um Makrometastasen auszubilden (Brabletz 2012). Dieser Zustand ist normalerweise auf Grund der intrinsischen Eigenschaften der Tumorzellen und ihrer Anhäufung von genetischen Veränderungen unumkehrbar (Brabletz 2012). Zum einen kann das Wachstum von Tumorzellen im Primärtumor so schnell voranschreiten, dass dieser sich parallel zu den Metastasen ausbildet und beide unumkehrbar undifferenziert bleiben. Zum anderen kann bei differenzierten Primärtumoren die Ausbildung von undifferenzierten Metastasen mit unumkehrbarem Phänotyp auf die chemotherapeutische Behandlung der Patienten zurückzuführen sein (Brabletz 2012). Polyak und Weinberg fassten ebenfalls zusammen, dass die EMT zu einem höheren Anteil an stammzellähnlichen Tumorzellen führt. Diese werden durch eine Chemotherapie im verbleibenden Tumor angereichert und können zu Therapieresistenzen führen (Polyak and Weinberg 2009).

Es wurde gezeigt, dass eine Gruppe von strukturell unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren dazu in der Lage ist, die EMT während der Embryonalentwicklung und der Tumorprogression zu orchestrieren (Tab. 1-2, (Peinado, Olmeda et al. 2007; Moreno-Bueno, Portillo et al. 2008)). Beispielsweise wird die E-Cadherin-Expression direkt durch SNAIL, SLUG, ZEB1, ZEB2 und E47 unterdrückt (Polyak and Weinberg 2009; De Craene and Berx 2013). TWIST, FOXC1 und FOXC2 haben einen indirekten Einfluss auf die E-Cadherin-Expression (Polyak and Weinberg 2009).

**Tab. 1-2: Auflistung der wichtigsten EMT-Transkriptionsfaktoren und deren Strukturmotiv.\***

<b>Name</b>	<b>Strukturmotiv</b>
E47/E2A	<i>Basic Helix-Loop-Helix</i>
FOXC2	<i>Winged Helix/Forkhead</i>
Goosecoid	<i>Paired Homeodomain</i>
SIP1	<i>2-handed Zinc Finger/Homeodomain</i>
Slug	<i>C2H2-type Zinc Finger</i>
Snail	<i>C2H2-type Zinc Finger</i>
Twist	<i>Basic Helix-Loop-Helix</i>

\*: Modifiziert nach (Weinberg 2007).

Neuere Daten zeigen, dass diese so genannten EMT-Transkriptionsfaktoren, deren Liste sich ständig erweitert, ein komplexes Netzwerk bilden, das für die Etablierung und Erhaltung eines mesenchymalen Phänotyps der Zellen verantwortlich ist (Peinado, Olmeda et al. 2007; Moreno-Bueno, Portillo et al. 2008; Polyak and Weinberg 2009; De Craene and Berx 2013). Auch ist die epigenetische Regulation dieser Transkriptionsfaktoren dafür verantwortlich, dass Epithelzellen einen stammzellähnlichen Charakter annehmen (Bloushtain-Qimron, Yao et al. 2008; Polyak and Weinberg 2009).

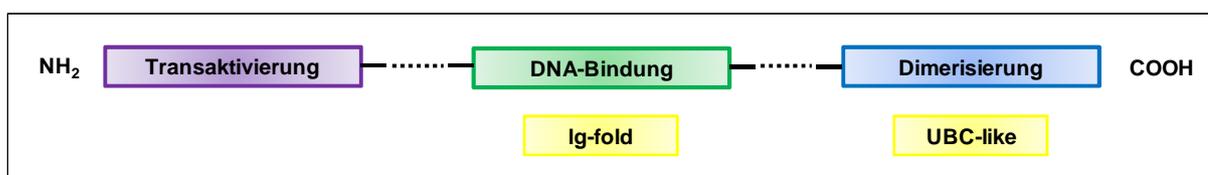
Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals Hinweise dafür gefunden werden, dass der Transkriptionsfaktor GRHL2 einen möglichen Regulator der EMT, der die hier beschriebenen komplexen Veränderungen im Verhalten von Epithelzellen vermittelt, darstellen könnte.

### 1.3 Die Familie der *Grainyhead*-Transkriptionsfaktoren

#### 1.3.1 Struktur, Ursprung und Einteilung der *Grainyhead*-Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende Proteine, die die Transkription von anderen Genen regulieren und auf Grund von Homologien und Strukturmotiven bestimmten Proteinfamilien zugeordnet werden.

Die *Grainyhead*-Gene kodieren für eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine Isoleucin-reiche Transaktivierungsdomäne, eine DNA-Bindungsdomäne, die eine Immunglobulin- (Ig) ähnliche Faltung aufweist, und eine Ubiquitin C- (UBC) ähnliche Dimerisierungsdomäne besitzen (Attardi and Tjian 1993; Uv, Thompson et al. 1994; Wilanowski, Tuckfield et al. 2002; Ting, Wilanowski et al. 2003; Venkatesan, McManus et al. 2003; Kokozynska, Ostrowski et al. 2008) (Abb. 1-3). Kokozynska et al. zeigten, dass die *Grainyhead*-Proteine zu der *Ig-fold*-Familie von Transkriptionsfaktoren gehören und vermutlich ein Vorläufergen von *p53* darstellen (Kokozynska, Ostrowski et al. 2008).

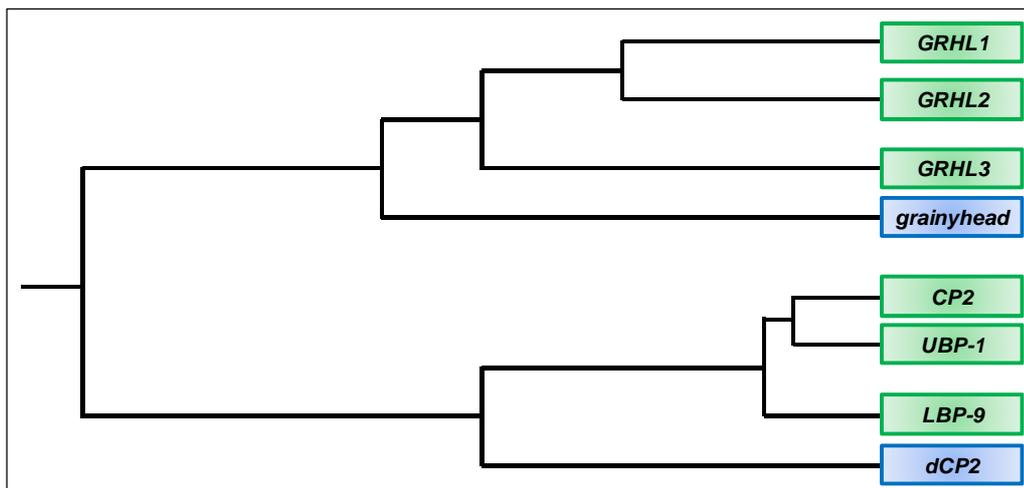


**Abb. 1-3: Schematischer Aufbau der *Grainyhead*-Transkriptionsfaktoren.**

Die *Grainyhead*-Transkriptionsfaktoren bestehen aus einer Transaktivierungsdomäne, einer DNA-Bindungsdomäne mit einer Ig-ähnlichen Faltung und einer UBC-ähnlichen Transaktivierungsdomäne.

Der erste identifizierte *Grainyhead*-Transkriptionsfaktor war CP2, der zunächst als transkriptioneller Aktivator des SV40- und des HI-Virus beschrieben wurde (Garcia, Wu et al. 1987; Huang, Wang et al. 1990). Das *Grainyhead*-Gen (*grh*), ursprünglich auch als *NTF-1* oder *Elf-1* bezeichnet, erfüllt essenzielle regulatorische Funktionen während der Embryonalentwicklung (Bray and Kafatos 1991; Attardi, Von Seggern et al. 1993). In einer Studie aus dem Jahr 1984 wiesen Mutanten der Taufliege *Drosophila melanogaster*, bei der das *grh*-Gen betroffen war, eine lose embryonale Kutikula sowie ein diskontinuierliches und granuläres Kopfskelett auf (Nüsslein-Volhard, Wieschaus et al. 1984).

Die Proteine der *Grainyhead*-Transkriptionsfaktor-Familie kommen in einzelligen Organismen nicht vor, sind aber in so unterschiedlichen Spezies wie Fadenwurm und Mensch anzutreffen (Kim, Heath et al. 1987; Jones, Luciw et al. 1988; Wu, Garcia et al. 1988; Lim, Swendeman et al. 1992; Sueyoshi, Kobayashi et al. 1995; Murata, Nitta et al. 1998; Huang and Miller 2000; Rodda, Sharma et al. 2001; Wilanowski, Tuckfield et al. 2002; Venkatesan, McManus et al. 2003; Janicke, Renisch et al. 2010). Die humane *Grainyhead*-Familie hat sechs Mitglieder. Phylogenetische Untersuchungen der Mitglieder der *Grainyhead*-Transkriptionsfaktor-Familie mittels Sequenzierung der jeweiligen cDNAs gaben Auskunft über ihre evolutionäre Beziehung zueinander. Danach ist die *Grainyhead*-Familie in zwei eigenständige phylogenetische Gruppen einzuteilen, von denen je drei auf das homologe *grh*-Gen bzw. das homologe *dCP2*-Gen der Taufliege *Drosophila melanogaster* zurückgehen. (Abb. 1-4). Während Fliegen und Würmer also nur ein einzelnes *grh*-Gen besitzen, weist das Genom von Wirbeltieren drei „*grh-like*“-Gene (*GRHL1-3*) auf (Uv, Harrison et al. 1997; Wilanowski, Tuckfield et al. 2002; Kudryavtseva, Sugihara et al. 2003; Ting, Wilanowski et al. 2003; Venkatesan, McManus et al. 2003; Tao, Kuliyeve et al. 2005). Auch kommt in niederen Organismen nur ein Homolog des *dCP2*-Gens, das *CP2*-Gen, vor, während Wirbeltiere noch zusätzlich das *UBP-1*- und das *LBP-9*-Gen besitzen (Wilanowski, Tuckfield et al. 2002).



**Abb. 1-4: Phylogenetischer Stammbaum der *Grainyhead*-Familie von Transkriptionsfaktoren.**

Die Abbildung wurde nach (Ting, Wilanowski et al. 2003) modifiziert. Die *Drosophila*-Gene sind blau, die homologen, humanen Gene sind grün hinterlegt. Die Genbanknummern aus der NCBI-Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) der Gene lauten: *GRHL1*: NM\_198182; *GRHL2*: NM\_024915; *GRHL3*: NM\_198173; *grainyhead*: NM\_057494; *CP2*: NM\_005653; *UBP-1*: NM\_014517; *LBP-9*: NM\_014553; *dCP2*: NM\_136712.

Die Sequenzunterschiede der beiden phylogenetischen Zweige haben funktionelle Konsequenzen: nur die Mitglieder der einzelnen Unterfamilien sind in der Lage miteinander zu interagieren (Ting, Wilanowski et al. 2003). Es kann ein hoher Grad der Konservierung aller *Grainyhead*-Gene zwischen den einzelnen Organismen beobachtet werden. Dies stützt die Hypothese, dass die unterschiedlichen Mitglieder der Genfamilie eine evolutionär hoch konservierte Funktion haben könnten.

### 1.3.2 Die *Grainyhead-like*-Gene in entwicklungsbiologischen und pathophysiologischen Prozessen

Zu Beginn dieser Dissertation im Jahr 2009 existierten nur sieben Veröffentlichungen, die sich mit der Funktion des GRHL2-Transkriptionsfaktors beschäftigten.

Im Jahr 2012 erschien ein Übersichtsartikel, der sich mit der *Grainyhead*-Familie von Transkriptionsfaktoren und deren Rolle in der epithelialen Morphogenese und der Wundheilung auseinandersetzt (Wang and Samakovlis 2012). Daraus ist zu entnehmen, dass aus entwicklungsbiologischer Sicht zu Beginn der vorliegenden Arbeit zunächst nur bekannt war, dass die murinen *Grhl*-Gene während der Embryonalentwicklung in sich vom Ektoderm ableitenden Epithelien, wie beispielsweise der Mundhöhle oder dem Magen-Darm-Trakt, exprimiert sind. In den Untersuchungen zeigte sich, dass die Gene *Grhl1-3* während dieses Prozesses ein sich in weiten Phasen nicht-überlappendes Expressionsmuster aufweisen und somit vermutlich keine redundante Funktion ausüben (Auden, Caddy et al. 2006). So entwickeln *Grhl1-Knockout*-Mäuse kein voll ausgebildetes Fell und eine Verdickung der Haut an den Fußsohlen (*Palmoplantar Keratoderma*)

(Wilanowski, Caddy et al. 2008). Mäuse, denen das *Grhl2*- oder das *Grhl3*-Gen fehlt, weisen dagegen eine gestörte Epithelzellendifferenzierung und eine beeinträchtigte Schließung des Neuralrohrs auf (Yu, Lin et al. 2006; Rifat, Parekh et al. 2010; Boglev, Wilanowski et al. 2011). In dem Mausmodell der *Axial defects*-Maus führt eine Mutation zu einer Überexpression von *Grhl2*, was wiederum eine Neuralrohrfehlbildung zur Folge hat, die als *Spina Bifida* („offener Rücken“) bezeichnet wird (Brouns, De Castro et al. 2011). Durch Werth et al. wurde gezeigt, dass *Grhl2-Knockout*-Mäuse an Tag 11.5 der Embryogenese versterben (Werth, Walentin et al. 2010). Ebenso führt eine durch N-ethyl-N-nitrosoharnstoff (ENU) hervorgerufene *nonsense*-Mutation im *Grhl2*-Gen zum Tod der Embryonen an Tag 12.5 der Embryonalentwicklung auf Grund von Fehlbildungen des Neuralrohrs und bei der Entwicklung des Herzens (Pyrgaki, Liu et al. 2011).

Weiterhin bildet *Grhl2* mit dem Transkriptionsfaktor *Nkx2-1* eine positive Feedback-Schleife, die die Ausbildung der Lungenepithelzellen und deren Differenzierung während der Mausembryogenese steuert (Varma, Cao et al. 2012). Gao et al. lieferten Hinweise dafür, dass das humane *GRHL2* für die Entwicklung und die Aufrechterhaltung des mukoziliären Flimmerepithels, das die Atemwege der Lunge auskleidet, verantwortlich ist (Gao, Vockley et al. 2013).

Obwohl sich der Aufbau der Epidermis von Insekten stark von dem der Säugetiere unterscheidet, ist die Aufrechterhaltung der Epithelzellintegrität durch die *Grhl*-Gene während der Evolution erhalten geblieben (Harden 2005). Die epidermale Expression von *Ddc* und *Ple* wird bei der Wundheilung durch das *Drosophila grh*-Gen aktiviert (Mace, Pearson et al. 2005). Das murine *TGase1*-Gen, das für die Quervernetzung der *Stratum Corneum* zuständig und somit für ihre Bildung und Reifung unerlässlich ist (Inada, Matsuki et al. 2000), wird direkt durch *Grhl3* gesteuert (Ting, Caddy et al. 2005). Zusätzlich reguliert sowohl *Grhl2* als auch *Grhl3* die Expression von *RhoGEF19*, das für ein Homolog des RhoA-Faktors kodiert, welcher an der Wundheilung in *Xenopus*, dem Krallenfrosch, beteiligt ist (Caddy, Wilanowski et al. 2010).

Interessanterweise regulieren sowohl das *Drosophila grh*-Gen als auch die murinen *Grhl*-Gene die Expression von Genen, die für Komponenten der Zellkontakte kodieren und die in die Signalwege der planaren Zellpolarität eingreifen. Neuere Studien zeigten, dass *Grhl2* ausschlaggebend für die Expression von *CDH1* (E-Cadherin) und *CLDN4* ist, die wiederum für Moleküle der *adherens* und *tight junctions*-Komplexe kodieren (Werth, Walentin et al. 2010). Die E-Cadherin-Expression wird ebenfalls im nicht-neuralen Ektoderm während der Schließung des Neuralrohrs durch *Grhl2* reguliert (Pyrgaki, Liu et al. 2011). Die Arbeit von Senga et al. zeigte, dass *Grhl2* während der Epithelzellentwicklung in Vorläuferzellen der Leber die Expression von *Cldn3* und *Cldn4* heraufreguliert ist und dass die

positive Regulation von Rab25 durch Grhl2 zu einer gesteigerten Expression von Cldn4 an den *tight junctions* führt (Senga, Mostov et al. 2012).

In Bezug auf die pathophysiologische Relevanz der Grhl-Transkriptionsfaktoren konnte erst kürzlich bestätigt werden, dass verschiedene Mutationen im *GRHL2*-Gen zu Taubheit (*deafness autosomal dominant 28*, DFNA28) führen (Peters, Anderson et al. 2002; Vona, Nanda et al. 2013). Verschiedene Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) im *GRHL2*-Gen kann bei Europäern (Van Laer, Van Eyken et al. 2008), aber nicht bei Han-Chinesen (Lin, Wu et al. 2011), Altersschwerhörigkeit auslösen. Interessanterweise ist das Wildtypallel des humanen *GRHL2* dazu in der Lage, die Innenohrdefekte einer *Zebrafish*-Mutante zu kompensieren, was auch hier auf eine evolutinär konservierte Funktion des *GRHL2*-Gens in der Entwicklung des Ohres hindeuten könnte (Han, Mu et al. 2011).

Zusammenfassend lässt die Literatur den Schluss zu, dass die Grhl-Transkriptionsfaktoren eine evolutionär hochkonservierte Schlüsselrolle bei der Ausbildung und Reparatur der epidermalen Barriere sowie bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Zelladhäsion und der planaren Zellpolarität inne haben.

### **1.3.3 Die Rolle von GRHL2 bei der Entstehung und Progression von Tumoren**

Obwohl Grhl2 eine wichtige Rolle bei der Embryogenese spielt, war ihre Beteiligung an anderen physiologischen Prozessen wie beispielsweise der Wundheilung und der Karzinogenese zu Beginn dieser Arbeit kaum beschrieben. Dies ist überraschend, da zwei unabhängig voneinander publizierte, viel beachtete Arbeiten darauf hindeuteten, dass zwei Mitgliedern der *Grainyhead*-Transkriptionsfaktor-Familie, dem *grh*-Gen aus *Drosophila* und dem murinen *Grhl3*-Gen, eine herausragende Bedeutung bei der Bildung der epidermalen Barriere und der Wundheilung zukommt (Mace, Pearson et al. 2005; Ting, Caddy et al. 2005). Es wird angenommen, dass die *Grainyhead*-Gene auch über Speziesgrenzen hinweg eine fundamentale Rolle bei Wundheilungsprozessen spielen (Moussian and Uv 2005; Stramer and Martin 2005).

Die bei der Wundheilung auftretenden molekularen und zellulären Veränderungen besitzen eine auffallende Ähnlichkeit zu den Prozessen, die zur Krebsentstehung und -progression beitragen (Balkwill and Mantovani 2001). Schon der deutsche Pathologe Rudolf Virchow stellte 1863 die These auf, dass Krebs die Folge einer chronischen Entzündung sei, da das tumorumgebende Stroma in der Beschaffenheit dem Erscheinungsbild von Wundheilungsprozessen und Entzündungsreaktionen ähnelt. Die Rolle des Stroma für Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung ist seither Gegenstand intensiver tumorbiologischer Forschung (Bissell and Radisky 2001). Zwar liegt bei der Tumorentstehung keine Verletzung des Gewebes vor, dennoch sind verschiedene Mechanismen der

Wundheilung auch bei der Krebsentstehung nachvollziehbar. Krebszellen sind durch Sezernierung verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine in der Lage, das sie umgebende Stroma zu verändern (Balkwill and Mantovani 2001). So simulieren sie das Vorhandensein einer Verletzung (Balkwill and Mantovani 2001) und es kommt unter anderem zur kontinuierlichen Neubildung von Stroma und Blutgefäßen. Da den Tumorzellen ein Signal zur Abschaltung der typischen Vorgänge bei der Neubildung von Gewebe fehlt, zog H. F. Dvorak den Schluss, dass es sich bei Tumoren um Wunden handelt, die niemals heilen (Dvorak 1986). Man geht daher schon seit längerer Zeit davon aus, dass Wundheilungsprozesse steuernde Gene oder genetische Programme auch von großer Bedeutung für die Krebsprogression sind (Balkwill and Mantovani 2001). Angesichts dieser Ähnlichkeit von Wundheilung und Krebs könnten die *Grainyhead*-Proteine möglicherweise bedeutsam für die Krebsentstehung sein.

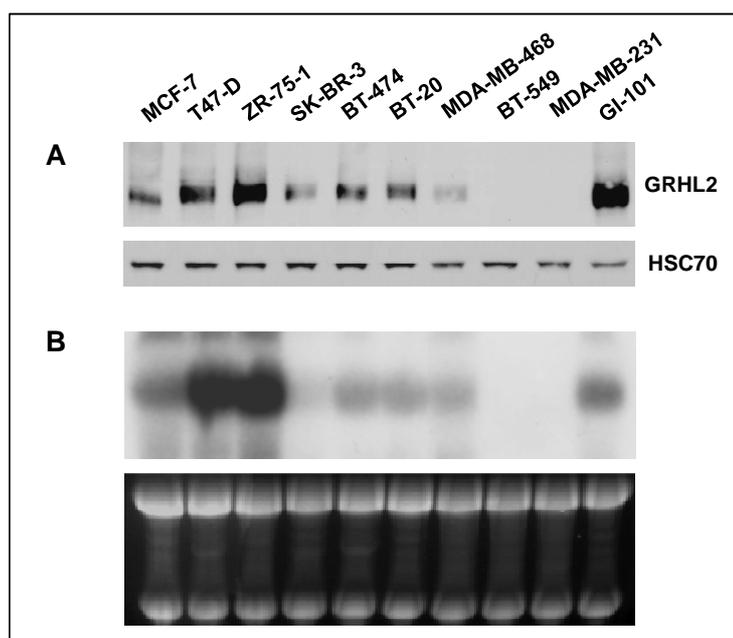
Tatsächlich waren zu Beginn dieser Arbeit nur zwei Veröffentlichungen erschienen, die sich mit der Rolle des *GRHL2*-Gens bei der Entstehung und Progression von humanen Tumoren beschäftigen. So ist eine Amplifikation des *GRHL2*-Gens auf 8q22.3 mit einem Wiederauftreten des hepatozellulären Karzinoms assoziiert (Tanaka, Kanai et al. 2008). Kang et al. zeigten 2009, dass *GRHL2* in Mundschleimhautzellen des Plattenepithelzellkarzinoms überexprimiert ist und möglicherweise eine Aktivierung des Enzyms Telomerase (hTERT) während der zellulären Immortalisierung zur Folge hat (Kang, Chen et al. 2009). Aus später erschienenen Studien ging hervor, dass *GRHL2* die Telomerase-Expression durch epigenetische Mechanismen steuert sowie die Lebenserwartung von normalen, humanen Keratinozyten erhöht und deren Differenzierung ebenfalls über die epigenetische Regulationsebene inhibiert (Chen, Dong et al. 2010; Chen, Xiao Liu et al. 2012). Beim Magenkarzinom ist das *GRHL2*-Gen amplifiziert (Cheng, Wang et al. 2012) und die microRNA-373 reguliert die *GRHL2*-Expression auf transkriptioneller Ebene beim Mammakarzinom (Yan, Xu et al. 2011). Aus einer im Jahr 2011 erschienenen Arbeit ging hervor, dass ein *Knockdown* der *GRHL2*-Expression in der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 eine Heraufregulation der Expression des auch aus tumorbiologischer Sicht überaus bedeutsamen Todeszellrezeptors FAS bewirkt (Dompe, Rivers et al. 2011).

Insgesamt zeigten die hauptsächlich im Verlauf dieser Arbeit publizierten Veröffentlichungen, dass *GRHL2* eine zunehmend wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression humaner Tumoren spielen könnte. Auch wurden seit Beginn dieser Dissertation einige Mammakarzinom-relevante Arbeiten publiziert, deren Inhalte in der Diskussion näher betrachtet werden sollen.

## Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe

Schwerpunkt der Arbeitsgruppe ist die Identifizierung sowie strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Genen, die möglicherweise eine wichtige Rolle beim humanen Mammakarzinom spielen könnten. Dazu wurde in der Vergangenheit ein sehr aufwendiges genetisches Screening zur Identifizierung von Proto-Onkogenen etabliert und mit Erfolg durchgeführt. Dieses Verfahren beruht auf einem retroviralen Gentransfer von cDNA-Expressionsbibliotheken in NIH3T3-Fibroblasten mit anschließender phänotypischer Selektion im Fokusassay. Mit Hilfe dieser Technik gelang es, den Transkriptionsfaktor GRHL2 als neues potentielles Proto-Onkogen zu identifizieren. Die transformierenden Eigenschaften von GRHL2 konnten durch zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Experimente bestätigt werden (Werner 2009).

Bereits vor Beginn dieser Arbeit wurden zwei polyklonale GRHL2-Antikörper hergestellt und zur Untersuchung der GRHL2-Proteinexpression in einer Reihe repräsentativer Mammakarzinomzelllinien (n=10) eingesetzt (Abb. 1-5-A).



**Abb. 1-5: Analyse der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzelllinien.**

(A) Es wurde eine Western Blot-Analyse der GRHL2-Proteinexpression mit dem GRHL2-P1-Antikörper an den aufgeführten Mammakarzinomzelllinien durchgeführt. Als Kontrolle gleicher Ladung diente die HSC70-Expression. (B) Die GRHL2-Gentranskripte wurden mit Hilfe der Northern Blot-Analyse und unter Verwendung von  $^{32}\text{P}$ -markierten cDNA-Fragmenten des GRHL2-Gens in den Zelllinien dargestellt. Ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel diente als Kontrolle gleicher Ladung.

Auch wurde eine Northern Blot-Analyse zur Darstellung der GRHL2-Gentranskripte durchgeführt (Abb. 1-5-B). Dabei zeigte sich, dass GRHL2 in den verschiedenen Zelllinien heterogen exprimiert ist.

Die eher benignen Zelllinien (MCF-7, T47-D und ZR-75-1) wiesen eine hohe GRHL2-Expression auf. Im Gegensatz hierzu war GRHL2 in der „Basal-B“-Unterkategorie von Mammakarzinomzelllinien (Neve, Chin et al. 2006), den eher malignen Zelllinien BT-549 und MDA-MB-231, nicht nachweisbar (Werner 2009).

Durch die Kombination einer *Mikroarray*-Analyse und einer phylogenetischen *footprinting*-Analyse mit einer Vielzahl biochemischer Assays gelang außerdem die Identifizierung zahlreicher GRHL2-Zielgene, zu denen interessanterweise auch das in tumorbiologischer und klinisch-therapeutischer Hinsicht überaus bedeutsame *ERBB3/HER3*-Gen gehört (Werner 2009). Allerdings war unklar, ob das *ERBB3/HER3*-Gen auch in humanen Mammakarzinomzellen ein Zielgen von GRHL2 darstellt.

## 1.4 Fragestellung

In umfangreichen Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte der weitestgehend uncharakterisierte Transkriptionsfaktor GRHL2 mit Hilfe eines genetischen Screenings als ein neues, zur Transformation muriner NIH3T3-Fibroblasten befähigtes Proto-Onkogen identifiziert werden. Im Rahmen dieses Promotionsvorhabens sollte deshalb damit begonnen werden, die mögliche Rolle des GRHL2-Proto-Onkogens für die Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms zu untersuchen.

Zunächst sollten unterschiedliche Modellsysteme, die auf einer Überexpression von GRHL2 und einem shRNA-vermittelten *Knockdown* der *GRHL2*-Genexpression in Mammakarzinomzelllinien beruhen, zur funktionellen Charakterisierung des *GRHL2*-Gens generiert und für umfangreiche Studien *in vitro* und *in vivo* verwendet werden. Außerdem sollte untersucht werden, wie die Expression und die Aktivität des Transkriptionsfaktors GRHL2 in Mammakarzinomzellen reguliert sein könnte. Schließlich sollten immunhistochemische Analysen der GRHL2-Proteinexpression in primären Mammakarzinomen zur Ermittlung einer möglichen pathophysiologischen Relevanz des *GRHL2*-Gens für diese Tumorentität beitragen.

Diese Studien könnten helfen, die mögliche Rolle des GRHL2-Transkriptionsfaktors in der Karzinogenese besser zu verstehen und zu ermitteln, ob das GRHL2-Proto-Onkogen eine mögliche Zielstruktur für einen neuartigen Therapieansatz zur Behandlung von Patientinnen mit Mammakarzinom darstellen könnte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Eine Auflistung aller verwendeten Geräte, Oligonukleotide, Plasmide sowie Antikörper ist dem Anhang der Arbeit zu entnehmen.

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München), Roche Diagnostics (Mannheim) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

### 2.2 Zellkulturmethoden

#### 2.2.1 Kulturmedien

Tab. 2-1: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien und –zusätze.

	Kulturmedium 1	Kulturmedium 2	Kulturmedium 3 <sup>1)</sup>
Basis-Medium	90% (v/v) DMEM (25 mM D-Glucose, 1 mM Pyruvat) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)	90% (v/v) RPMI (PAA)	47,5% (v/v) DMEM, 47,5% (v/v) Ham's F12 (17,5 mM D-Glucose, 0,5 mM Pyruvat, 15 mM HEPES, 2,5 mM Glutamin) (Gibco, Eggenstein)
Serum	10% (v/v) FCS (PAA)	10% (v/v) FCS (PAA)	5% (v/v) Pferdeserum (Sigma-Aldrich)
Glutamin (Gibco)	2 mM	2 mM	-
Choleratoxin (Sigma-Aldrich)	-	-	100 ng/ml
EGF (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)	-	-	20 ng/ml
Hydrocortison (Sigma-Aldrich)	-	-	500 ng/ml
Insulin (Sigma-Aldrich)	-	-	10 µg/ml

Trypsin/EDTA-Lösung (1x, Gibco)	
Trypsin	0,25% (w/v)
EDTA	1 mM

in PBS ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup>

<sup>1)</sup> Für die Mammaepithelzelllinie MCF-10A wurde das Kulturmedium 3 wie folgt angesetzt: zunächst wurde die 20 ng/ml-konzentrierte EGF-Lösung 1:1000 mit Basis-Medium verdünnt. Danach wurden alle zu supplementierenden Komponenten, bis auf das Pferdeserum, zu 10 ml des Basis-Mediums gegeben und steril filtriert. Abschließend erfolgte die Zugabe aller Komponenten zum Basis-Medium.

## 2.2.2 Herkunft der Zelllinien

**Tab. 2-2: Bezeichnung und Herkunft der verwendeten Zelllinien.**

Zelllinie	Ursprung	Tumorart	Kulturmedium
BT-20 <sup>1)</sup>	Primärtumor	duktales Mammakarzinom	1
BT-474 <sup>1)</sup>	Primärtumor	duktales Mammakarzinom	2
BT-549 <sup>4)</sup>	Primärtumor	duktales Mammakarzinom	1
GI-101 <sup>3)</sup>	lokales Rezidiv	duktales Mammakarzinom	1
MCF-7 <sup>2)</sup>	Pleuraeffusion	duktales Mammakarzinom	1
MDA-MB-231 <sup>1)</sup>	Pleuraeffusion	duktales Mammakarzinom	1
MDA-MB-468 <sup>4)</sup>	Pleuraeffusion	Adenokarzinom der Brust	1
SK-BR-3 <sup>2)</sup>	Pleuraeffusion	duktales Mammakarzinom	2
T-47D <sup>2)</sup>	Pleuraeffusion	duktales Mammakarzinom	2
ZR-75-1 <sup>2)</sup>	Aszites	duktales Mammakarzinom	1
MCF-10A <sup>5)</sup>	humane Mammaepithelzellen	-	3
NIH3T3 <sup>2)</sup>	murine embryonale Fibroblasten	-	1
HEK-293T <sup>1)</sup>	humane embryonale Nierenzellen	-	1
ψNX-eco <sup>2)</sup>	humane embryonale Nierenzellen	-	1
ψNX-ampho <sup>2)</sup>	humane embryonale Nierenzellen	-	1

<sup>1)</sup> erhalten von American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA

<sup>2)</sup> erhalten aus der Zellkulturbank des ICRF Laboratory, London, UK

<sup>3)</sup> erhalten von Dr. J. Hurst, Goodwin Institute for Cancer Research, Plantation, USA

<sup>4)</sup> erhalten von Cell Lines Service (CLS), Eppelheim

<sup>5)</sup> erhalten von Prof. M. Oren, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

### 2.2.3 Standardkulturbedingungen

Die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien erfolgte in Hera150-Brutschränken der Firma Kendro (Langenselbold) bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre und 10% CO<sub>2</sub> für Zellen in Kulturmedium 1 bzw. 5% CO<sub>2</sub> für Zellen in Kulturmedium 2 und 3. Alle Zelllinien wurden in sterilen Kulturgefäßen der Firma BD Falcon (Heidelberg) oder der Firma Techno Plastic Products (TPP, Trasadingen, Schweiz) kultiviert. Routinemäßig wurden die Zellen zwei- bis drei Mal wöchentlich unter sterilen Bedingungen passagiert. Dabei wurden die adhärent wachsenden Zellen mit PBS (Gibco) bei 37°C gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Dieser Vorgang wurde durch Zugabe von vorgewärmtem Kulturmedium und anschließender Zentrifugation bei 500 x g für 3 min gestoppt, bevor die Zellen in Vollmedium resuspendiert und in einer Dichte von 10-30% in ein neues Kulturgefäß ausgesät wurden.

### 2.2.4 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Um beim Einfrieren der Zellen eine Bildung von Eiskristallen in den Zellen zu vermeiden, wurde den Zellen durch Zugabe des stark hygroskopischen Dimethylsulfoxid (DMSO) langsam das Wasser entzogen. Mindestens  $2 \times 10^6$  Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium (10% (v/v) DMSO, 90% (v/v) Vollmedium) resuspendiert und in 1,5 ml Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) gegeben. Nach 24-stündiger Kühlung bei -80°C wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen wurden diese für 1-2 min in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben. Die Zellsuspension wurde mit 5 ml Vollmedium versetzt und sedimentiert um das toxische DMSO zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Resuspension in Vollmedium und die Zellen wurden in geeigneter Dichte wieder ausgesetzt.

### 2.2.5 Mycoplasmen-Test

Um eine mögliche Kontamination der Zellkulturen mit Mycoplasmen zu detektieren, wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen einem Test unterzogen. Hierfür wurde der Venor<sup>®</sup> GeM Kit (Minerva Biolabs, Berlin) verwendet. Die Durchführung des Tests erfolgte mit halbiertem Reaktionsvolumen nach Herstellerangaben.

### 2.2.6 Transfektion eukaryontischer Zellen

Für die Transfektion eukaryontischer Zellen (Cox and Der 1994) wurde Lipofectamine 2000<sup>™</sup> (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, welches der Gruppe der kationischen Lipide angehört. Liposom-

Reagenzien binden im Komplex mit Plasmid-DNA an negativ geladene Oberflächenstrukturen der Zellen und werden durch Fusion mit der Plasmamembran endosomal von den Zellen aufgenommen.

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer Dichte von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/T25-Zellkulturflasche ausgesät. Zur Durchführung der Transfektion wurden 8 µg Plasmid-DNA mit 500 µl OptiMEM (Gibco) gemischt. In einem zweiten Reaktionsansatz wurden 20 µl Lipofectamine 2000™-Transfektionsreagenz mit 500 µl OptiMEM (Gibco) vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurden beide Ansätze vereinigt und für weitere 20 min inkubiert. Dieser Transfektionscocktail wurde zu 5 ml Vollmedium auf die Zellen gegeben und nach 6 h durch Kulturmedium ersetzt.

Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte 48 h nach der Transfektion.

### 2.2.7 Retroviraler Gentransfer

Mit Hilfe des retroviralen Gentransfers ist es möglich, eine stabile Expression eines Transgens in Zelllinien herbeizuführen. Es wird dabei zwischen ecotropen und amphotropen Verpackungszelllinien unterschieden. Der Wirtsbereich ecotroper Retroviren, die zur Infektion der NIH3T3-Fibroblasten eingesetzt wurden, beschränkt sich auf Maus- und Rattenzellen. Amphotrope Retroviren besitzen einen größeren Wirtsbereich, der auch humane Zellen einschließt. Daher wurden sie für die Infektion der Mammakarzinomzelllinien verwendet.

Für die Durchführung eines retroviralen Gentransfers (Kitamura, Onishi et al. 1995) wurde zunächst die Verpackungszelllinie unter Verwendung von Lipofectamine 2000™ in 6 cm-Schalen transient transfiziert (Kap. 2.2.6). Die von den Zellen produzierten und in den Zellkulturüberstand abgegebenen retroviralen Partikel enthielten das Transgen. Dieser Überstand wurde 48 h nach der Transfektion abgenommen und für 5 min bei  $500 \times g$  zentrifugiert um Zellen und Zelltrümmer zu sedimentieren. Unter Verwendung eines Filters (Millex® *Syringe Driven Filter Unit*, Millipore, Schwalbach) mit einer Ausschlussgröße von  $0,45 \mu\text{m}$  wurde der Überstand steril filtriert und entweder direkt für die Infektion der Zielzellen verwendet oder bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Einen Tag vor der Infektion wurden  $2 \times 10^5$  Zielzellen in einer T25-Zellkulturflasche ausgesät. Am Tag der Infektion wurde der Infektionscocktail, bestehend aus 1 ml retroviralem Überstand, 1 ml Kulturmedium und 8 µg/ml Polybrene, tropfenweise auf die zuvor mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Der Infektionscocktail wurde nach einer Inkubationszeit von 6 h komplett durch 5 ml Vollmedium ersetzt. 24 h später erfolgte eine zweite Infektion der Zielzellen und der Infektionscocktail wurde nach weiteren 6 h Inkubationszeit durch Medium ersetzt. Die Selektion von

stabil transfizierten Zelllinien erfolgte mit 1-4 µg/ml Puromycin (PAA). Die stabile Expression des Transgens wurde über eine Western Blot-Analyse nachgewiesen (Kap. 2.4.1).

### 2.2.8 Produktion lentiviraler Partikel und Infektion humaner Mammakarzinomzellen

Um eine stabile, retroviral-vermittelte Herunterregulation der Genexpression in humanen Mammakarzinomzelllinien zu erreichen, wurden HEK-293T-Zellen mit Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) transfiziert (Kap. 2.2.6). Der DNA-Cocktail bestand aus 4 µg pLKO.1 shRNA Plasmid-DNA (Open Biosystems, Huntsville, USA; Tab. 8-4), 3 µg psPAX2 (Addgene, Cambridge, USA) und 1 µg pMD2.G (Addgene). Der Zellkulturüberstand auf den HEK-293T-Zellen, der die lentiviralen Partikel enthält, wurde 48 h nach der Transfektion abgenommen, zentrifugiert und mit Hilfe der Millex® *Syringe Driven Filter Unit* (Millipore) steril filtriert. Der lentivirale Überstand wurde entweder direkt für die Infektion humaner Zielzellen verwendet oder für eine langfristige Aufbewahrung bei -80°C gelagert.

Die Zielzellen wurden 24 Stunden vor der Infektion in einer T25-Zellkulturflasche so ausgesät, dass am Tag der Transduktion eine Zelldichte von 40-80% erreicht war. Am Tag der Infektion wurde 5 ml frisches, mit 8 µg/ml Polybrene supplementiertes Kulturmedium auf die Zielzellen gegeben. Die Infektion der Zellen erfolgte durch Zugabe von variablen Mengen des lentiviralen Überstandes. Nach weiteren 24 Stunden wurde der Infektionscocktail gegen Selektionsmedium mit 4 µg/ml Puromycin (PAA) ausgetauscht. Nach einer Selektionszeit von 5 Tagen wurde der *Knockdown* der Genexpression mit Hilfe spezifischer Antikörper durch Western Blot- (Kap. 2.4.1) und qRT-PCR-Analyse (Kap. 2.3.19) überprüft.

### 2.2.9 Bestimmung der Zellproliferationsrate

5 mg/ml *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (MTT, Roche Diagnostics) in H<sub>2</sub>O

Lysispuffer:

1 mM HCl  
0,1% (w/v) Nonidet P-40 (Roche) in Isopropanol

Zur Bestimmung der Proliferationsrate von Zellen wurde ihr Teilungsverhalten über einen Zeitraum von insgesamt 7 Tagen analysiert. Am Tag 0 wurden für jeden weiteren Zeitwert jeweils 1,5 - 3 x 10<sup>3</sup> Zellen im Triplikate in 96-Loch-Platten ausgesetzt. Die Zellzahl wurde nach 3, 5 und 7 Tagen bestimmt. Dazu wurde zu den Zellen 20 µl MTT-Lösung (5 mg/ml) gegeben und 1-3 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen mit 150 µl Lysispuffer

aufgeschlossen. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 540 nm mit 650 nm als Referenzfilter mit Hilfe des „Sunrise Remote“-ELISA-Readers (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz).

### **2.2.10 Untersuchung des klonogenen Wachstums**

Die Fähigkeit von Zellen als vielzellige Klone heranzuwachsen ist eine Eigenschaft, die Tumorzellen charakterisiert. Zur Untersuchung der Koloniebildung wurden  $1 \times 10^3$  Zellen in einer 6 cm-Kulturschale ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer 0,005%-igen Kristallviolett-Lösung in 20% Methanol für 20 min fixiert, gefärbt und abschließend quantifiziert.

### **2.2.11 Untersuchung des verankerungsunabhängigen Wachstums im Weich-Agar**

Zum Nachweis des verankerungsunabhängigen Wachstums der verschiedenen Zellklone wurden Weich-Agar-Assays durchgeführt. Zunächst wurde eine durch Autoklavieren sterilisierte, 5%-ige Agar-Stammlösung aus Agar Noble (BD Biosciences, Heidelberg) in H<sub>2</sub>O hergestellt. Anschließend kühlte die Agarlösung auf 45°C im Wasserbad ab und wurde bis zur Verarbeitung auf dieser Temperatur gehalten. Für die Herstellung der Agar-Böden wurde eine 0,5%-ige Lösung aus der Agar-Stammlösung und 45°C-warmen Kulturmedium hergestellt. Die 6-cm-Kulturschalen wurden mit jeweils 7 ml des Weich-Agars befüllt. Die restliche Lösung wurde für 20 min weiter auf 40°C im Wasserbad abgekühlt. Die Polymerisierung der Agar-Böden erfolgte für ca. 30 min bei RT. Die zu untersuchenden Zellen wurden trypsinisiert und gezählt. Jeweils  $1 \times 10^3$  bis  $1 \times 10^4$  Zellen wurden in 2 ml Kulturmedium aufgenommen und mit 4 ml der 0,5%-igen Agarlösung vermischt. Jeweils 1,5 ml dieser Zellsuspension wurde auf einen Agar-Boden gegeben. Die Polymerisierung der oberen Agar-Schicht erfolgte für weitere 30 min bei RT. Einmal wöchentlich wurde 1 ml Medium auf die Zellen gegeben. 4 Wochen nach Versuchsbeginn wurden die Zellklone mit einer 0,005%-igen Kristallviolett-Lösung über Nacht gefärbt. Die Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse erfolgte am Durchlichtmikroskop mit Kamera (Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar).

### **2.2.12 Bestimmung des Migrationsverhaltens**

Um die Migrationsfähigkeit von Mammakarzinomzelllinien zu untersuchen, wurde ein Boyden-Kammer-Assay durchgeführt (Albini, Iwamoto et al. 1987). Die *Transwell*-Filter mit einer Porengröße von 8 µm wurden von der Firma BD Falcon bezogen. Es wurde eine Zellsuspension in Medium ohne FCS hergestellt und  $5 \times 10^4$  Zellen in jeden Einsatz ausgesät. Als Chemoattraktant diente Kulturmedium mit 10% FCS im unteren Segment. Nach einer Inkubationszeit von 20-22 h wurden die Zellen, die sich noch im oberen Segment befanden, mit einem Wattestäbchen entfernt. Die Zellen auf

der Unterseite der Membran wurden für 15 min mit 4% Paraformaldehyd fixiert, für 15 min mit einer gesättigten Kristallviolett-Lösung angefärbt und mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Abschließend wurden die Membranen mit einem Skalpell von den Einsätzen getrennt und mit Hilfe von Immersionsöl (ImmersoITM 518 F, Zeiss, Oberkochen) auf einen Objektträger aufgebracht. Die Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse erfolgte am Durchlichtmikroskop mit Kamera (Leica Mikroskopie und Systeme GmbH).

### 2.2.13 Bestimmung des Invasionsverhaltens

Für die Bestimmung der Invasionsfähigkeit von Mammakarzinomzelllinien wurde ebenfalls ein Boyden-Kammer-Assay durchgeführt, bei dem die oberen Segmente (BD Falcon) zusätzlich mit Matrigel™ beschichtet waren. Dabei handelt es sich um Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Tumor-Matrixproteine, die ein Basalmembran-Analog darstellen (Kleinman and Martin 2005). Die Durchführung des Versuchs erfolgte wie in Kap. 2.2.12 beschrieben.

### 2.2.14 Implantation von Zellen in immundefiziente Mäuse

Die Tierversuche wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernd Groner aus dem Georg-Speyer-Haus, Institut für Biomedizinische Forschung, in Frankfurt/Main durchgeführt. Für den Versuch wurden pro Zelllinie zehn weibliche Nacktmäuse (Stamm: Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> und SCIDγc<sup>-/-</sup>) verwendet. Pro Maus wurden 5 x 10<sup>5</sup> fluoreszenzmarkierte Zellen einer Einzelzellsuspension orthotop implantiert. Es wurde sowohl das Primärwachstum der Tumoren beobachtet als auch die Metastasierung der Zellen in die Lunge beurteilt. Die Versuche wurden nach 10-12 Wochen beendet und die Tiere terminiert. Die Quantifizierung der Fluoreszenz in der Lunge erfolgte mit Hilfe des frei erhältlichen Programms ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

### 2.2.15 Induktion einer EMT mit *Transforming Growth Factor β* (TGF-β)

Einen Tag vor der Induktion der EMT wurden die Zellen in einer Dichte von 3 x 10<sup>5</sup> Zellen/T25-Zellkulturschale ausgesät. Die Stimulation erfolgte für 48 h mit 5 ng/ml TGF-β (R&D Systems, Minneapolis, USA). Zur Auswertung wurde die Zellmorphologie aufgenommen, Gesamt-RNA isoliert (Kap. 2.3.13) und für die qRT-PCR-Analyse (Kap. 2.3.19) eingesetzt. Weiterhin wurden NP40-Gesamtzellextrakte (Kap. 2.4.1.1) hergestellt und mittels Western Blot-Analyse (Kap. 2.4.1) untersucht.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Kultivierung von *E.coli*

#### 2.3.1.1 *Verwendete Bakterienstämme*

Für Transformationsexperimente und zur Vermehrung von Plasmiden wurden die *E.coli*-Bakterienstämme DH5 $\alpha$  und NEB 5-alpha (New England BioLabs, Frankfurt/Main) verwendet.

#### 2.3.1.2 *Vermehrung von E.coli*

##### LB-Medium (pH 7,5):

1% (w/v)	Bacto-Trypton (BD Biosciences)
0,5% (w/v)	Hefeextrakt (BD Biosciences)
1% (w/v)	NaCl

##### Zusatz für feste Nährböden:

1,5% (w/v)	Bacto-Agar (BD Biosciences)
------------	-----------------------------

##### Ampicillin:

Stammlösung	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Endkonzentration	100 $\mu$ g/ml

##### Kanamycin:

Stammlösung	25 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Endkonzentration	25 $\mu$ g/ml

Für die Herstellung von festen Nährböden wurde dem autoklavierten LB-Medium nach Abkühlung auf ca. 56°C das entsprechende Antibiotikum, je nach Selektionsanforderung des Plasmids, zugesetzt. Antibiotikahaltige Platten wurden bis zu 4 Wochen bei 4°C gelagert.

Zur Vermehrung von *E.coli* wurde eine 5 ml Vorkultur (LB-Medium plus Antibiotikum) mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in einem Inkubationsschüttler bei 37°C und 180 rpm über Nacht.

### 2.3.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

#### FB-Puffer (pH 6,4):

100 mM	KCl
50 mM	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
10% (w/v)	Glycerol
10 mM	Kaliumacetat

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurden 3 ml LB-Medium mit *E.coli* DH5α inokuliert und über Nacht im Inkubationsschüttler bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden 250 ml LB-Medium mit 2,5 ml Vorkultur angeimpft und bei 37°C für 3 h geschüttelt bis eine OD<sub>550</sub> von 0,4 bis 0,6 erreicht war. Die Bakteriensuspension wurde für 30 min auf Eis gekühlt und die Bakterien anschließend sedimentiert (3000 rpm; 15 min; 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 80 ml FB-Puffer resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut sedimentiert (3000 rpm; 15 min; 4°C) und das Pellet in 20 ml FB-Puffer resuspendiert. Die transformationskompetenten Bakterien wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 2.3.3 Transformation von *E.coli*

50 µl transformationskompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und <0,1 µg Plasmid-DNA oder 1 µl Ligationsansatz (Kap. 2.3.11) zugegeben. Die Zellsuspension inkubierte 30 min auf Eis, bevor der Ansatz für 30 sec bei 42°C erwärmt und danach sofort wieder für 2 min auf Eis abgekühlt wurde. Zur Regeneration wurde der Zellsuspension 450 ml LB-Medium zugesetzt und bei 37°C und 180 rpm für 1 h inkubiert. Nachdem die transformierten Bakterien in unterschiedlichen Verdünnungen auf Antibiotika-haltige LB-Platten ausgestrichen wurden, erfolgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37°C über Nacht. Die Kulturplatten wurden bis zum Animpfen von Flüssigkulturen bei 4°C gelagert.

### 2.3.4 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab

5 ml LB-Medium plus Antibiotikum wurden mit einer Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Zur Präparation der Plasmid-DNA wurden 1,5 ml der Übernachtskultur mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren) entsprechend den Herstellerangaben aufgearbeitet. Die in 50 µl AE-Puffer eluierte DNA wurde entweder durch einen Restriktionsverdau (Kap. 2.3.7) oder eine Sequenzierung (Kap. 2.3.18) charakterisiert oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.3.5 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab

100 ml LB-Medium plus Antibiotikum wurden mit 10 µl einer Vorkultur beimpft und über Nacht im Schüttler inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Die DNA wurde nach der Elution in TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### 2.3.6 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA

Konzentration und Reinheitsgrad von DNA-Präparationen wurden durch Messung der OD<sub>260</sub> bzw. OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> bestimmt. Hierbei gilt, dass eine OD<sub>260</sub> von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht. Der Reinheitsgrad der untersuchten Proben lässt sich durch die Ermittlung des Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> beurteilen. Für nachfolgende Arbeiten wurden nur Plasmidpräparationen verwendet deren Quotient mindestens 1,8 betrug.

### 2.3.7 Restriktionsverdau

Alle Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Reaktionspuffer wurden von der Firma New England BioLabs bezogen. Restriktionsspaltungen wurden bei 37°C für 3 h oder über Nacht durchgeführt. Die DNA-Konzentration im Ansatz betrug maximal 50 µg/ml. Das Enzym wurde im leichten Überschuss (3-5 U/µg DNA) eingesetzt, wobei eine Glycerolkonzentration von 5% nicht überschritten wurde.

### 2.3.8 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Die Behandlung mit alkalischer Phosphatase verhindert die Eigenligation von gespaltener Plasmid-DNA durch die Entfernung der terminalen 5'-Phosphatgruppen. Nach dem Restriktionsverdau von 1 µg Vektor-DNA in einem 20 µl Reaktionsansatz wurden 1 µl Antarctic Phosphatase (5 U/µl; New England BioLabs), 3 µl 10x Antarctic Phosphatase-Reaktionspuffer und 6 µl H<sub>2</sub>O zugesetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Phosphatase für 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Die geschnittene und dephosphorylierte Vektor-DNA wurde mit DNA-Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch in Agarosegelen aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert und direkt im Anschluss für eine Ligationsreaktion eingesetzt (Kap. 2.3.9 bis Kap. 2.3.11) oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Bei einer gerichteten Klonierung mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen konnte auf die Dephosphorylierung der Plasmid-DNA verzichtet werden.

### 2.3.9 Gelelektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren

#### TAE-Puffer (pH 8,3):

40 mM	Tris-Acetat
1 mM	EDTA
1% (v/v)	Essigsäure

#### TBE-Puffer (pH 8,0):

89 mM	Borsäure
89 mM	Tris/HCl
2 mM	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O

#### 10x DNA-Probenpuffer (pH 8,0):

50% (v/v)	Glycerol
1 mM	EDTA
0,4% (w/v)	Bromphenolblau
0,4% (w/v)	Xylencyanol

Die Agarose-Gelelektrophorese von DNA erfolgte für analytische und präparative Zwecke in horizontalen Elektrophoreseapparaturen, wobei für die analytische Auswertung TBE-Gele und für präparative Zwecke TAE-Gele verwendet wurden. Die Auftrennung erfolgte in 1-2%-igen Agarosegelen (Lonza, Basel, Schweiz), denen vor der Polymerisierung 2‰ (v/v) Ethidiumbromid zur Visualisierung der DNA zugesetzt wurde. Die auspolymerisierten Gele wurden mit dem jeweiligen Laufpuffer überschichtet und mit Proben beladen, die zuvor mit 1/10-Volumen DNA-Probenpuffer versetzt wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei 90-100 V. Als Referenz für das Molekulargewicht wurde der DNA-Standard HyperLadder I oder HyperLadder IV (Bioline, London, UK) verwendet. Auswertung und Dokumentation der Gele wurde mit der „GeneGenius 2“-Geldokumentationsanlage (Syngene, Cambridge, UK) und zugehöriger Software vorgenommen.

### 2.3.10 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zu klonierende cDNA-Fragmente wurden nach dem Restriktionsverdau (Kap. 2.3.7) im Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel) aus dem Gel isoliert. Dazu wurde unter UV-Licht (UV Transilluminator, Syngene) die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und entsprechend den Herstellerangaben aufgearbeitet. Die DNA wurde mit 15 µl NE-Puffer eluiert und direkt für die Ligation (Kap. 2.3.11) eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.3.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation der Vektor- und Insert-DNA erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (New England BioLabs), wobei das Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA ungefähr 1:3 betrug. Zur Begünstigung der intermolekularen Ligation wurden hohe DNA-Konzentrationen (100 ng/µl) eingesetzt. Insert- und Vektor-DNA wurden mit 1 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl) sowie 1 µl 10x Reaktionspuffers versetzt und

mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt. Der Ansatz inkubierte über Nacht bei 16°C. Die Vermehrung des rekombinanten Plasmids erfolgte durch Transformation von Bakterien mit dem Ligationsansatz (Kap. 2.3.3).

### 2.3.12 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus Zellen, die in einer T25-Zellkulturflasche eine Konfluenz von 80-90% erreicht hatten, wurde das DNeasy<sup>®</sup> Tissue Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Elution der DNA wurde zweifach in einem Volumen von 100 µl wiederholt. Der DNA-Gehalt und die DNA-Reinheit wurden durch Messung der OD<sub>260</sub> bzw. OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> bestimmt.

### 2.3.13 Isolierung von Gesamt-RNA

Ausgehend von einem Zellmaterial einer subkonfluenten T75-Zellkulturflasche erfolgte die Isolierung von Gesamt-RNA mit dem TRIZOL<sup>®</sup>-Reagenz (Invitrogen). Die Zellen wurden pelettiert, in 2 ml TRIZOL<sup>®</sup> aufgenommen, homogenisiert und auf zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT folgte eine Zugabe von je 200 µl Chloroform. Danach inkubierten die Proben für weitere 2-3 min bei RT und wurden für 15 min bei 12000 x g zentrifugiert. Hierbei kam es zur Phasentrennung von organischen Zellmaterialien und wasserlöslichen Substanzen. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Isopropanol gemischt um die RNA zu präzipitieren. Nach 15 min Inkubation bei RT folgte eine Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C für 10 min um die RNA zu sedimentieren. Das RNA-Pellet wurde zum Herauslösen von verunreinigenden Salzen für 30 min in 1 ml 75%-igem Ethanol inkubiert. Danach wurde das Pellet getrocknet und in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die RNA-Konzentration und -reinheit wurden am Photometer bestimmt.

Für die Verwendung in der quantitativen RT-PCR-Analyse (Kap. 2.3.19) wurde Gesamt-RNA aus dem Zellmaterial einer subkonfluenten T25-Zellkulturflasche mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II Kit (Macherey-Nagel) isoliert. Mögliche DNA-Verunreinigungen wurden mit Hilfe der im Kit bereit gestellten rDNase verdaut. Die Elution der RNA erfolgte mit 40 µl RNase-freiem Wasser.

Konzentration und Reinheitsgrad der RNA wurde anhand der OD<sub>260</sub> bzw. OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> bestimmt. Hierbei gilt, dass eine OD<sub>260</sub> von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml RNA entspricht. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.3.14 Reverse Transkription

Für die anschließende Klonierung von PCR-Produkten wurde die mit TRIZOL<sup>®</sup> isolierte Gesamt-RNA (Kap. 2.3.13) mit dem SuperScript<sup>®</sup> First-Strand Synthesis System (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Je nach Fragestellung wurde die reverse Transkriptionsreaktion mit Hilfe von Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primern oder Random Hexamer Primern und dem Enzym SuperScript<sup>®</sup> II RT (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für beide Methoden wurde 5 µl Gesamt-RNA eingesetzt, die synthetisierte cDNA mit Hilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel) aufgereinigt und bei -20°C gelagert.

Für die Verwendung in der quantitativen RT-PCR-Analyse (Kap. 2.3.19) wurde die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA, die mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II Kit (Macherey-Nagel) isoliert wurde (Kap. 2.3.13), mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Burlington, Kanada) durchgeführt. Es wurde 1 µg Gesamt-RNA mit Hilfe von Random Hexamer Primern und dem Enzym M-MuLV Reverse Transkriptase (Fermentas) in cDNA umgeschrieben. Die Lagerung der cDNA fand bis zur weiteren Verwendung bei -20°C statt.

### 2.3.15 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Hilfe von *proofreading*-Enzymen

Je nach Fragestellung wurden für die Amplifikation von cDNA zwei unterschiedliche DNA-Polymerasen verwendet. Bei nachfolgender Klonierung der PCR-Fragmente in Expressionsplasmide (Kap. 2.3.16) wurde die Phusion<sup>®</sup> High Fidelity DNA-Polymerase (New England BioLabs) gewählt, die über eine hohe *proofreading*-Aktivität verfügt, wodurch es zu einer deutlich verringerten Fehlerrate beim Einbau von Nukleotiden während der Synthese von DNA-Strängen kommt. Für ausschließlich analytische Zwecke wurde die Taq DNA-Polymerase (Qiagen) verwendet, die im Vergleich zur Phusion<sup>®</sup>-Polymerase weniger empfindlich auf Verunreinigungen reagiert, dafür aber kaum *proofreading*-Aktivität besitzt. Bei allen verwendeten Enzymen hängt die Temperatur für das Primer-*Annealing* von der Nukleotidsequenz der beiden Primer und die Dauer der Primer-*Extension*-Reaktion von der Größe des Amplifikationsproduktes ab.

#### 2.3.15.1 Amplifikation mit der Phusion<sup>®</sup> High Fidelity DNA-Polymerase

Die 50 µl-Reaktionsansätze wurden auf Eis angesetzt und enthielten 1-5 µl cDNA (Kap. 2.3.14), 10 µl 5x Phusion HF-Reaktionspuffer, 1 µl dNTPs (je 10 mM; Promega, Mannheim) je 2 µl Primer (100 ng/µl), das entsprechende Volumen H<sub>2</sub>O und 0,5 µl Phusion<sup>®</sup> High Fidelity DNA-Polymerase

(2000 U/ml). Die Reaktion im Flexigene-Thermocycler (Techne, Staffordshire, UK) lief bei folgendem Programm ab:

Initiale Denaturierung	30 sec	98°C	} 30 Zyklen
Denaturierung	10 sec	98°C	
Primer- <i>Annealing</i>	20 sec	58-63°C	
Primer- <i>Extension</i>	20 sec/kb	72°C	
Auffüllreaktion	7 min	72°C	

Bei einer Reamplifikation von Plasmid-DNA wurde 200 ng Ausgangsprodukt eingesetzt und die Anzahl der Zyklen auf 12 verkürzt um PCR-induzierte Mutationen zu vermeiden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei 4°C gelagert.

### 2.3.15.2 Amplifikation mit der Taq DNA-Polymerase

Als Matrize für eine PCR-Analyse mit der Taq DNA-Polymerase (Qiagen) wurde 1 µl cDNA (Kap. 2.3.14) eingesetzt. Die 50 µl-Ansätze wurden auf Eis pipettiert und enthielten neben der DNA noch 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1 µl dNTPs (je 10 mM, Promega), je 1 µl Primer (100 ng/µl), 40,75 µl H<sub>2</sub>O und 0,25 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl). Die Reaktion erfolgte im Flexigene-Thermocycler (Techne) wie folgt:

Initiale Denaturierung	3 min	94°C	} 30 Zyklen
Denaturierung	45 sec	94°C	
Primer- <i>Annealing</i>	45 sec	57-63°C	
Primer- <i>Extension</i>	1 min/kb	72°C	
Auffüllreaktion	10 min	72°C	

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei 4°C gelagert.

### 2.3.16 Klonierung von PCR-Produkten

Sollten PCR-Produkte in Plasmidvektoren kloniert werden, wurden Oligonukleotide (Sigma-Aldrich) für die PCR-Amplifikation verwendet, die an ihren 5'-Enden eine Guanidin (G)- und Cytosin (C)-reiche Schutzgruppe (GCGCTACA), eine spezifische Erkennungssequenz des für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzym und gegebenenfalls eine Hämagglutinin-Erkennungssequenz enthielten. Am 3'-Ende der Oligonukleotide befand sich die zur Zielsequenz komplementäre genspezifische DNA-Sequenz. Die PCR-Reaktion wurde mit der Phusion<sup>®</sup> High Fidelity DNA-Polymerase durchgeführt (Kap. 2.3.15.1). Die Produkte wurden nach erfolgreicher Amplifikation mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR

Clean-up Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (Kap. 2.3.7). Danach folgte die Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel, die Isolierung aus dem Gel und die Ligation in den linearisierten Plasmidvektor (Kap. 2.3.9 bis Kap. 2.3.11).

### 2.3.17 Zielgerichtete Mutagenese

Die Methode der zielgerichteten Mutagenese ermöglicht es, durch eine PCR-Reaktion Mutationen in Plasmide einzufügen. Für die Amplifikation des gesamten Plasmids mit der *PfuUltra* DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) wurden zwei komplementäre Oligonukleotide mit der gewünschten Mutation eingesetzt, so dass jeder neu synthetisierte DNA-Strang mutiert war. Um unmutierte Plasmid-DNA aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, erfolgt eine Inkubation mit dem Restriktionsenzym DpnI. Dieses Enzym spaltet ausschließlich die aus Bakterien gewonnene, methylierte Template-DNA, nicht aber PCR-Produkte. Die noch linearisierten Plasmide mit eingeführter Mutation wurden nach Transformation in Bakterien (Kap. 2.3.3) durch bakterielle Ligasen zirkularisiert.

Für eine Mutagenese-PCR enthielten die 50 µl-Reaktionsansätze 5 ng Template-DNA, 5 µl 10x *PfuUltra*-Reaktionspuffer, 1 µl dNTPs (je 10 mM, Promega), je 1,25 µl Primer (100 ng/µl), das entsprechende Volumen H<sub>2</sub>O und 1 µl *PfuUltra* DNA-Polymerase (2,5 U/µl). Die Mutagenese-PCR im Flexigene-Thermocycler (Techne) lief nach folgendem Amplifikationsprogramm ab:

Initiale Denaturierung	30 sec	95°C	} 12-16 Zyklen
Denaturierung	30 sec	95°C	
Primer- <i>Annealing</i>	1 min	55°C	
Primer- <i>Extension</i>	1 min/kb	68°C	

Für die Mutation nur eines Nukleotids (Punktmutation) wurden 12 und für den Austausch von zwei oder drei Nukleotiden 16 Zyklen benötigt. Nach der Amplifikation wurde der Reaktionsansatz für 2 min auf Eis inkubiert. Der Verdau der Template-DNA erfolgte durch Zugabe von 1 µl DpnI (New England Biolabs) und Inkubation für 1 h bei 37°C. Zur Vermehrung der so gewonnenen Plasmid-DNA wurde 1 µl des DpnI-verdauten Reaktionsansatzes für die Transformation des Bakterienstammes *E.coli* NEB 5-alpha (New England BioLabs) (Kap. 2.3.3) eingesetzt. Der korrekte Einbau der zielgerichteten Mutation wurde durch eine DNA-Sequenzanalyse überprüft (Kap. 2.3.18).

### 2.3.18 Automatische DNA-Sequenzierung

Die Sequenzanalyse wurde nach der Didesoxy-Methode (Sanger and Coulson 1975) mit dem BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) durchgeführt. Der vom Hersteller gelieferte BigDye-Mix enthielt „FF“-Taq-Polymerase, Taq-Reaktionspuffer, dNTPs und die vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxy-NTPs.

Für einen 20 µl-Sequenzieransatz wurden 0,5 µg DNA, 1 µl Primer (3,2 pmol/µl), 4 µl 5x BigDye<sup>®</sup>-Reaktionspuffer und 4 µl BigDye<sup>®</sup>-Mix mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Im Thermocycler (Techne) wurden 25 Zyklen des folgenden Programms durchlaufen:

Denaturierung	10 sec	96°C	} 25 Zyklen
Primer- <i>Annealing</i>	15 sec	50°C	
Primer- <i>Extension</i>	4 min	60°C	

Anschließend wurde der Sequenzieransatz mit 16 µl H<sub>2</sub>O versetzt und die DNA durch Zugabe von 64 µl 100%-igem Ethanol für 30 min bei RT gefällt. Nach Zentrifugation bei 16100 x g und 4°C für 30 min wurde das Pellet mit 250 µl 70%-igem Ethanol gewaschen. Danach wurde die DNA für 5-10 min bei RT getrocknet. Die Detektion und Analyse der Sequenzen erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie, UKE Hamburg. Zur Auswertung der Ergebnisse diente das frei erhältliche Programm FinchTV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>). Zum Abgleich der erhaltenen Sequenzen mit der Datenbank wurde eine BLAST-Analyse ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) durchgeführt (Altschul, Gish et al. 1990).

### 2.3.19 Quantitative *Realtime*-PCR (qRT-PCR)-Analyse und relative mRNA-Quantifizierung

Das Prinzip der qRT-PCR-Analyse beruht auf dem Einsatz von fluoreszierenden Reporterfarbstoffen, die eine Verfolgung der Reaktion in Echtzeit (engl. *realtime*) und eine Quantifizierung der eingesetzten DNA ermöglichen. Die Farbstoffmoleküle (SYBR-Green) werden unspezifisch in Doppelstrang-DNA eingebaut, was mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg führt, der sich proportional zur PCR-Produktmenge verhält.

Als Ausgangsmaterial diente 1 µg Gesamt-RNA (Kap. 2.3.13) und wurde für die cDNA-Synthese (Kap. 2.3.14) eingesetzt. Nach Abschluss der Synthesereaktion wurde die gewonnene cDNA im Verhältnis 1:20 mit H<sub>2</sub>O verdünnt.

Die Reaktionsansätze einer qRT-PCR-Analyse hatten ein Endvolumen von 15 µl und wurden stets im Triplet angefertigt. Pro Ansatz wurden 7,5 µl Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, USA), jeweils 0,375 µl Primer (10 µm/µl) und 6,75 µl der verdünnten cDNA verwendet. Die Ansätze wurden zunächst in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen angesetzt und dann auf die twin.tec PCR-Platte (Eppendorf AG, Hamburg) übertragen. Durchgeführt wurde die qRT-PCR-Analyse mit dem Realplex<sup>4</sup>-PCR-Gerät (Eppendorf AG). Das PCR-Programm startete mit 2 min bei 55°C, gefolgt von der initialen Denaturierung für 10 min bei 95°C. Dann wurden 40 Zyklen im Thermocycler durchlaufen:

Denaturierung	15 sec	95°C	} 40 Zyklen
Primer- <i>Annealing</i>	30 sec	58°C	
Primer- <i>Extension</i>	30 sec	68°C	

Es folgte ein Denaturierungsschritt von 15 sec bei 95°C. Danach wurden die Proben für 30 sec bei 60°C inkubiert. Das Programm endete mit einem über 20 min laufenden Anstieg der Temperatur auf 95°C um die Schmelzkurven der Oligonukleotide zu bestimmen. Mit Hilfe der realplex<sup>4</sup>-PCR-Software erfolgte die Auswertung der Rohdaten. Weitere Berechnungen wurden mit dem Microsoft-Excel-Programm vorgenommen.

Zur Berechnung der relativen Genexpressionen auf Grundlage der aus der qRT-PCR-Analyse gewonnenen Daten wurde die  $\Delta\Delta CP$ -Methode verwendet. Der CP-Wert (CP; *Crossing Point*) beschreibt den PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz der neusynthetisierten DNA erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Die Expression des Zielgens wird zunächst auf die Expression eines homogen exprimierten Referenzgens bezogen. Wichtig hierbei ist die gleiche Effizienz der PCR-Reaktionen für Ziel- und Referenzgen. Als Referenzgen wurde GAPDH oder RPLP0 gewählt:

$$\Delta CP = CP_{\text{Zielgen}} - CP_{\text{Referenzgen}}$$

Nach dieser Normierung wird vom  $\Delta CP$ -Wert der zu messenden Proben der  $\Delta CP$ -Wert der Kontrolle abgezogen:

$$\Delta\Delta CP = \Delta CP_{\text{Probe}} - \Delta CP_{\text{Kontrolle}}$$

Der relative Expressionsunterschied (Ratio) zwischen verschiedenen Proben ergibt sich aus der Formel:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

Liegt der relative Expressionsunterschied unter 1, so ist das analysierte Gen in der Probe im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert, liegt er über 1, so ist das Gen heraufreguliert.

## 2.4 Zellbiologische und immunologische Methoden

### 2.4.1 Western Blot-Analyse von Proteinen

Mit Hilfe der Western Blot-Analyse können Proteine durch einen spezifischen Antikörper in einem komplexen Gemisch von Proteinen nachgewiesen werden. Hierfür werden die Proteine zunächst nach ihrer relativen Größe aufgetrennt und danach auf einer Trägermembran immobilisiert. Der spezifische Nachweis erfolgt durch die Immunoblot-Analyse.

#### 2.4.1.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten mit NP40-Lysispuffer

##### NP40-Lysispuffer:

1% (w/v)	Nonidet P-40 (Roche)
150 mM	NaCl
50 mM	Tris-HCl (pH 7,4)

<u>2x</u>	<u>4x</u>	<u>Probenpuffer (nicht-reduzierend)</u>
2% (w/v)	4% (w/v)	SDS
20% (w/v)	40% (w/v)	Glycerol
120 mM	240 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
0,01% (w/v)	0,02% (w/v)	Bromphenolblau

Die Zellen wurden im Zellkulturgefäß mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber in einem Volumen von 1 ml PBS abgelöst. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 1200 x g für 5 min. Überschüssiges PBS wurde entfernt, das Zellpellet in einem angemessenen Volumen NP40-Lysispuffer aufgeschlossen und für 30 min auf Eis inkubiert. Durch eine Zentrifugation bei 16100 x g für 10 min wurden Zellkerne und unlösliche Bestandteile abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach Bradford (Kap. 2.4.1.3). Abschließend wurde das Lysat mit dem entsprechenden Volumen 2x- oder 4x-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Proben lagerten bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

### **2.4.1.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten mit SDS-Lysispuffer**

#### SDS-Lysispuffer:

2% (v/v)	SDS
62,5 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
10% (v/v)	Glycerin

Nach Waschen des Zellrasens mit PBS wurden die Zellen in einem Volumen von 1 ml PBS mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in einem geeigneten Volumen SDS-Lysispuffer aufgeschlossen. Die Degradierung der DNA erfolgte durch Ultraschallbehandlung (Ultraschallprozessor, Fa. Dr. Hirschler, Bonn). Hierzu wurde das Lysat zwei Mal zu je 30 sec bei einem Zyklus von 0,5 und einer Amplitude von 75% beschallt. Für die Proteinbestimmung mit dem D<sub>C</sub> Protein Assay Kit (BioRad, München; Kap. 2.4.1.3) wurden 10 µl des Rohlysats abgenommen. Das Lysat wurde mit 0,5 µl einer mit Bromphenolblau gesättigten, ethanolischen Lösung versetzt, anschließend 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **2.4.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten**

Erfolgte die Herstellung der Gesamtzellextrakte mit dem NP40-Lysispuffer (Kap. 2.4.1.1), wurde zur Proteinbestimmung das kommerziell erhältliche Bradford-Reagenz (BioRad) benutzt. Die zu messende Probe wurde mit 0,1 N NaOH zu einem Endvolumen von 800 µl aufgefüllt, mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt, gut durchmischt und für 15 min bei RT inkubiert. Als Leerwert diente ein Ansatz bestehend aus 800 µl 0,1 N NaOH und 200 µl Reagenz. Die Bestimmung erfolgte durch Messung der Extinktion bei 595 nm gegen den Leerwert im Photometer (Eppendorf AG), wobei jeweils eine Dreifachbestimmung vorgenommen wurde.

Enthielten die zu bestimmenden Proben Detergenzien wie z.B. SDS, wurde das D<sub>C</sub> Protein Assay Kit (BioRad) verwendet. Für jede zu messende Probe wurden 5 µl des Proteinlysats vorgelegt und 25 µl der nach Herstellerangaben angesetzten Arbeitslösung hinzugefügt. Anschließend wurde 200 µl Reagenz B zu jedem Ansatz gegeben. Für die Erstellung der Eichgraden wurden je 5 µl BSA-Lösung mit definiertem Proteingehalt von 1 µg, 2 µg und 5 µg mit 25 µl der Arbeitslösung und 200 µl der Detektionslösung vermischt. Die Proben wurden für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Extinktionsmessung bei 750 nm im Photometer (Eppendorf AG).

### 2.4.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### Laemmli-Lauf-Puffer:

192	mM	Glycin
0,1%	(w/v)	SDS
25	mM	Tris/HCl (~pH 8,3)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte durch eine denaturierende SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli 1970). Hierfür wurden zunächst die 6-12%-igen Polyacrylamidgele in Hoefer Dual Gel Caster-Gießständen (Amersham Biosciences, Freiburg) hergestellt.

#### Trenngel (5 ml):

Acrylamid	6%	8%	10%	12%
H <sub>2</sub> O	2,6 ml	2,3 ml	2,0 ml	1,6 ml
30% Acrylamid	1,0 ml	1,3 ml	1,7 ml	2,0 ml
Tris/HCl (pH 8,8)	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
10% SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
10% APS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,004 ml	0,003 ml	0,002 ml	0,002 ml

#### Sammelgel (2 ml, 5% Acrylamid):

H <sub>2</sub> O	1,4 ml
30% Acrylamid	0,33 ml
Tris/HCl (pH 6,8)	0,25 ml
10% SDS	0,02 ml
10% APS	0,02 ml
TEMED	0,002 ml

Nach vollständiger Polymerisierung wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Um die Elektrophorese durchzuführen, wurde das Gel in eine Minigelkammer Model SE250 der Firma Hoefer (Amersham Biosciences) eingespannt und die Pufferreservoirs wurden mit Laemmli-Laufpuffer gefüllt. Die zu untersuchenden Proteinproben wurden für 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis für weitere 5 min abgekühlt. Dabei werden die Proteine durch das im Probenpuffer enthaltene SDS mit einer zu ihrer Größe proportionalen Ladung versehen, was die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht im Gel ermöglicht. Direkt vor Auftragung der Proben wurde der Kamm entfernt und es wurden 25-75 µg Protein pro Tasche geladen. Als Referenz für die Proteingröße wurde der Molekulargewichtsstandard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde bei 25 mA pro Gel für ca. 1 h durchgeführt. Der Nachweis der geleelektrophoretisch aufgetrennten Proteine nach dem Semidry-Transfer erfolgte durch anschließende Immunoblot-Analyse (Kap. 2.4.1.5 und Kap. 2.4.1.6).

### 2.4.1.5 *Semidry-Transfer auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membran*

#### Transferpuffer:

48	mM	Tris/HCl
39	mM	Glycin
20%	(v/v)	Methanol
0,038%	(v/v)	SDS

Für eine nachfolgende Immunoblot-Analyse (Kap. 2.4.1.6) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine durch einen Elektrotransfer aus dem SDS-Gel auf eine Trägermembran zugänglich gemacht (Ausubel, Brent et al. 2001). Mittels der Trans-Blot SD Semidry-Blotapparatur (BioRad) wurden die Proteine entweder auf Hybond ECL Nitrozellulose- (Amersham Biosciences) oder Immobilon PVDF-Membran (Millipore) transferiert. PVDF-Membranen zeichnen sich im Vergleich zu Nitrozellulose-Membranen durch eine höhere Proteinbindungskapazität aus. Allerdings müssen sie auf Grund ihrer hydrophoben Oberflächenbeschaffenheit vor dem Transfer aktiviert werden. Dazu wurden die Membranen für 5 min in 100%-igem Methanol aktiviert, für 5 min in Wasser gewaschen und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. PVDF-Membranen wurden verwendet, wenn das zu untersuchende Protein in sehr geringer Konzentration im Lysat vorlag oder ein starkes Signal erzielt werden sollte.

Für den Transfer wurden jeweils eine Membran und vier 3MM-Whatman-Filter (VWR, Darmstadt) auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer inkubiert. Auf der Anodenseite der Blotapparatur wurde folgender Aufbau vorgenommen: auf zwei 3MM-Whatman-Filter folgte die Nitrozellulose- oder PVDF-Membran, das Gel wurde aufgelegt und mit zwei 3MM-Whatman-Filtern bedeckt. Nach Aufsetzen der Kathode erfolgte der Transfer mit  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  für 1-2 h.

### 2.4.1.6 *Immunoblot-Analyse*

#### PBS (pH 7,3):

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
4,3 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,4 mM	$\text{KH}_2\text{PO}_4$

#### TBS (pH 7,6):

137 mM	NaCl
20 mM	Tris/HCl

Je nach verwendetem Primärantikörper wurde der Immunoblot (Ausubel, Brent et al. 2001) nach zwei unterschiedlichen Protokollen durchgeführt.

Protokoll 1:Waschpuffer 1:

1x	PBS
0,05% (v/v)	Tween-20

Blockierungspuffer 1:

1x	Waschpuffer
5% (w/v)	Magermilchpulver

Protokoll 2:Waschpuffer 2:

1x	TBS
0,1% (v/v)	Tween-20

Blockierungspuffer 2:

1x	Waschpuffer
5% (w/v)	Magermilchpulver

Primärantikörperlösung 2:

1x	Waschpuffer
5% (w/v)	BSA

ECL-Lösung 1:

0,1 M	Tris-HCl pH 8,5
25 mM	Luminol (Sigma)
9 mM	p-Cumarinsäure (Sigma)

ECL-Lösung 2:

0,1 M	Tris-HCl pH 8,5
0,018% (v/v)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Vor Gebrauch wurden Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 1:1 vermischt.

Um spezifische Bindungsstellen auf einer proteinbeladenen Membran zu blockieren, wurde diese für 30-60 min bei RT in Blockierungspuffer 1 oder 2 geschwenkt. Danach wurde die Membran mit dem Primärantikörper in geeigneter Verdünnung in Blockierungspuffer 1 oder der Primärantikörperlösung 2 unter ständiger Rotation über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch anschließendes mehrmaliges Waschen mit dem Waschpuffer wurden ungebundene, überschüssige Antikörper entfernt. Der entsprechende Meerrettichperoxidase-konjugierte Sekundärantikörper wurde im Verhältnis 1:2000 in Blockierungspuffer verdünnt und für 1-2 h auf die Membran gegeben. Abschließend erfolgte wieder ein mehrmaliges Waschen der Membran. Die Peroxidase-Substrat-Reaktion zur späteren Visualisierung der Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte durch eine 5-minütige Behandlung der Membran mit der frisch bereiteten ECL-Lösung (ECL, *Enhanced Chemiluminescence*). Die Detektion durch Auflegen eines Röntgenfilms (<sup>Super</sup>RX, Fuji Medical X-ray film, Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf) erfolgte für 1 sec bis 15 min mit anschließender Entwicklung des Films im automatischen Filmentwickler (Curix 60, AGFA HealthCare, Bonn).

## 2.4.2 Untersuchung des Phosphorylierungszustandes von Proteinen

### 2.4.2.1 Herstellung phosphospezifischer Antikörper

Die Herstellung polyklonaler, phosphospezifischer Antikörper erfolgte durch Peptid-Immunisierung von Kaninchen in Zusammenarbeit mit der Firma Davids Biotechnologie (Regensburg). Zur Anreicherung der phosphospezifischen Antikörper wurde eine Positiv-Negativ-Selektion durchgeführt. Dazu wurde das Serum zunächst auf eine Affinitätsmatrix gegeben, an die das zur Immunisierung verwendete Peptid gekoppelt war. An diese Säule banden sowohl die phosphospezifischen als auch die nicht-phosphospezifischen Antikörper und die Bestandteile des Serums wurden abgetrennt. Die Antikörper wurden anschließend eluiert und auf eine zweite Säule gegeben, an deren Matrix nur der nicht-phosphospezifische Antikörper band. Der phosphospezifische Antikörper befand sich im Durchfluss und konnte für weitere Analysen eingesetzt werden. Zur zusätzlichen Herstellung monoklonaler Antikörper erfolgte eine Peptid-Immunisierung von Mäusen, deren Milzen eingefroren wurden und somit zur Entnahme von B-Zellen und der Produktion der Antikörper zur Verfügung stehen.

### 2.4.2.2 Dephosphorylierung von Proteinen mit Lambda Protein Phosphatase

#### Waschpuffer:

1x PMP-Puffer (New England BioLabs)  
1 mM  $\text{MnCl}_2$  (New England BioLabs)

#### Zusätze:

complete mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)  
Phosphatase Cocktail Set V (Calbiochem, Darmstadt)

Lambda Protein-Phosphatase Lambda PP (New England BioLabs)

Die Immunpräzipitation (IP) von Hämagglutinin (HA)-Fusionsproteinen aus dem Gesamtzellextrakt erfolgte mit Hilfe einer Agarose-Matrix, an die der murine, monoklonale Anti-HA-Antikörper (Klon HA-7) kovalent gekoppelt ist (Sigma-Aldrich). Anschließend wurden die Proteine mit der Lambda Protein-Phosphatase Lambda PP dephosphoryliert.

Zunächst wurden aus Zellen, die transient mit HA-Fusionsproteinen transfiziert wurden (Kap. 2.2.6), unter Verwendung des NP40-Lysispuffers, versetzt nur mit Protease-Inhibitor oder mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor, Gesamtzellextrakte (Kap. 2.4.1.1) hergestellt. Je 100  $\mu\text{g}$  Protein wurde als Ladekontrolle entnommen, mit 2x Probenpuffer (Kap. 2.4.1.1) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Für die IP wurde 700  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein eingesetzt. Jeweils 40  $\mu\text{l}$  des Anti-HA-Konjugats

wurde fünf Mal mit je 1 ml NP40-Lysispuffer vorsichtig resuspendiert und für 1 min bei 720 x g wieder sedimentiert. Da das Gel als 50% „slurry“ vorlag, resultierte daraus ein 20 µl Gelbett pro Ansatz, auf welches die Proteinlysate gegeben wurden. Den Ansätzen wurde entweder nur Protease-Inhibitor oder Protease- und Phosphatase-Inhibitor zugesetzt. Die IP erfolgte für 4 h bei 4°C in Protein *LowBind Tubes* (Eppendorf AG) im *End-over-End*-Schüttler (NeoLab, Heidelberg). Um ungebundene Proteine zu entfernen, wurde die Matrix anschließend, wie oben beschrieben, in fünf Wiederholungen mit Waschpuffer gewaschen. Der mit den Fusionsproteinen beladenen Matrix (20 µl) wurde 2 µl 10x PMP-Puffer, 2 µl 10 mM MnCl<sub>2</sub>-Lösung, Protease- und wo angegeben (Abb. 3-35) Phosphatase-Inhibitor zugesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 40 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Zur Dephosphorylierung wurden die Ansätze mit 1 µl Lambda PP-Phosphatase versetzt. Alle Ansätze wurden bei 30°C für 30 min inkubiert. Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von 10 µl 4x Probenpuffer (Kap. 2.4.1.1) und Erhitzen für 10 min bei 95°C. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde die Matrix für 3 min bei 16100 x g sedimentiert, das überstehende Proteinlysate komplett abgenommen und bei -20°C gelagert.

#### **2.4.2.3 Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung mit Hilfe des MEK1-Inhibitors**

Es wurden  $2,5 \times 10^6$  Zellen in einer T25-Zellkulturflasche ausgesetzt. Nach 24 h erfolgte entweder eine Dosis-abhängige Behandlung der Zellen mit dem MEK1-Inhibitor PD98059 (1-100 µM Endkonzentration) oder es wurde ein Zeitexperiment mit 100 µM Endkonzentration über einen Zeitraum von 7 h durchgeführt. Zur Auswertung wurden NP40-Gesamtzellextrakte (Kap. 2.4.1.1) unter Zugabe von Phosphatase-Inhibitoren (Phosphatase Cocktail Set V, Calbiochem) hergestellt und mit Hilfe der Western Blot-Analyse (Kap. 2.4.1) untersucht.

#### **2.4.2.4 Bestimmung der Halbwertszeit eines Proteins**

Zur Untersuchung der Stabilität von phosphorylierten und unphosphorylierten Proteinen wurde die Halbwertszeit der Proteine mit Hilfe des Antibiotikums Cycloheximid, das die Proteinbiosynthese in Eukaryonten unterbindet, bestimmt. Setzt man Cycloheximid dem Zellkulturmedium zu, lässt sich der Abbau der bei Zugabe bereits vorhandenen Proteine über ein Zeitexperiment nachverfolgen.

Es wurden  $2,5 \times 10^6$  Zellen in einer T25-Zellkulturflasche ausgesetzt und nach 24 h wurde das Zellkulturmedium mit Cycloheximid zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml versetzt. Nach verschiedenen Zeitpunkten erfolgte die Herstellung von NP40-Gesamtzellextrakten (Kap. 2.4.1.1) und die Auswertung wurde mit Hilfe der Western Blot-Analyse (Kap. 2.4.1) vorgenommen.

### 2.4.3 Chromatin-Immunopräzipitations-Assay (ChIP)

Bei der Chromatin-Immunpräzipitation handelt es sich um eine *in vivo*-Methode, bei der eine reversible Bindung zwischen DNA-bindenden Proteinen, z.B. Transkriptionsfaktoren, und bestimmten Abschnitten der endogenen DNA, z.B. der Promotorregion, mit Hilfe eines Antikörpers und nachfolgender PCR-Analyse sichtbar gemacht wird.

Der ChIP-Assay wurde mit Hilfe des ChIP-IT™ Express-Kits (Active Motif, Rixensart, Belgien) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 2.4.3.1 Herstellung der DNA-Abschnitte

##### Fixierlösung:

0,54 ml 37% Formaldehyd/10% MeOH (Merck)  
20 ml Serumfreies Zellkulturmedium (PAA)

##### Glycin Stopp-Fix-Lösung:

1 ml 10x Glycinpuffer  
1 ml 10x PBS  
8 ml H<sub>2</sub>O

Als Ausgangsmaterial dienen zwei 70-80%-konfluente T75-Zellkulturflaschen. Zur Fixierung der Zellen mit Formaldehyd-Lösung wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen, durch 10 ml Fixierlösung ersetzt und für 10 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Die Fixierreaktion wurde durch Zugabe von je 5 ml Glycin Stopp-Fix-Lösung beendet. Es folgte ein erneuter Waschschriff mit 5 ml PBS. Dann wurden jeweils 2,5 ml eiskaltes PBS, versetzt mit 500 nM PMSF, auf die Zellen gegeben. Die Ernte wurde mit einem Zellschaber durchgeführt und die Zellsuspension in ein 10 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 10 min bei 720 x g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 1 ml Lysispuffer, versetzt mit 5 µl PMSF und 5 µl Protease Inhibitor Cocktail (PIC), für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einen Dounce-Homogenisator (Wheaton, Millville, USA) überführt und durch eine 10-malige Auf- und Abbewegung des Stößels aufgeschlossen. Die Suspension wurde für 10 min bei 2400 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellkerne in 350 µl Shearingpuffer, versetzt mit 1,75 µl PMSF und 1,75 µl PIC, aufgenommen. Das Zerkleinern der DNA in 200-1500 bp-Stücke erfolgte auf Eis mit Hilfe eines Ultraschallprozessor (Fa. Dr. Hirschler). Hierzu wurde das Lysat insgesamt 4 Mal für je 30 sec bei einem Zyklus von 0,5 und einer Amplitude von 50% beschallt. Die Zellkerntrümmer wurden für 10 min bei 25000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das gescherte Chromatin wurde in ein Protein *LowBind Tube* (Eppendorf AG) überführt und entweder direkt für die nachfolgende Immunpräzipitation eingesetzt oder in Aliquots bei -80°C gelagert.

### 2.4.3.2 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation (IP) wurde die benötigte Menge Chromatin auf Eis aufgetaut. Die IPs wurden auf Eis angesetzt und enthielten 20 µl Protein G *Magnetic Beads*, 10 µl CHIP-Puffer I, 30 µl Chromatin, 1 µl PIC, 2 µg Antikörper und H<sub>2</sub>O aufgefüllt zu einem Endvolumen von 100 µl. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht im *End-over-End*-Schüttler (NeoLab). Am nächsten Tag wurden die Protein G *Magnetic Beads* mit Hilfe eines magnetischen Reaktionsgefäßständers sedimentiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Die Beads wurden ein Mal mit CHIP-Puffer I und zwei Mal mit CHIP-Puffer II, jeweils mit Hilfe des magnetischen Reaktionsgefäßständers, gewaschen. Danach wurden die Beads in 50 µl Elutionspuffer AM2 resuspendiert und 15 min bei RT im *End-over-End*-Schüttler (neoLab) inkubiert. Es wurde 50 µl *Reverse Cross-linking*-Puffer hinzugegeben und die *Beads* mit Hilfe des magnetischen Reaktionsgefäßständers sedimentiert. Der Überstand wurde in ein Protein *LowBind Tube* (Eppendorf AG) überführt. 10 µl Chromatin (*Input*-DNA) wurde auf Eis aufgetaut und mit 88 µl CHIP-Puffer II sowie 2 µl 5 M NaCl versetzt. Beide Proben wurden anschließend für 10 min bei 95°C erhitzt, wieder auf RT abgekühlt und mit 2 µl Proteinase K versetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C. Nach Abkühlung auf RT wurde den Proben 2 µl Proteinase K Stopp-Lösung zugegeben. Das Chromatin wurde entweder direkt für die PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

### 2.4.3.3 Analyse über PCR

Für die PCR-Analyse wurde die Taq DNA-Polymerase (Qiagen) eingesetzt. Die 25 µl-Ansätze wurden auf Eis pipettiert und enthielten 5 µl Chromatin, wobei die *Input*-DNA 1:10 verdünnt vorlag. Für die Kontrollamplifikation mit dem im CHIP-IT<sup>TM</sup> Express-Kit (Active Motif) enthaltenen GAPDH-Primermix enthielten die Ansätze 2,5 µl 10x Reaktionspuffer, 0,5 µl dNTPs (je 5 mM, Promega), 4 µl Primermix, 12,8 µl H<sub>2</sub>O und 0,2 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl). Für die genspezifischen PCR-Analysen enthielten die Ansätze 2,5 µl 10x Reaktionspuffer, 0,25 µl dNTPs (je 10 mM, Promega), je 1 µl Primer (5 pmol/µl), 15,05 µl H<sub>2</sub>O und 0,2 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl). Die Reaktion erfolgte im Flexigene-Thermocycler (Techne) wie folgt:

Initiale Denaturierung	3 min	94°C	} 36 Zyklen
Denaturierung	20 sec	94°C	
Primer-Annealing	30 sec	59 bzw. 63°C	
Primer-Extension	1 min/kb	72°C	
Auffüllreaktion	10 min	72°C	

Die DNA wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht (Kap. 2.3.9) oder bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

#### 2.4.4 *Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)*

Der auch als *Band-Shift-Assay* bezeichnete EMSA dient dem spezifischen Nachweis der Bindung von Proteinen an DNA. Hierbei wird ein Zellkernextrakt, welches das zu analysierende Protein enthält, und ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment, welches die zu analysierende spezifische DNA-Sequenz abdeckt, in einer Bindungsreaktion inkubiert. Das Reaktionsgemisch wird anschließend mit Hilfe einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Bei einer spezifischen Bindung beobachtet man hier eine Verschiebung der markierten Bande in den höhermolekularen Bereich (*Band-Shift*). Zudem ist ein *Supershift* des Komplexes durch Zugabe eines Antikörpers in das Reaktionsgemisch möglich.

##### 2.4.4.1 *Herstellung von Zellkern-Extrakten*

###### Hypotoner Lysispuffer:

10 mM	HEPES/KOH (pH 7,9 bei 4°C)
1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	KCL

###### Hypertoner Lysispuffer:

20 mM	HEPES/KOH (pH 7,9 bei 4°C)
25 %	Glycerol
420 mM	NaCl
1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,2 mM	EDTA

Den beiden Puffern wurde frisch vor Gebrauch Protease-Inhibitor zugesetzt (complete mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche).

Es wurden kultivierte, subkonfluente Zellen für die Herstellung der Zellkernextrakte verwendet. Die Zellen wurden zwei Mal mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes gelöst.  $4 \times 10^6$  Zellen wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 500 x g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde quantitativ entfernt. Die Zellen wurden in 400 µl hypotonen Lysispuffer durch vorsichtiges Pipettieren resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nun erfolgte die Zugabe von 25 µl einer 10%-igen (v/v) NP40-Lösung und die Proben wurden für 10 sec bei maximaler Umdrehung auf dem Vortexer durchmischt. Es folgte eine Zentrifugation für 1 min bei 8000 x g und 4°C. Der so erhaltene Überstand stellt die zytosolische Fraktion dar und wurde verworfen. Die sedimentierten Zellkerne

wurden in 20-40 µl hypertonen Lysispuffer resuspendiert und für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerntrümmer für 15 min bei 10000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand stellt das Kernextrakt dar. Es wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Methode (Kap. 2.4.1.3) bestimmt, die Extrakte wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **2.4.4.2 Gekoppelte *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion**

Zur *in vitro*-Synthese von Proteinen wurde das TnT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) verwendet. Für die Reaktion wurden 25 µl TnT® *Rabbit* Retikulozyten-Lysat, 2 µl Reaktionspuffer, 1 µl T7-RNA-Polymerase, 0,5 µl Aminosäuremix ohne Leucin, 0,5 µl Aminosäuremix ohne Methionin, 1 µg Plasmid-DNA sowie 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (Fermentas) eingesetzt und auf ein Volumen von 50 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Nachdem der Ansatz für 90 min bei 30°C inkubiert wurde, erfolgte die Zugabe von 2 µl Protease-Inhibitor (complete mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) und die Proteine wurden direkt für die Bindungsreaktion (Kap. 2.4.4.5) eingesetzt.

#### **2.4.4.3 Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden**

Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 20 pmol/µl in Oligonukleotid-Lagerungspuffer (10 mM Tris/HCl pH 7, 1 mM EDTA) resuspendiert. In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden 25,6 µl H<sub>2</sub>O vorgelegt und jeweils 4 µl der Oligonukleotidlösungen hinzugefügt. Es erfolgte die Zugabe von 1,6 µl 0,5 M NaCl, 4,0 µl 100 mM Tris/HCl pH 7,5 und 0,8 µl 50 mM EDTA pH 8,0. Die Reaktionslösung wurde gemischt und für 2 min in ein 95°C warmes Wasserbad gestellt und anschließend in ein auf 70°C erwärmtes Wasserbad überführt. Das Wasserbad wurde ausgeschaltet und mitsamt der Reaktionslösung innerhalb von 2-3 h auf RT abgekühlt. Danach wurde die Oligonukleotidlösung für 10 min auf Eis gestellt, für die weitere Verwendung aliquotiert und bei -20°C gelagert.

#### **2.4.4.4 Herstellung von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-markierten Oligonukleotiden**

Es wurden 2 µl der komplementären Oligonukleotide in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Auf Eis erfolgte die Zugabe von 2 µl 10x T4 Polynukleotid-Kinase-Reaktionspuffer (New England BioLabs), 11 µl H<sub>2</sub>O, 3 µl 5'-[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3000 Ci/mmol) und 2 µl T4 Polynukleotid-Kinase (10000 U/ml, New England BioLabs). Die Reaktionslösung wurde 60 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Kinase wurde anschließend 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) hinzugefügt. Zum Entfernen nicht-eingebauter Nukleotide wurden Probe Quant G-50 Mikrosäulen (GE-Healthcare, Freiburg) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Elutionsvolumen betrug 50 µl. 1 µl der erhaltenen Lösung wurde in 3 ml

Szintillations-Lösung gegeben und die Cerenkow-Counts mit Hilfe des „easy-count“-Programms im Szintillations-Zähler (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) bestimmt.

#### 2.4.4.5 Bindungsreaktion

##### 3x Bindungspuffer:

60 mM	HEPES/KOH (pH 7,9 bei 4°C)
180 mM	KCl
3 mM	DTT
3 mM	EDTA
36 % (v/v)	Glycerol

Jede Bindungsreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 15 µl angesetzt und auf Eis pipettiert. Es wurden 5 µl 3x Bindungspuffer vorgelegt. Zur Blockierung unspezifischer DNA-Bindung wurde zu jeder Probe poly(dIdC)-Lösung (Endkonzentration 50 ng/µl) gegeben. Je nach Zusammensetzung der Bindungsreaktion erfolgte nun die Zugabe von 5 µg Zellkernextrakt oder 5 µl *in vitro*-translatiertem Protein, 1 µl nicht-markierter Oligonukleotidlösung (2 pmol/µl), 1 µl markierter Oligonukleotidlösung (50000 cpm/µl), 1 µg Antikörper (für den *Supershift*) und wurde mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 30 min auf Eis.

#### 2.4.4.6 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

##### 10x TBE-Puffer:

890 mM	Tris
890 mM	Borsäure
20 mM	EDTA

Ein 4%-iges Polyacrylamid-Gel wurde am Tag vor der Gelelektrophorese hergestellt. Es wurden 13,33 ml Protogel-Lösung (30%, National Diagnostics, Atlanta, USA), 5 ml 10x TBE-Puffer, 81,67 ml H<sub>2</sub>O, 600 µl 10%-iges APS und 100 µl TEMED vermischt, in eine vertikale Gelelektrophorese-Apparatur (20 cm x 20 cm) gegossen und der Kamm eingesteckt. Das Gel wurde bei 4°C über Nacht gelagert. Vor dem Auftragen der Proben erfolgte eine Äquilibration des Gels durch einen Vorlauf. Hierfür wurde zunächst der Kamm aus dem Gel gezogen, die Taschen mit 0,5x TBE-Puffer gespült und 10 µl 1x DNA-Ladepuffer (Kap. 2.3.9) in eine Tasche aufgetragen. Für die Elektrophorese wurde 0,5x TBE-Puffer als Laufpuffer verwendet. Der Vorlauf erfolgte für 45 min bei 200 V. Die elektrophoretische Auftrennung der Bindungsreaktionen erfolgte für 2 h bei 250 V. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel für 2 h auf dem Geltrockner (BioRad) unter Vakuum bei 80°C getrocknet. Das getrocknete Gel wurde in eine Röntgenfilmkassette überführt. Die Exposition des Röntgenfilms (Fujifilm Europe GmbH) erfolgte bei -80°C.

### 2.4.5 Immunhistochemische Analysen

Um die Proteinexpression im Gewebe zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Für diese Analysen wurden 55 Tumorproben (Institut für Pathologie, UKE Hamburg) und ein TMA mit 2271 Gewebeschnitten von Normalgewebe und Primärtumoren der Brust verwendet (Simon and Sauter 2002). Die Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden zunächst deparaffiniert und anschließend im Dampfdruckinkubator (BioGenex, San Ramon, USA) für 5 min bei 125°C in Zitrat-Puffer (BioGenex) inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschrte für jeweils 3 min mit 0,05% Tween-20 in TBS (TBS-T). Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde durch eine Behandlung mit jeweils 100 µl DAKO REAL™ (DAKO, Glostrup) nach Herstellerangaben blockiert. Danach wurden die Schnitte drei Mal für je 3 min mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem 1:500-verdünnten primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Im Anschluss daran wurden die Schnitte erneut drei Mal für je 3 min mit TBS-T gewaschen. Es folgten eine Inkubation mit jeweils 150 µl DAKO REAL™ Envision™/HRP (DAKO) für 15 min bei RT und erneut drei Waschschrte mit TBS-T. Zum Ablauf der Detektionsreaktion wurden die Schnitte für 10 min mit DAB (3,3'-Diaminobenzidine) inkubiert. Die Gegenfärbung erfolgte für 2 sec mit Mayers-Hemalaun-Lösung. Abschließend wurden die Präparate für 2 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen und eingedeckelt.

### 2.5 Bioinformatische Analysen

Potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im proximalen Promotorbereich (1 kb vor dem Transkriptionsstartpunkt, TSS) von GRHL2 wurden von der UCSC (University of California, genome.ucsc.edu) aus der Datenbank „Transcription factor ChIP-seq“ heruntergeladen. Diese Daten gehören zum ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements)-Projekt (ENCODE Project Consortium 2011). Der DNA-Abschnitt für ZEB1 (chr:8 102504446-102504669) wurde anschließend auf exakte ZEB1-Bindungsmotive untersucht (Spaderna, Schmalhofer et al. 2006).

Das Programm MUSCLE (v3.8.31) (Edgar 2004) wurde verwendet, um einen Abgleich der humanen potentiellen Bindungsstellen für ZEB1 mit den orthologen Genen aus Schimpanse, Maus, Rind und Huhn vorzunehmen.

### 2.6 Statistik

Für die Auswertungen aller erfassten Daten wurde das Programm SPSS für Windows Version 18.0 verwendet (SPSS Inc., Chicago, USA).

Die Korrelation zwischen der GRHL2-Expression und den klinisch-pathologischen Parametern in den immunhistologischen Analysen wurde mit dem *Chi-square*- oder *Fisher's exact*-Test analysiert. P-Werte kleiner als 0,05 wurden dabei als statistisch signifikant angenommen.

Die Daten der funktionellen Analysen stellen den Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten dar, wobei alle Experimente mindestens drei Mal durchgeführt wurden. Die Fehlerraten sind als Standardabweichung angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem *Mann-Whitney-U*-Test analysiert und ein P-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

### 3 Ergebnisse

Grundlage dieser Arbeit bildeten bisher unveröffentlichte Studien der eigenen Arbeitsgruppe, die darauf hindeuteten, dass der Transkriptionsfaktor GRHL2 onkogene Eigenschaften besitzt und somit eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielen könnte. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, eine mögliche pathophysiologische Relevanz des *GRHL2*-Onkogens für das humane Mammakarzinom durch funktionelle Analysen sowie deskriptive Studien zur Expression von GRHL2 in Brusttumoren zu untersuchen.

#### 3.1 Funktionelle Analyse des Transkriptionsfaktors GRHL2 in humanen Mammakarzinomzelllinien

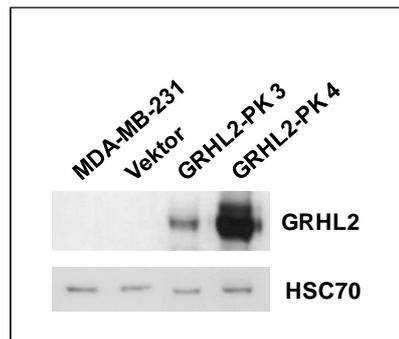
Eine wichtige Voraussetzung für die Charakterisierung des *GRHL2*-Gens beim humanen Mammakarzinom stellte die Generierung geeigneter Modellsysteme dar. Da GRHL2 in den zehn untersuchten Mammakarzinomzelllinien heterogen exprimiert ist (Kap. 1.3.3), standen zwei komplementäre Ansätze zur Verfügung: die Überexpression des Proteins in einer GRHL2-defizienten Zelllinie oder die Herunterregulation (im Folgenden als *Knockdown* bezeichnet) der Genexpression in einer GRHL2-exprimierenden Zelllinie.

##### 3.1.1 Etablierung und Charakterisierung von Mammakarzinomzelllinien mit stabiler GRHL2-Überexpression

Für die Generierung eines experimentellen Systems zur Überexpression konnten die humanen Mammakarzinomzelllinien BT-549 und MDA-MB-231 genutzt werden. Beide Zelllinien sind sowohl negativ für GRHL2 als auch für die funktionell ähnlichen *grainyhead-like*-Transkriptionsfaktoren GRHL1 und GRHL3 (Werner 2009), mit denen GRHL2 Heterodimere bilden kann (Ting, Wilanowski et al. 2003). Die Überexpression von *GRHL2* ermöglicht es somit, den ausschließlichen Effekt dieses Gens auf das Zellverhalten und die Expression von Zielgenen zu untersuchen.

Um ein GRHL2-Expressionsplasmid herzustellen, wurde das in Kap. 3.4.1 generierte pBSKII/GRHL2-Expressionsplasmid als Matrize verwendet. Die cDNA wurde mit Hilfe der Oligonukleotide GRHL2-13 und GRHL2-12 (Tab. 8-5) amplifiziert und in den retroviralen Expressionsvektor pMXs-IP kloniert (pMXs-IP/GRHL2). Für die stabile Expression des Transgens wurden  $\psi$ NX-ampho-Verpackungszellen transfiziert und die Zielzelllinien BT-549 und MDA-MB-231 mit den retroviralen Überständen infiziert. Mit Puromycinhaltigem Kulturmedium (1  $\mu$ g/ml) selektionierte Zellen wurden vereint, um klonale Effekte in den folgenden funktionellen Analysen auszuschließen.

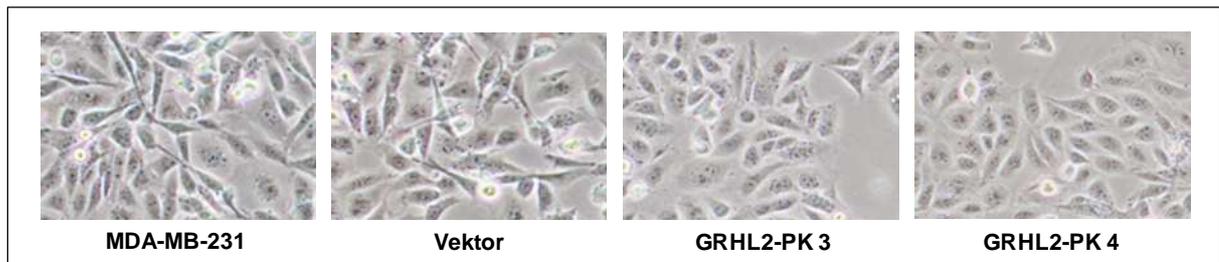
Das generierte und für alle weiteren Studien eingesetzte MDA-MB-231-Modellsystem bestand aus insgesamt vier Zelllinien: eine Zelllinie mit eher schwacher (GRHL2-PK 3) und eine Zelllinie mit sehr starker GRHL2-Expression (GRHL2-PK 4) sowie parentale und Vektor-transfizierte Zellen als Kontrollen. Die stabile Expression des Transgens wurde unter Verwendung des in der eigenen Arbeitsgruppe generierten polyklonalen Antikörpers GRHL2-P1 (Tab. 8-10) mittels Western Blot-Analyse überprüft (Abb. 3-1).



**Abb. 3-1: MDA-MB-231-Zellen mit stabiler GRHL2-Proteinexpression.**

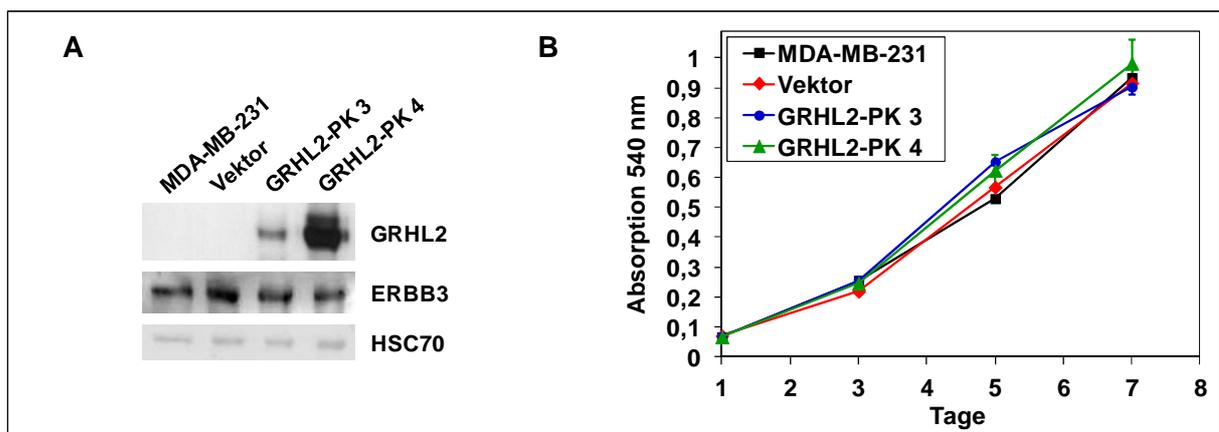
Gezeigt ist eine Western Blot-Analyse der GRHL2-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu den parentalen und den Vektor-transfizierten Zellen. Die Detektion des Proteins bei ca. 70 kDa erfolgte mit dem GRHL2-P1-Antikörper. Um zu zeigen, dass identische Proteinmengen geladen wurden, wurde eine Western Blot-Analyse für das HSC70-Protein durchgeführt.

Morphologische Veränderungen sind ein erstes Indiz für weiterreichende Veränderungen in Tumorzellen. Um die Zellmorphologie des vorliegenden Modellsystems bewerten zu können, wurden alle Zelllinien bei annähernd gleicher Konfluenz im Lichtmikroskop begutachtet und bei 100-facher Vergrößerung fotografiert. Wie in Abb. 3-2 zu sehen, wick die Morphologie der GRHL2-überexprimierenden Zellen stark von der der Kontrollzelllinien ab. Die Aufnahmen zeigen, dass GRHL2-transfizierte Zellen ein deutlich geordneteres Wachstum als die parentale und die Vektor-transfizierte Zelllinie aufwiesen und in der Lage waren, stärkere Zell-Zell-Kontakte aufzubauen. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen, die sich durch eine spindelförmige, mesenchymale Morphologie auszeichneten, besaßen die GRHL2-überexprimierenden Zellen eine eher runde Zellmorphologie.



**Abb. 3-2: Zellmorphologie des MDA-MB-231-Überexpressionssystems.**  
Gezeigt sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der parentalen, Vektor-transfizierten und GRHL2-überexprimierenden MDA-MB-231-Zelllinien im Vergleich (100-fache Vergrößerung).

Die im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten Experimente ergaben, dass GRHL2 ein neues Onkogen darstellt. Neben vielen anderen Eigenschaften ist eine erhöhte Proliferationsrate charakteristisch für Zelllinien, die mit einem Onkogen transfiziert wurden. Deshalb sollte im nächsten Schritt mittels MTT-Assay festgestellt werden, ob die GRHL2-exprimierenden MDA-MB-231-Zellen eine erhöhte Teilungsrate aufweisen. In Abb. 3-3-B erkennt man, dass GRHL2 in diesem experimentellen System keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen ausübte.



**Abb. 3-3: Analyse der ERBB3-Expression und des Proliferationsverhaltens von MDA-MB-231-Zellen mit stabiler GRHL2-Expression.**

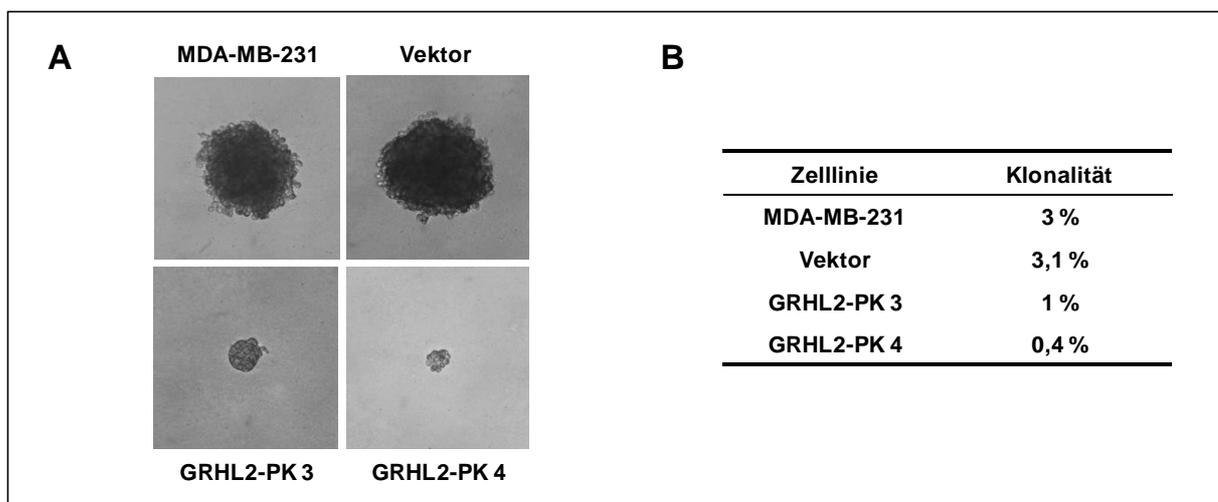
(A) Gezeigt ist die Western Blot-Analyse zur ERBB3-Expression in GRHL2-transfizierten MDA-MB-231-Zelllinien im Vergleich zu den parentalen und den Vektor-transfizierten Zellen. Das ERBB3-Protein wurde mit Hilfe des ERBB3-Antikörpers detektiert. Als Kontrolle identischer Ladung diente die HSC70-Proteinexpression. (B) Das Proliferationsverhalten von parentalen, Vektor-transfizierten und GRHL2-überexprimierenden MDA-MB-231-Zellen wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen mittels MTT-Assay analysiert.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden (Werner 2009), dass *ErbB3* ein positiv reguliertes Zielgen von GRHL2 darstellt. Daher sollte überprüft werden, ob sich diese Aussage direkt auf humane Mammakarzinomzelllinien übertragen lässt. Durch eine Western Blot-Analyse mit einem gegen das ERBB3-Protein gerichteten Antikörper an dem vorliegenden Zellsystem zeigte sich, dass die GRHL2-

überexprimierenden MDA-MB-231-Zellen keine erhöhte ERBB3-Expression gegenüber den Kontrollzelllinien aufwiesen (Abb. 3-3-A).

Im Gegensatz zu Normalzellen besitzen Onkogen-transformierte Zellen die Fähigkeit zum verankerungsunabhängigen Wachstum. Um den Einfluss von GRHL2 hierauf untersuchen zu können, wurden die Zellen im sogenannten Weich-Agar-Assay getestet. In Abb. 3-4-A ist zu sehen, dass beide Zelllinien mit ektoxischer GRHL2-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich kleinere Zellklone ausbildeten. Zudem zeigte sich ein Gen-Dosis-abhängiger Effekt, da die Zelllinie GRHL2-PK 4 mit sehr starker GRHL2-Expression kaum noch in der Lage war, über das Einzelzellstadium hinaus zu wachsen.

Die Überexpression des *GRHL2*-Gens wirkte sich ebenfalls auf die Klonalität der Zelllinien aus. Bei den Kontrollzelllinien war ungefähr jede 30-igste Zelle in der Lage einen Zellklon auszubilden. Bei schwacher GRHL2-Überexpression reduzierte sich diese Fähigkeit jedoch auf ein Drittel und bei starker GRHL2-Expression sank sie sogar auf unter ein Sechstel (Abb. 3-4-B).

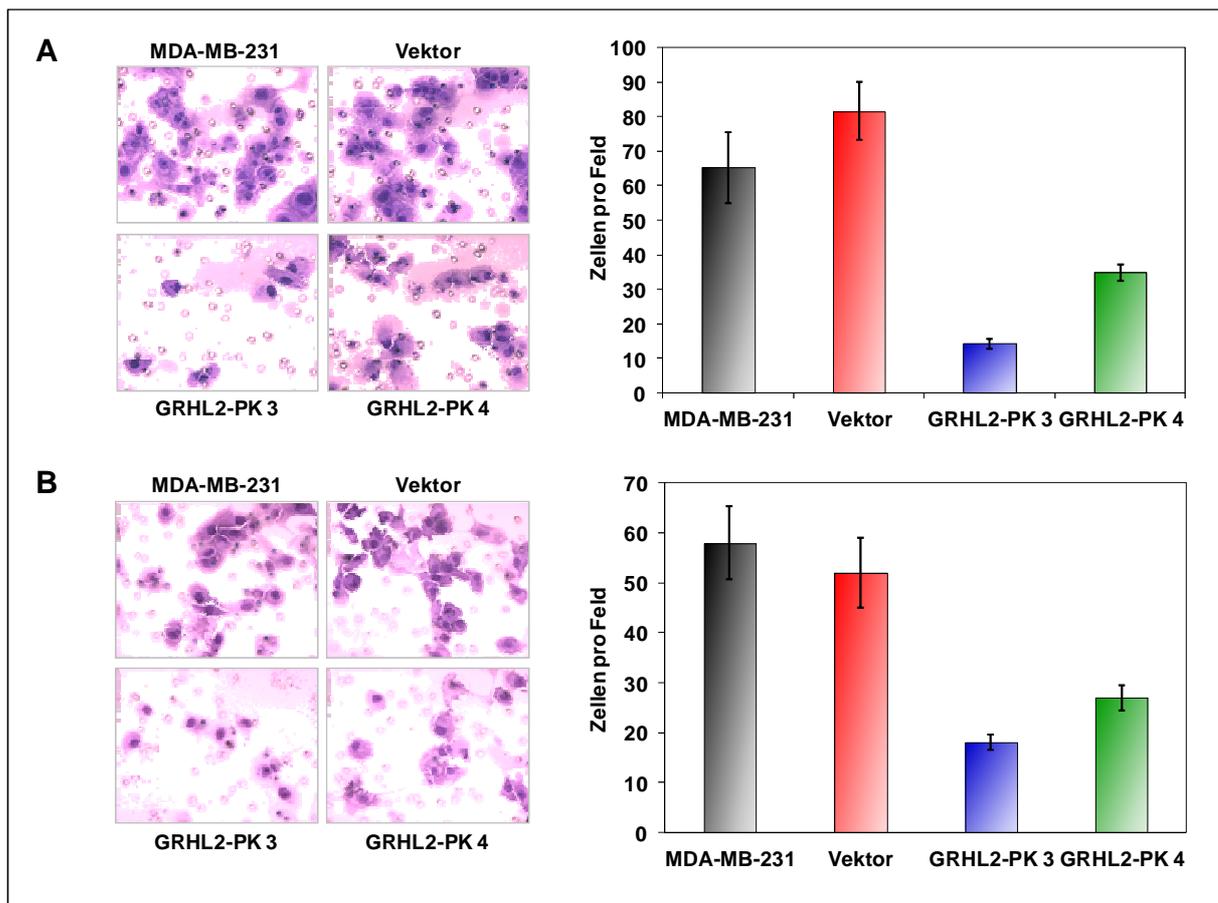


**Abb. 3-4: Bestimmung des verankerungsunabhängigen Wachstums der Zelllinien mittels Weich-Agar-Assay.**

(A) Gezeigt sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen eines einzelnen Klons der Kontrollzelllinien und den GRHL2-transfizierten Zellen (100-fache Vergrößerung). (B) Die Klonalität der GRHL2-exprimierenden Zelllinien wurde im Vergleich zu den parentalen und den Vektor-transfizierten Zellen bestimmt.

Tumorzellen sind in der Lage, in das benachbarte, gesunde Gewebe einzuwandern. Um dieses charakteristische Verhalten *in vitro* untersuchen zu können, wurden Boyden-Kammer-Assays durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Zelllinie GRHL2-PK 3 eine vier- bis fünffach geringere Migrationsfähigkeit als die Kontrollzellen aufwies. Auffällig war, dass die sehr starke GRHL2-Überexpression nur zu einer um den Faktor zwei verringerten Migration im Vergleich zu den

Kontrollen führte und somit in diesem Fall keine Gen-Dosis abhängigen Veränderungen beobachtet werden konnten (Abb. 3-5-A). Das gleiche Bild spiegelte sich bei der Untersuchung der Invasionsfähigkeit wider. Auch hier trat kein Gen-Dosis-Effekt auf. Die GRHL2-PK 4-Zelllinie invadierte ca. zwei Mal weniger als die Kontrollen, die GRHL2-PK 3-Zellen dagegen ungefähr drei Mal weniger (Abb. 3-5-B). Insgesamt wiesen die GRHL2-überexprimierenden Zelllinien jedoch eine signifikant niedrigere Migrations- und Invasionsfähigkeit auf.

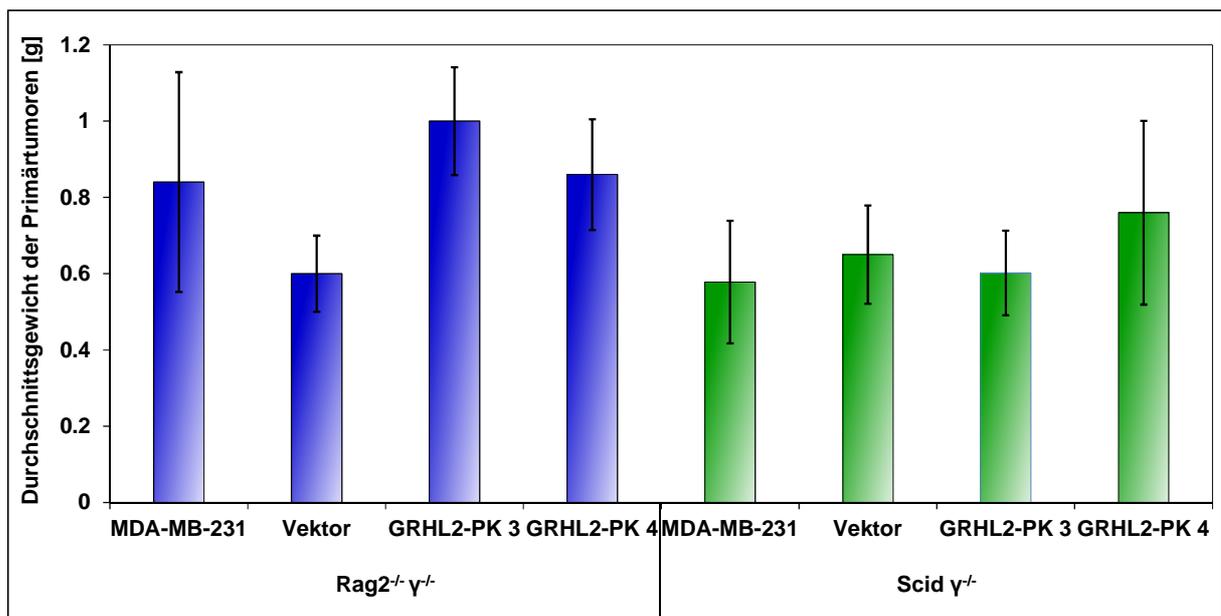


**Abb. 3-5: Untersuchung der Migrations- und Invasionsfähigkeit von MDA-MB-231-Zellen mit stabiler GRHL2-Expression.**

(A) Es sind migrierte Zellen der GRHL2-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu den parentalen und den Vektor-transfizierten MDA-MB-231-Zellen bei 200-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop abgebildet (links). Die Zellen auf der Membran wurden gefärbt und quantifiziert (rechts). (B) Zu sehen sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen des Invasionsverhaltens aller Zelllinien bei 200-facher Vergrößerung (links). Die invadierten GRHL2-exprimierenden Zellen im Vergleich zur parentalen und der Vektor-transfizierten Zelllinie wurden quantifiziert (rechts).

Die hier verwendeten MDA-MB-231-Zellen wurden zudem als Modellsystem für funktionelle Analysen ausgewählt, da sie ein Standardmodell für das metastasierende Mammakarzinom *in vivo* darstellen (Price, Polyzos et al. 1990). In einem Vorexperiment wurde getestet, ob die GRHL2-Überexpression einen Einfluss auf das Primärtumorwachstum und die Metastasierung der

MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen hat. Da der gewählte Mausstamm einen Einfluss auf das Verhalten der Zellen *in vivo* haben könnte, wurden zwei verschiedene Stämme mit unterschiedlichem Genotyp, Rag2<sup>-/-</sup> γ<sup>-/-</sup> und SCID γ<sup>-/-</sup>, als Rezipienten ausgewählt. Alle vier Zelllinien wurden zunächst mit dem LeGO-T2-Plasmid (Weber, Mock et al. 2010) fluoreszenzmarkiert und in je fünf Mäuse beider Stämme orthotop implantiert (Kap. 2.2.14). Der Vorversuch zeigte, dass es, unabhängig vom verwendeten Mausstamm, nach ca. 3 Monaten keinen signifikanten Unterschied in der Größe der Primärtumoren gab (Abb. 3-6).

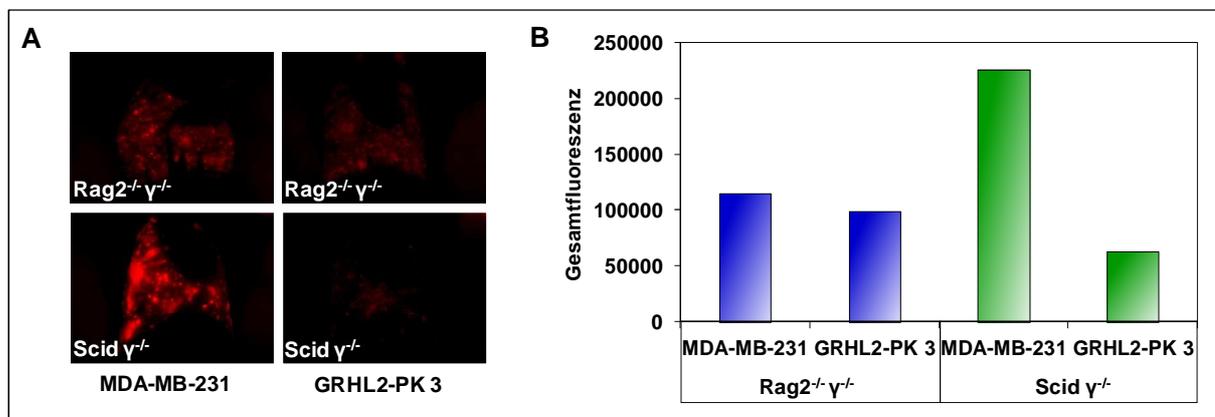


**Abb. 3-6: Vergleich der Primärtumorgröße in immundefizienten Mäusen.**

Es wurde die Größe der Primärtumoren in den Rag2<sup>-/-</sup> γ<sup>-/-</sup>- und den SCID γ<sup>-/-</sup>-Mäusen der GRHL2-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu den parentalen und Vektor-transfizierten Zellen untersucht. Es ist jeweils der Mittelwert der Primärtumorgröße von fünf Mäusen mit Standardabweichung dargestellt.

Um zu untersuchen, wie sich die GRHL2-Expression auf die Metastasierung der MDA-MB-231-Zellen auswirkt, wurde die Metastasenbildung in der Lunge durch Anregung der Fluoreszenz begutachtet. Dabei zeigte sich, dass die parentale Zelllinie in den SCID γ<sup>-/-</sup>-Mäusen eine deutlich stärkere Gesamtfluoreszenz aufwies, und damit stärker metastasierte, als in den Rag2<sup>-/-</sup> γ<sup>-/-</sup>-Tieren (Abb. 3-7-A und -B). Da die Zelllinie GRHL2-PK 3 bereits *in vitro* ein geringeres Potential zur Migration und Invasion hatte, wurde nur ein Vergleich der parentalen Zellen mit GRHL2-PK 3 vorgenommen. Bei der Auswertung der Gesamtfluoreszenz waren bei den Rag2<sup>-/-</sup> γ<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Unterschiede festzustellen (Abb. 3-7-B). Die Auswertung der Fluoreszenzintensität der einzelnen Metastasen zeigte aber, dass diese bei den Mäusen mit transplantierten GRHL2-PK 3-Zellen ca. um den Faktor zwei höher war als in den Tieren mit parentalen Zellen (Abb. 3-7-A). Die SCID γ<sup>-/-</sup>-Mäuse mit

transplantierten GRHL2-PK 3-Zellen bildeten deutlich weniger Metastasen in der Lunge als die Mäuse, in die die parentale Zelllinie implantiert wurde (Abb. 3-7-A und -B).



**Abb. 3-7: Analyse der Lungenmetastasen in den Rag2<sup>-/-</sup> γ<sup>-/-</sup>- und den SCID γ<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

(A) Gezeigt ist eine beispielhafte Fluoreszenzaufnahme der metastasierten parentalen MDA-MB-231-Zellen im Vergleich zur GRHL-PK 3-Zelllinie in die Lunge von Rag2<sup>-/-</sup> γ<sup>-/-</sup>- (oben) und SCID γ<sup>-/-</sup>-Mäusen (unten). (B) Quantifizierung der Metastasierung in die Lunge über die Gesamtfluoreszenz mittels „Image J“. Es ist jeweils der Mittelwert der Gesamtfluoreszenz von 5 Mauslungen dargestellt.

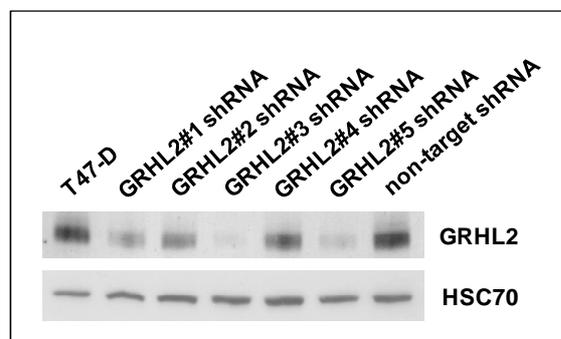
Trotz des vorläufigen Charakters der tierexperimentellen Untersuchungen kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse in den SCID γ<sup>-/-</sup>-Mäusen auf eine Funktion von GRHL2 als Metastasierungssuppressor hindeuteten, die in Einklang mit den Ergebnissen der *in vitro*-Studien standen.

Bei den funktionellen Studien am BT-549-Modellsystem mit stabiler GRHL2-Überexpression wurden ähnliche Beobachtungen wie im MDA-MB-231-Zellsystem gemacht und sollen daher nur kurz erläutert werden. Bei der morphologischen Begutachtung zeigte sich, dass der mesenchymale Charakter der GRHL2-exprimierenden Zellen im Vergleich zur parentalen und der Vektor-transfizierten Zelllinie verloren ging. Auch konnte mittels MTT-Assay kein Einfluss von GRHL2 auf die Proliferationsrate der Zellen beobachtet werden. Auffallend war der dramatische 35-fache Anstieg der ERBB3-Expression in den GRHL2-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Die BT-549-Zellen sind demnach das erste Zellsystem, für das gezeigt werden konnte, dass *ERBB3* auch in humanen Mammakarzinomzelllinien ein wichtiges Zielgen von GRHL2 darstellt.

Zusammenfassend lassen die in den Überexpressionssystemen erzielten Resultate den Schluss zu, dass GRHL2 einen möglichen Suppressor der EMT darstellt, der zudem den aus klinischer und tumorbiologischer Sicht bedeutsamen Rezeptor ERBB3 reguliert. Ein Einfluss auf die Proliferation konnte in diesen Modellsystemen nicht festgestellt werden.

### 3.1.2 Veränderungen in Mammakarzinomzelllinien mit *Knockdown* der *GRHL2*-Genexpression

Neben der Überexpression eines Gens gibt es die Möglichkeit, seine Funktion mittels Herunterregulation der Genexpression zu untersuchen. Für die Etablierung dieser Modellsysteme mit spezifischem *Knockdown* der GRHL2-Expression stand eine Reihe von Zelllinien mit unterschiedlich starker Genexpression zur Verfügung (Kap. 1.3.3). Zur Identifizierung von shRNAs, die eine besonders starke Herunterregulation der Expression bewirken, wurden für die initialen Experimente T47-D-Zellen mit einer sehr hohen GRHL2-Expression als Modellsystem verwendet. Hierzu wurden HEK-293T-Zellen mit pLKO.1-Plasmiden, die für fünf verschiedene GRHL2-shRNAs kodieren (Tab. 8-4), transfiziert und die Zielzellen anschließend mit den sich im Zellkulturüberstand befindenden lentiviralen Partikeln infiziert. Die transduzierten Zellen wurden mittels 4 µg/ml Puromycin selektioniert. Anschließend folgte die Überprüfung des *Knockdowns* des endogenen Proteins mit Hilfe des GRHL2-P1-Antikörpers in einer Western Blot-Analyse. Dabei zeigte sich, dass die getesteten shRNAs zu einer unterschiedlich starken Reduktion der GRHL2-Proteinexpression in den transduzierten T47-D-Zellen im Vergleich zu den parentalen Zellen und Zellen, die mit einer *non-target* shRNA als zusätzliche Kontrolle transduziert wurden, führten (Abb. 3-8).



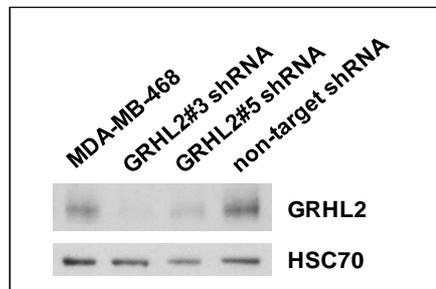
**Abb. 3-8: *Knockdown* der GRHL2-Genexpression in T47-D-Zellen.**

Gezeigt ist die Western Blot-Analyse von T47-D-Zellen transduziert mit 5 verschiedenen GRHL2-spezifischen shRNAs im Vergleich zu den parentalen Zellen und Zellen, die mit einer *non-target* shRNA als zusätzliche Kontrolle transduziert wurden. Das GRHL2-Protein wurde mit dem GRHL2-P1-Antikörper detektiert. Als Kontrolle identischer Ladung wurde das HSC70-Protein verwendet.

Da sich der stärkste *Knockdown* bei GRHL2#3 shRNA und GRHL2#5 shRNA einstellte, wurden für alle weiteren Untersuchungen diese shRNAs zur Generierung der Modellsysteme verwendet.

Um zu testen, wie sich ein *Knockdown* der *GRHL2*-Genexpression auf eine Zelllinie mit mittlerer GRHL2-Expression auswirkt, wurde ein Modellsystem basierend auf der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 etabliert. Die Zelllinie wurde wie beschrieben transduziert und anschließend mit

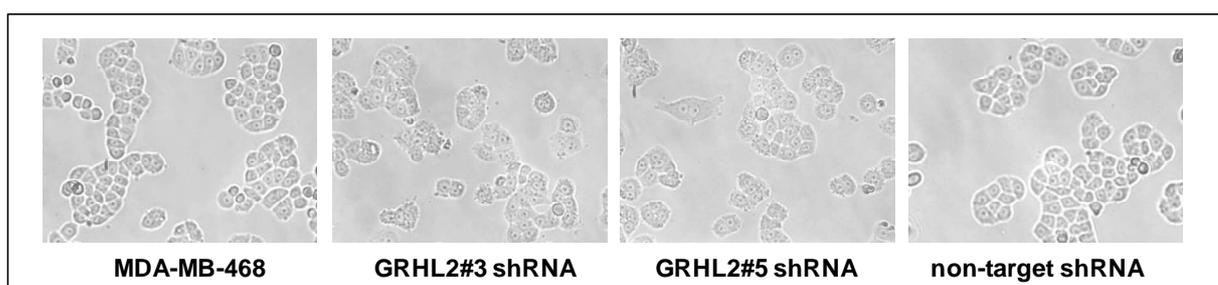
4 µg/ml Puromycin selektioniert. Man erkennt in Abb. 3-9, dass die GRHL2#3 shRNA und die GRHL2#5 shRNA die endogene Proteinexpression jeweils auf ungefähr 10% Prozent im Vergleich zum Ausgangswert in den parentalen Zellen und Zellen, die mit der *non-target* shRNA transduziert wurden, reduzierte.



**Abb. 3-9: Knockdown der GRHL2-Genexpression in MDA-MB-468-Zellen.**

Gezeigt ist eine Western Blot-Analyse von MDA-MB-468-Zellen mit reduzierter GRHL2-Proteinexpression im Vergleich zu den parentalen und den *non-target* shRNA-transduzierten Zellen. Die Detektion des Proteins erfolgte mit dem GRHL2-P1-Antikörper. Identische Ladung wurde mittels einer Western Blot-Analyse für das HSC70-Protein gezeigt.

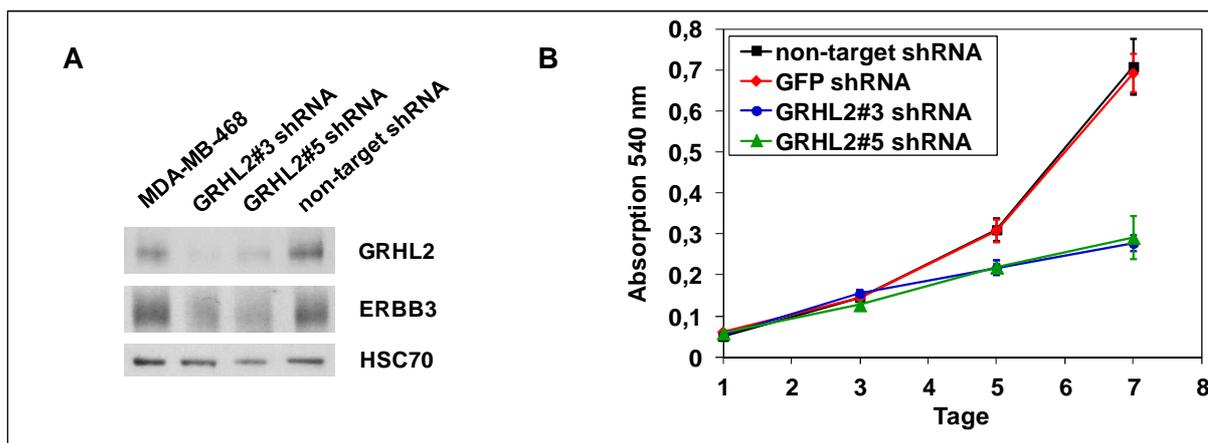
Die MDA-MB-468-Zellen mit reduzierter *GRHL2*-Genexpression wiesen auffallende morphologische Veränderungen auf. Sie erschienen deutlich weniger lichtbrechend als die Kontrollzellen und es war kaum möglich, die Zell-Zell-Kontakte zu erkennen. Weiterhin waren die *Knockdown*-Zellen deutlich größer und wichen dadurch stark vom epithelialen Phänotyp der parentalen und den *non-target* shRNA-transduzierten Zelllinien ab (Abb. 3-10).



**Abb. 3-10: Zellmorphologie des MDA-MB-468-Knockdown-Systems.**

Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen der parentalen und der *non-target* shRNA-transduzierten MDA-MB-468-Zellen im Vergleich zu den GRHL2-*Knockdown*-Zelllinien (100-fache Vergrößerung).

Die mit GRHL2#3 shRNA- und GRHL2#5 shRNA-transduzierten Zellen wiesen außerdem eine schwächere, mittels Western Blot-Analyse detektierte ERBB3-Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrollen auf (Abb. 3-11-A). Damit konnte auch in diesem Modellsystem gezeigt werden, dass *ERBB3* ein wichtiges Zielgen des Transkriptionsfaktors GRHL2 darstellt.



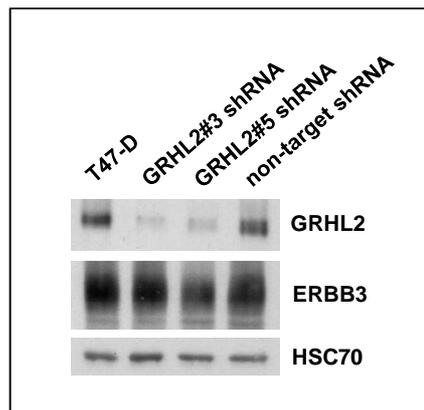
**Abb. 3-11: Analyse der ERBB3-Expression und des Proliferationsverhaltens von MDA-MB-468-Zellen mit einem *Knockdown* der GRHL2-Expression.**

(A) Gezeigt ist die Western Blot-Analyse zur ERBB3-Expression in GRHL2-defizienten MDA-MB-468-Zelllinien im Vergleich zu den parentalen und den *non-target* shRNA-transduzierten Zellen. Das Protein wurde mit Hilfe des ERBB3-Antikörpers detektiert. Als Kontrolle gleicher Ladung diente das HSC70-Protein. (B) Das Proliferationsverhalten von GRHL2-*Knockdown*-Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollen wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen analysiert.

Interessanterweise zeigte sich ebenfalls, dass GRHL2 die Proliferationsrate der Zellen beeinflusst (Abb. 3-11-B). Im Vergleich zu den Kontrollen war die Teilungsrate der GRHL2-*Knockdown*-Zelllinien drastisch reduziert und die finale Zellzahl betrug nach 7 Tagen weniger als die Hälfte. Im MDA-MB-468-Modellsystem mit *Knockdown* der GRHL2-Genexpression konnte damit erstmals ein Einfluss von GRHL2 auf die Proliferation humaner Mammakarzinomzelllinien beobachtet werden.

Zusätzlich zum beschriebenen Zellsystem wurden Untersuchungen an GRHL2-defizienten T47-D-, MCF-7-, ZR-75-1-, SK-BR-3-, BT-474-, BT-20- und GI-101-Mammakarzinomzellen durchgeführt. Bei Begutachtung im Lichtmikroskop zeigte sich, dass alle Zelllinien, in denen eine Herunterregulation der GRHL2-Expression herbeigeführt werden konnte, deutlich mesenchymaler aussahen als die jeweiligen Kontrollzellen. Zudem konnte in allen GRHL2-*Knockdown*-Zelllinien eine drastische Abnahme der Teilungsfähigkeit der Zellen im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden.

Auffallend war, dass die Herunterregulation der GRHL2-Genexpression in den Zellsystemen einen unterschiedlichen Einfluss auf die ERBB3-Expression hatte. Ähnlich wie in MDA-MB-468-Zellen zeigte sich auch in den SK-BR-3- und den GI-101-Zellen mit *Knockdown* der GRHL2-Expression eine verringerte Expression von ERBB3 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien. Für die *Knockdown*-Systeme basierend auf den Zelllinien T47-D, MCF-7 und ZR-75-1 stellte sich dieser Effekt nicht ein. Beispielhaft ist eine Western Blot-Analyse der T47-D-Zellen mit Herunterregulation der GRHL2-Genexpression im Vergleich zu den parentalen Zellen und Zellen, die mit der *non-target* shRNA transduziert wurden, gezeigt (Abb. 3-12).



**Abb. 3-12: Analyse der ERBB3-Expression von T47-D-Zellen mit einem *Knockdown* der GRHL2-Expression.**  
 (A) Dargestellt ist die Western Blot-Analyse zur ERBB3-Expression in GRHL2-defizienten T47-D-Zellen im Vergleich zu den parentalen und den *non-target* shRNA-transduzierten Zellen. Das Protein wurde mit Hilfe des ERBB3-Antikörpers detektiert. Als Kontrolle gleicher Ladung diente das HSC70-Protein.

Insgesamt zeigte sich in den Modellsystemen, dass der *Knockdown* der *GRHL2*-Genexpression eine eher mesenchymale Zellmorphologie im Vergleich zu den Kontrollzellen hervorrief und zudem eine starke anti-proliferative Wirkung hatte. In ungefähr 50% der Zellsysteme konnte *ERBB3* als Zielgen von GRHL2 in humanen Mammakarzinomzelllinien dargestellt werden.

### 3.1.3 Etablierung und Charakterisierung von Mammakarzinomzelllinien mit stabiler Überexpression eines dominant-negativ wirkenden GRHL2<sub>168-625</sub>-Genprodukts

Obwohl sich die GRHL2-Expression auf ungefähr 10-20% des Ausgangswertes reduzieren ließ, zeigte eine zeitabhängige Analyse, dass der shRNA-induzierte *Knockdown* der Genexpression nicht stabil war. Beispielhaft sind Ergebnisse eines *Knockdown*-Experiments in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 gezeigt (Abb. 3-13). In diesem Versuch wurden die Zellen mit lentiviralen Partikeln infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Die Herunterregulation der endogenen Proteinexpression wurde mit Hilfe des GRHL2-P1-Antikörpers in einer Western Blot-Analyse untersucht. Dabei zeigte sich, dass der *Knockdown* der GRHL2-Expression zwar induziert werden konnte, die Expression elf Tage nach der Infektion jedoch wieder anstieg. Ungefähr zwei Wochen nach der Infektion erreichte die Proteinexpression nahezu ihr Ausgangsniveau (Abb. 3-13).



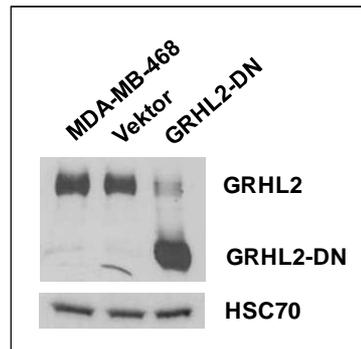
**Abb. 3-13: Zeitabhängiger Knockdown der GRHL2-Genexpression in MDA-MB-468-Zellen.**

Gezeigt ist eine Western Blot-Analyse von MDA-MB-468-Knockdown-Zellen im Vergleich zu den parental Zellen. Die Proteinexpression wurde an sechs verschiedenen Tagen nach Infektion mit den lentiviralen Partikeln untersucht. Die Detektion des Proteins erfolgte mit dem GRHL2-P1-Antikörper. Zur Kontrolle identischer Ladung diente das HSC70-Protein.

Da sich der shRNA-induzierte *Knockdown* der GRHL2-Genexpression in den Mammakarzinomzelllinien als nicht stabil erwies, sollte eine dauerhafte Inaktivierung des Proteins über einen anderen experimentellen Ansatz erfolgen. So konnte bereits für das *Drosophila grainyhead*- und das humane GRHL2-Protein gezeigt werden, dass N-terminal trunkierte GRHL2-Mutanten ohne Transaktivierungsdomäne einen dominant-negativen Effekt auf das endogene Wildtyp-Protein ausüben und es dadurch funktionell inaktivieren können (Attardi, Von Seggern et al. 1993; Werner 2009). Dem humanen, dominant-negativen GRHL2-Protein (GRHL2-DN) ohne Transaktivierungsdomäne fehlen die ersten 167 Aminosäuren (GRHL2<sub>168-625</sub>) (Werner 2009).

Das GRHL2-DN-Expressionskonstrukt wurde hergestellt, in dem das entsprechende GRHL2-cDNA-Fragment unter Verwendung der Oligonukleotide GRHL2-DN-up und GRHL2-12 (Tab. 8-5) und dem in Kap. 3.1.1 hergestellten pMXs-IP/GRHL2-Expressionsplasmid als Matrize mittels PCR amplifiziert und wieder in den pMXs-IP-Vektor kloniert (pMXs-IP/GRHL2-DN) wurde. Für die stabile Expression des Transgens in den Zielzelllinien erfolgte ein retroviraler Gentransfer. Um klonale Effekte auszuschließen, wurden resistente Zellen nach Selektion mit 4 µg/ml Puromycin vereinigt und für funktionelle Analysen verwendet.

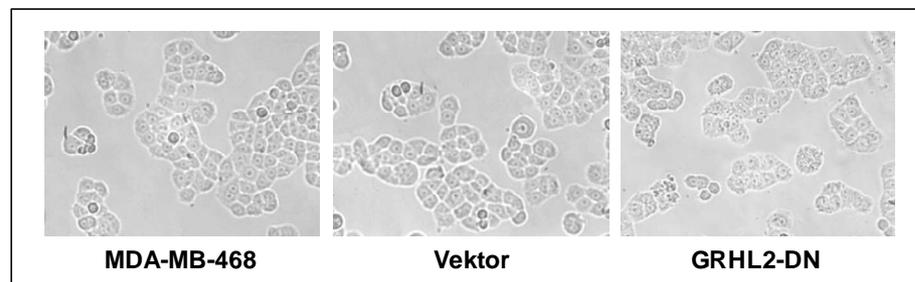
Damit getestet werden konnte, ob die Expression eines dominant-negativ wirkenden GRHL2-Genprodukts die gleichen phänotypische Veränderungen wie der spezifische *Knockdown* der GRHL2-Expression hervorruft, wurde ein Modellsystem basierend auf der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 hergestellt (Abb. 3-14). Auffällig war, dass das endogene wildtypische GRHL2-Protein bei Überexpression des GRHL2-DN-Genprodukts, das eine Größe von 57 kDa besitzt, im Vergleich zu den parental und den Vektor-transfizierten Zellen drastisch herunterreguliert war.



**Abb. 3-14: Darstellung der GRHL2-DN-Proteinexpression in MDA-MB-468-Zellen.**

Gezeigt ist die Western Blot-Analyse der MDA-MB-468-Zelllinie mit endogener GRHL2-Expression (70 kDa) und ektopischer GRHL2-DN-Expression (57 kDa) im Vergleich zu den parentalen und den Vektor-transfizierten Zellen detektiert mit dem GRHL2-P1-Antikörper. Zur Kontrolle identischer Ladung diente das HSC70-Protein.

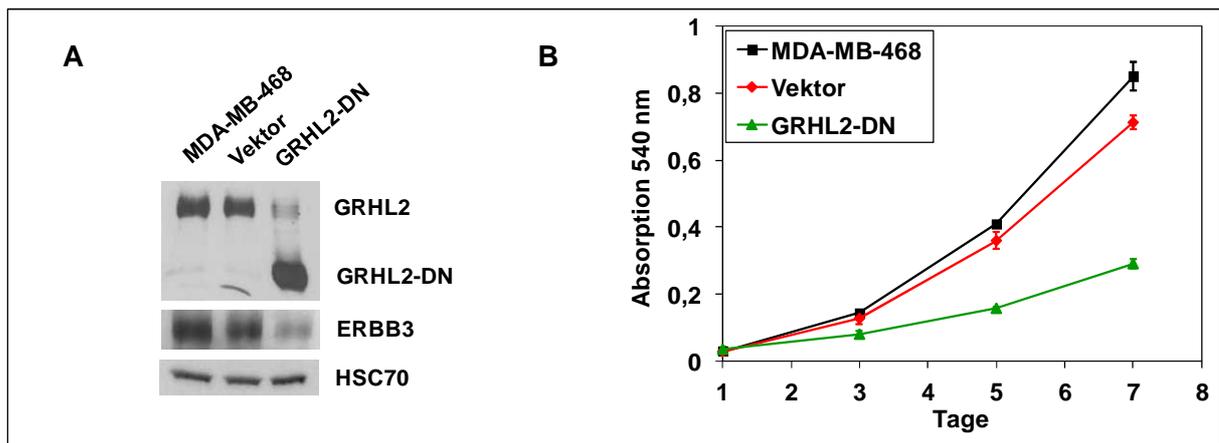
Lichtmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass die GRHL2-DN-transfizierten MDA-MB-468-Zellen die gleichen morphologischen Veränderungen wie die Zelllinien mit *Knockdown* der GRHL2-Expression aufwiesen (Kap. 3.1.2). Der epitheliale Phänotyp der Zellen ging verloren und sie waren dadurch größer, weniger lichtbrechend und hatten keine definierten Zellgrenzen im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (Abb. 3-15).



**Abb. 3-15: Zellmorphologie des MDA-MB-468-Zellsystems mit Überexpression von GRHL2-DN.**

Gezeigt sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der GRHL2-DN-Zelllinie im Vergleich zu den parentalen und den Vektor-transfizierten MDA-MB-468-Zellen (100-fache Vergrößerung).

Wie bereits für die GRHL2-shRNA-transduzierten MDA-MB-468-Zellen beschrieben, löste die funktionelle Inaktivierung des *GRHL2*-Gens eine Herunterregulierung der ERBB3-Expression (Abb. 3-16-A) und einen anti-proliferativen Effekt in den Zellen (Abb. 3-16-B) aus. Nach 7 Tagen betrug die Zellzahl der GRHL2-DN-transfizierten Zelllinien nur ungefähr ein Drittel im Vergleich zu den Kontrollzellen.



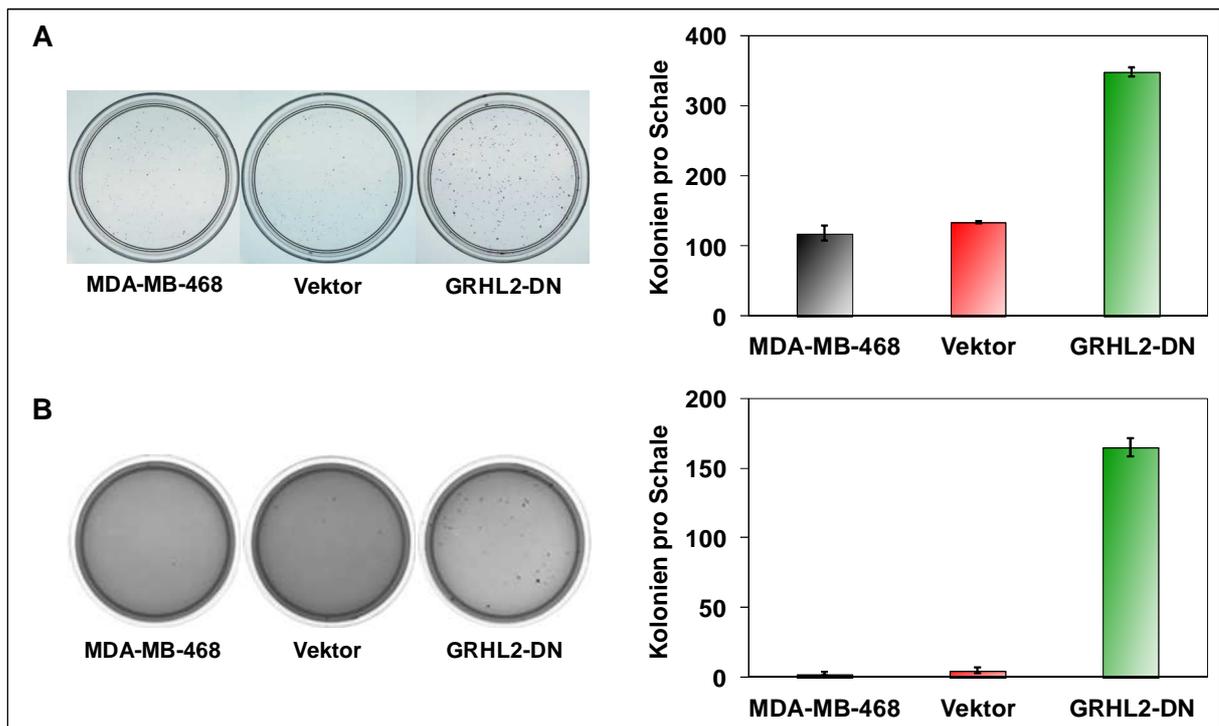
**Abb. 3-16: Analyse der ERBB3-Expression und des Proliferationsverhaltens von MDA-MB-468-Zellen mit stabiler GRHL2-DN-Expression.**

(A) Dargestellt ist die Western Blot-Analyse zur ERBB3-Expression in MDA-MB-468-Zellen mit dominant-negativer GRHL2-Expression im Vergleich zu den parentalen und den Vektor-transfizierten Zellen. Das Protein wurde mit Hilfe des ERBB3-Antikörpers detektiert. Zur Kontrolle gleicher Ladung wurde das HSC70-Protein verwendet. (B) Das Proliferationsverhaltens der GRHL2-DN-Zelllinie im Vergleich zu parentalen und Vektor-transfizierten Zellen wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen analysiert.

Die ersten Ergebnisse dieser Untersuchungen deuteten darauf hin, dass das GRHL2-*Knockdown*-System und die Überexpression des dominant-negativ wirkenden GRHL2<sub>168-625</sub>-Genprodukts ähnliche Effekte in MDA-MB-468-Zellen hervorriefen und somit als äquivalent zu betrachten waren.

Für weiterführende funktionelle Analysen wurden die MDA-MB-468-Zellen mit stabiler Überexpression des GRHL2-DN-Proteins verwendet. Zunächst wurde die Fähigkeit der Zellen, aus einer Einzelzelle vielzellige Zellklone bilden zu können, untersucht. Es zeigte sich, dass die Zelllinie mit funktionell inaktiviertem GRHL2 ungefähr drei Mal so viele und zudem deutlich größere Zellklone als die Kontrollzellen hervorbrachte (Abb. 3-17-A).

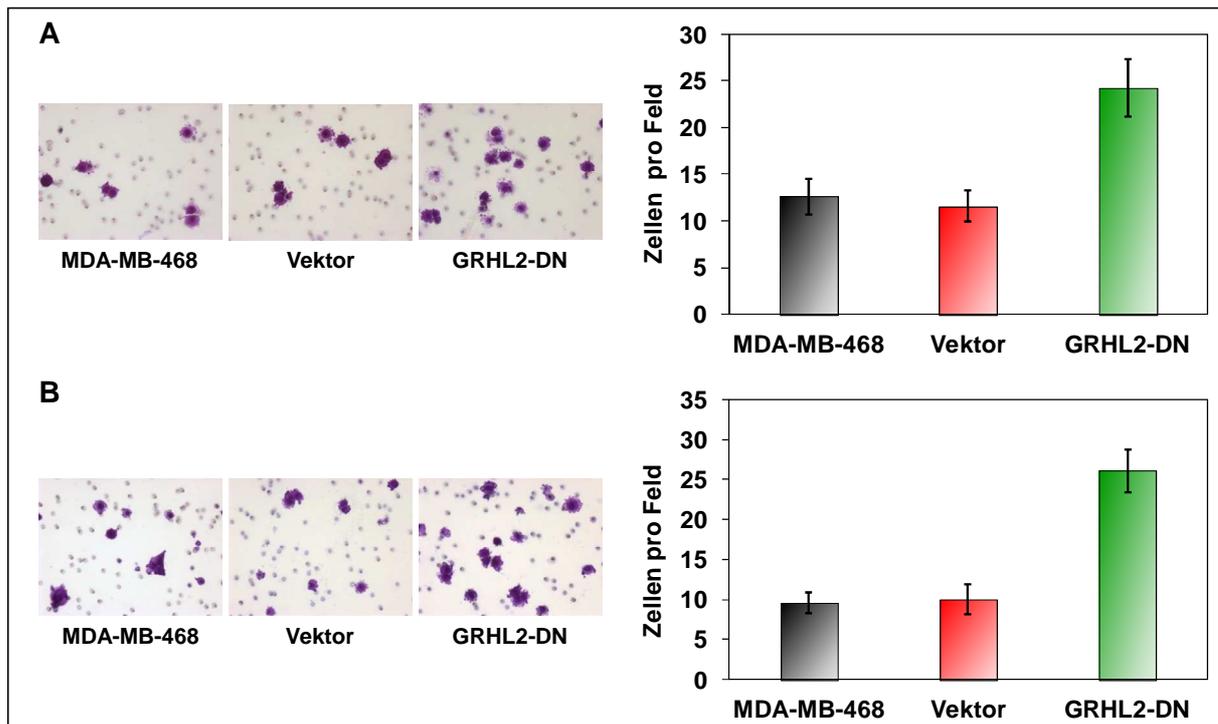
Die Untersuchung des verankerungsunabhängigen Wachstums mittels Weich-Agar-Assay ergab, dass parentale und Vektor-transfizierte MDA-MB-468-Zellen kaum dazu in der Lage waren, unter diesen Bedingungen zu wachsen und entsprechend überwiegend als Einzelzellen vorlagen. Die Zellen mit dominant-negativer GRHL2-Expression brachten vielzellige Klone (Abb. 3-17-B, links) und eine höhere Klonanzahl im Vergleich zu den Kontrollen hervor (Abb. 3-17-B, rechts). Die Klonalität lag dabei bei ungefähr 1,6%.



**Abb. 3-17: Untersuchung des klonalen und verankerungsunabhängigen Wachstums von MDA-MB-468-Zellen mit stabiler GRHL2-DN-Expression.**

(A) Untersucht wurde das klonale Wachstum der GRHL2-DN-exprimierenden Zelllinie im Vergleich zu den parentalen und den Vektor-transfizierten MDA-MB-468-Zellen in der 6 cm-Schale (links). Die Kolonien wurden gefärbt und quantifiziert (rechts). (B) Das verankerungsunabhängige Wachstums aller Zelllinien wurde mittels Weich-Agar-Assay in der 6 cm-Schale bestimmt (links). Quantifizierung der Klone der GRHL2-DN-exprimierenden Zelllinie im Vergleich zu den parentalen und den Vektor-transfizierten Zellen (rechts).

Um das Migrations- und Invasionsverhalten der verschiedenen Zelllinien zu untersuchen, wurden Boyden-Kammer-Assays durchgeführt. Die parentalen und die Vektor-transfizierten Kontrollzelllinien migrierten (Abb. 3-18-A) und invadierten (Abb. 3-18-B) nur sehr schwach. Die Zellen mit dominant-negativer GRHL2-Expression hingegen hatten ein ungefähr doppelt so hohes Potential zur Migration und Invasion.



**Abb. 3-18: Untersuchung der Migrations- und Invasionsfähigkeit von MDA-MB-468-Zellen mit stabiler GRHL2-DN-Expression.**

(A) Gezeigt sind migrierte Zellen der GRHL2-DN exprimierenden Zelllinie im Vergleich zu den parental und den Vektor-transfizierten MDA-MB-468-Zellen bei 200-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop (links). Die Zellen auf der Membran wurden gefärbt und quantifiziert (rechts). (B) Lichtmikroskopische Aufnahme des Invasionsverhaltens aller Zelllinien bei 200-facher Vergrößerung (links). Die invadierten GRHL2-exprimierenden Zellen wurden im Vergleich zur parental und der Vektor-transfizierten Zelllinie quantifiziert (rechts).

Zusätzlich zu den Untersuchungen am beschriebenen MDA-MB-468-Modellsystem wurden noch weitere Zelllinien mit stabiler Expression des dominant-negativ wirkenden GRHL2-Genprodukts analog zu den oben beschriebenen Experimenten generiert und auch partiell charakterisiert. Insgesamt zeigte sich in den untersuchten Mammakarzinomzelllinien T47-D, ZR-75-1, SK-BR-3, BT-474, BT-20 und GI-101 mit GRHL2-DN-Expression eine starke anti-proliferative Wirkung im Vergleich zu den Kontrollzellen. Wie bereits im *Knockdown*-System konnte auch hier nur in ungefähr der Hälfte der Zellsysteme *ERBB3* als Zielgen von GRHL2 dargestellt werden.

Sowohl die funktionellen Studien als auch die morphologischen Veränderungen der GRHL2-DN-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollen deuteten darauf hin, dass GRHL2 in den etablierten Zellsystemen einen möglichen Suppressor der EMT darstellt.

### 3.1.4 GRHL2-induzierte Veränderungen im Genexpressionsprofil humaner Mammakarzinomzelllinien

In allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten experimentellen Systemen (Überexpression, Knockdown und dominant-negativer Ansatz) konnten drastische phänotypische Veränderungen in den Mammakarzinomzelllinien beobachtet werden. Um herauszufinden, auf welche molekularen Mechanismen diese Beobachtungen zurückzuführen sind, sollten die GRHL2-abhängigen Genexpressionsveränderungen in den verschiedenen Zellsystemen mittels quantitativer PCR-Analyse bestimmt werden. Dafür wurde die Expression von 26 ausgewählten Genen, die EMT/MET-assoziiert sind bzw. anerkannte GRHL2-Zielgene darstellen, in allen etablierten Systemen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzelllinien untersucht. In Tab. 3-1 sieht man, dass eine Reihe von Genen, die mit der EMT in Verbindung gebracht werden wie *CDH1* (E-Cadherin), die Zytokeratine, Claudine, *VIM* (Vimentin) und *ZEB1*, dereguliert waren. Auch wiesen anerkannte GRHL2-Zielgene wie *FAS*, *RAB25* und *TERT* zum Teil drastische Veränderungen in ihrer Genexpression auf. Weiterhin fiel auf, dass beide Ansätze zur funktionellen Inaktivierung des *GRHL2*-Gens die gleichen Unterschiede im Expressionsmuster im Vergleich zu den Kontrollen hervorriefen und somit als identisch anzusehen waren.

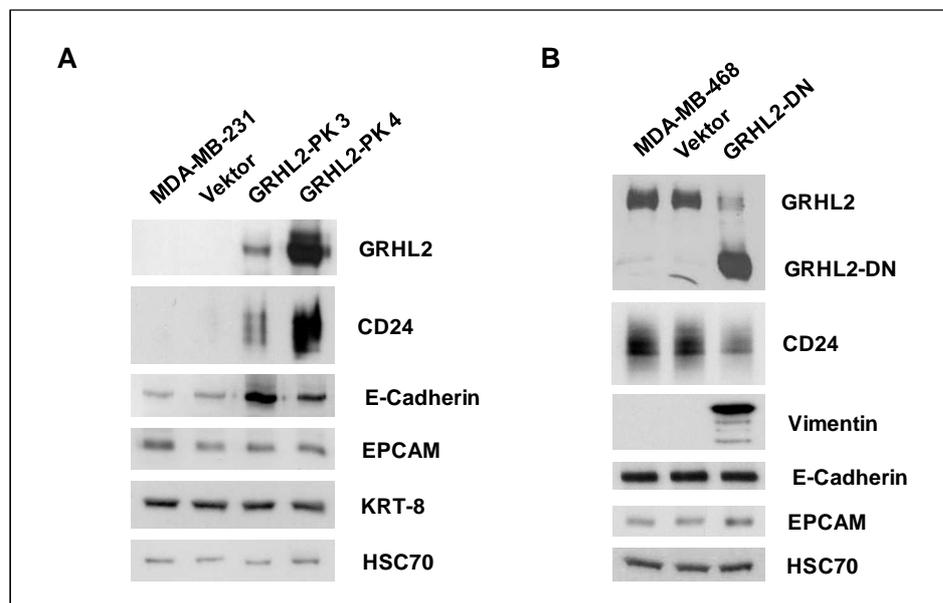
Tab. 3-1: GRHL2-induzierte Genexpressionsveränderungen in den Mammakarzinom-Modellsystemen.

Gensymbol	Fold Change <sup>1)</sup>			
	MDA-MB-231 GRHL2-PK 3	MDA-MB-231 GRHL2-PK 4	MDA-MB-468 GRHL2#3 shRNA	MDA-MB-468 GRHL2-DN
<i>DSC2</i>	4.19 ± 0.46	5.43 ± 0.40	1.38 ± 0.16	-1.47 ± 0.19
<i>DSG2</i>	1.37 ± 0.40	1.48 ± 0.07	1.26 ± 0.26	-1.49 ± 0.22
<i>DSP</i>	1.39 ± 0.36	2.45 ± 0.95	1.36 ± 0.06	-1.16 ± 0.06
<i>CLDN3</i>	1.29 ± 0.20	1.58 ± 0.21	-1.44 ± 0.03	1.07 ± 0.27
<i>CLDN4</i>	1.70 ± 0.22	1.63 ± 0.47	1.13 ± 0.05	1.08 ± 0.23
<i>CLDN6</i>	1.23 ± 0.07	1.05 ± 0.29	1.07 ± 0.22	-1.18 ± 0.01
<i>CLDN7</i>	-1.35 ± 0.11	-1.08 ± 0.03	-1.23 ± 0.03	1.00 ± 0.18
<i>EPCAM</i>	-1.02 ± 0.06	1.22 ± 0.12	1.22 ± 0.49	-1.33 ± 0.01
<i>CDH1</i> <sup>2)</sup>	7.11 ± 0.06	2.77 ± 0.33	-1.28 ± 0.45	-1.19 ± 0.12
<i>CDH3</i> <sup>3)</sup>	2.11 ± 0.47	1.45 ± 0.11	1.19 ± 0.06	1.14 ± 0.26
<i>OCLN</i>	2.57 ± 0.76	2.89 ± 0.15	1.15 ± 0.01	1.41 ± 0.27
<i>ACTA2</i> <sup>4)</sup>	1.15 ± 0.08	1.36 ± 0.08	2.36 ± 0.01	3.05 ± 0.16
<i>TJP1</i> <sup>5)</sup>	1.29 ± 0.42	2.37 ± 0.73	1.02 ± 0.03	1.05 ± 0.20
<i>KRT7</i>	1.51 ± 0.03	2.71 ± 0.25	-1.54 ± 0.12	-1.52 ± 0.12
<i>KRT8</i>	-1.06 ± 0.19	1.14 ± 0.01	-1.56 ± 0.02	-1.59 ± 0.03
<i>KRT18</i>	1.12 ± 0.17	1.32 ± 0.07	-1.72 ± 0.32	-2.04 ± 0.05
<i>VIM</i> <sup>6)</sup>	1.28 ± 0.18	1.21 ± 0.35	32.65 ± 3.61	32.27 ± 3.26
<i>ZEB1</i>	1.14 ± 0.30	1.27 ± 0.15	5.55 ± 0.43	5.59 ± 0.53
<i>CD24</i>	3.60 ± 0.78	6.48 ± 1.64	-2.17 ± 0.14	-2.27 ± 0.08
<i>CD44</i>	1.02 ± 0.04	1.13 ± 0.24	1.14 ± 0.03	-1.45 ± 0.26
<i>ERBB3</i>	1.26 ± 0.08	1.08 ± 0.04	-2.94 ± 0.01	-2.27 ± 0.14
<i>FAS</i>	1.90 ± 0.07	5.06 ± 0.50	1.22 ± 0.54	1.08 ± 0.05
<i>DR4</i>	1.80 ± 0.29	3.78 ± 0.06	1.46 ± 0.14	1.11 ± 0.12
<i>DR5</i>	-1.09 ± 0.03	-1.10 ± 0.01	1.14 ± 0.15	-1.04 ± 0.39
<i>RAB25</i>	11.73 ± 3.60	18.54 ± 1.42	1.01 ± 0.11	1.25 ± 0.04
<i>TERT</i>	1.69 ± 0.44	3.01 ± 0.01	1.11 ± 0.00	1.16 ± 0.11

<sup>1)</sup> Der *Fold Change* beschreibt den relativen Expressionsunterschied im Vergleich zu den parental Zellen und wurde durch qRT-PCR-Analyse bestimmt. Ein relativer Expressionsunterschied von mehr als ±1,5 wurde dabei als signifikant angesehen und ist in der Tabelle hellblau unterlegt.

<sup>2)</sup> *CDH1* (E-Cadherin); <sup>3)</sup> *CDH3* (P-Cadherin); <sup>4)</sup> *ACTA2* (Smooth Muscle Actin); <sup>5)</sup> *TJP1* (ZO-1); <sup>6)</sup> *VIM* (Vimentin)

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse wurden exemplarisch auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse bestätigt (Abb. 3-19).



**Abb. 3-19: GRHL2-induzierte Veränderungen in der Proteinexpression.**

(A) Gezeigt ist eine Western Blot-Analyse von verschiedenen Proteinen in den GRHL2-überexprimierenden MDA-MB-231-Zelllinien im Vergleich zu den parentalen und den Vektor-transfizierten Zellen. (B) Man sieht die Western Blot-Analyse von verschiedenen Proteinen in den GRHL2-DN-überexprimierenden MDA-MB-468-Zellen im Vergleich zu den parentalen und den Vektor-transfizierten Kontrollen. Die Proteine wurden mit den jeweils angegebenen Antikörpern detektiert. Als Kontrolle gleicher Ladung diente das HSC70-Protein.

Auffallend war, dass E- und P-Cadherin in den GRHL2-überexprimierenden MDA-MB-231-Zelllinien nicht Gen-Dosis abhängig reguliert wurden (Tab. 3-1 und Abb. 3-19-A).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Manipulation der *GRHL2*-Genexpression in den Mammakarzinomzelllinien sehr starke phänotypische Veränderungen und Alterationen im Genexpressionsprofil hervorgerufen hat. Funktionelle Analysen zeigten, dass GRHL2 einen Einfluss auf die Zellproliferation ausübt und den ERBB3-Rezeptor in ungefähr 50% der humanen Mammakarzinomzelllinien reguliert, dargestellt in Tab. 3-2. Die morphologischen Veränderungen, die Ergebnisse aus dem klonogenen und dem Weich-Agar-Assay, die Unterschiede im Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen zusammen mit den Genexpressionsdaten deuteten darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor GRHL2 einen neuen Repressor der EMT darstellt.

**Tab. 3-2: Einfluss des veränderten GRHL2-Expressionsniveaus auf die ERBB3-Expression in humanen Mammakarzinomzelllinien.**

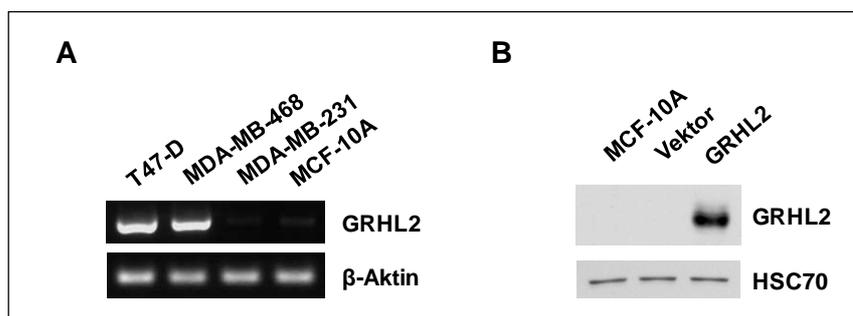
Zellsystem	Zelllinie									
	MCF-7	T47-D	ZR-75-1	SK-BR-3	BT-474	BT-20	MDA-MB-468	BT-549	MDA-MB-231	GI-101
Überexpression	-	-	-	-	-	-	-	↑	o	-
Knockdown	o	o	o	↓	↓	↓	↓	-	-	↓
DN	-	o	o	↓	↓	↓	↓	-	-	↓

↑: Hochregulation; ↓: Herunterregulation; o: keine Deregulation; -: keine Daten vorhanden

### 3.1.5 GRHL2 reprimiert die TGF- $\beta$ -induzierte EMT in MCF-10A-Zellen

Die normale, aber spontan immortalisierte Mammaepithelzelllinie MCF-10A zeichnet sich durch ein nicht-tumorigenes Wachstum *in vivo* aus und stellt eines der besten Modellsysteme für die Induktion einer EMT durch *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) dar (Brown, Aakre et al. 2004). Anhand dieses Modellsystems sollte die potentielle EMT-unterdrückende Funktion des *GRHL2*-Gens weiter charakterisiert werden.

Dafür wurde zunächst die GRHL2-Expression auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse und auf Transkriptebene mittels nicht-quantitativer RT-PCR-Analyse in den MCF-10A-Zellen untersucht. Bei hohen Zyklenzahlen ( $n=35$ ) konnten schwache Banden in der RT-PCR-Analyse erhalten werden, die auf eine äußerst schwache Expression der GRHL2-Gentranskripte in MCF-10A-Zellen hindeuteten (Abb. 3-20-A).



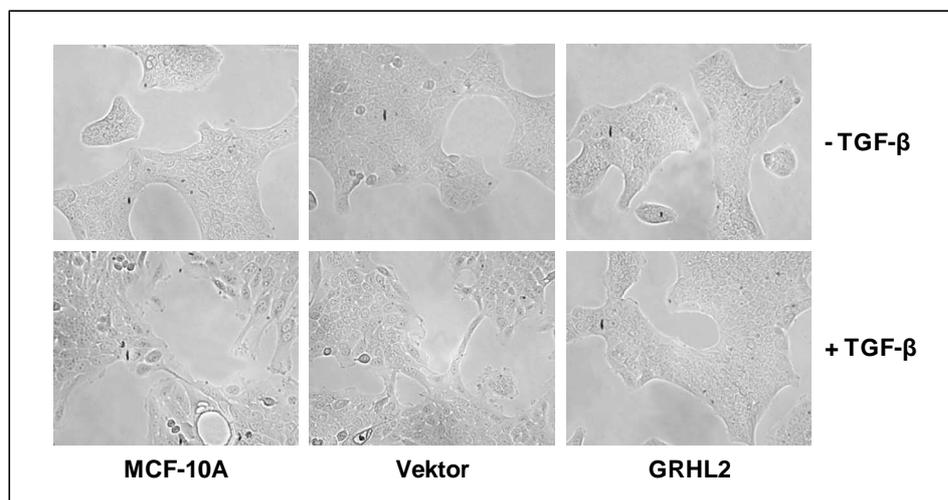
**Abb. 3-20: Untersuchung der GRHL2-Expression in MCF-10A-Zellen.**

(A) Die GRHL2-mRNA-Expression wurde in den aufgeführten Mammakarzinomzelllinien mit Hilfe der RT-PCR-Analyse bei hohen Zyklenzahlen analysiert ( $n=35$ ). Der Nachweis des  $\beta$ -Aktin-Transkripts diente als Positivkontrolle der nicht-quantitativen RT-PCR-Reaktion. Die Amplifikationsprodukte wurden mit Ethidiumbromid visualisiert. (B) Man sieht die Western Blot-Analyse von MCF-10A-Zellen mit stabiler GRHL2-Expression im Vergleich zu den parental und den Vektor-transfizierten Zellen. Die Detektion des Proteins erfolgte mit dem GRHL2-P1-Antikörper. Als Kontrolle identischer Ladung diente das HSC70-Protein.

Diese Annahme wurde mittels Western Blot-Analyse, die keine Hinweise auf eine signifikante GRHL2-Proteinexpression in MCF-10A-Zellen erbrachte, bestätigt (Abb. 3-20-B). Dies implizierte eine nur sehr schwache Expression des *GRHL2*-Gens in MCF-10A-Zellen.

Um ein Modellsystem herzustellen, wurde mittels retroviralem Gentransfer und mit Hilfe des in Kap. 3.1.1 hergestellten Expressionsplasmids eine polyklonale MCF-10A-Zelllinie mit stabiler GRHL2-Überexpression generiert (Abb. 3-20-B).

Um die Zellmorphologie des vorliegenden Modellsystems bewerten zu können, wurden alle Zelllinien bei annähernd gleicher Konfluenz im Lichtmikroskop begutachtet und bei 100-facher Vergrößerung fotografiert. Wie in Abb. 3-21, oben zu erkennen, zeigten die GRHL2-exprimierenden Zellen keine gravierenden morphologischen Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen. Die einzige Auffälligkeit bestand darin, dass die Zellinseln der GRHL2-überexprimierenden MCF-10A-Zellen bei mittlerer Dichte sogar noch etwas kompakter wirkten als die der Kontrollzelllinien. Die Vermutung, dass dieses geringfügig veränderte Wachstumsverhalten auf eine Stabilisierung des epithelialen Phänotyps zurückzuführen sein könnte, wurde durch eine qRT-PCR-Analyse bestätigt (Abb. 3-22). So waren die mesenchymalen Marker Vimentin und N-Cadherin durch GRHL2 herunterreguliert und die epithelzellspezifischen Claudine in diesem experimentellen System im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen deutlich heraufreguliert.



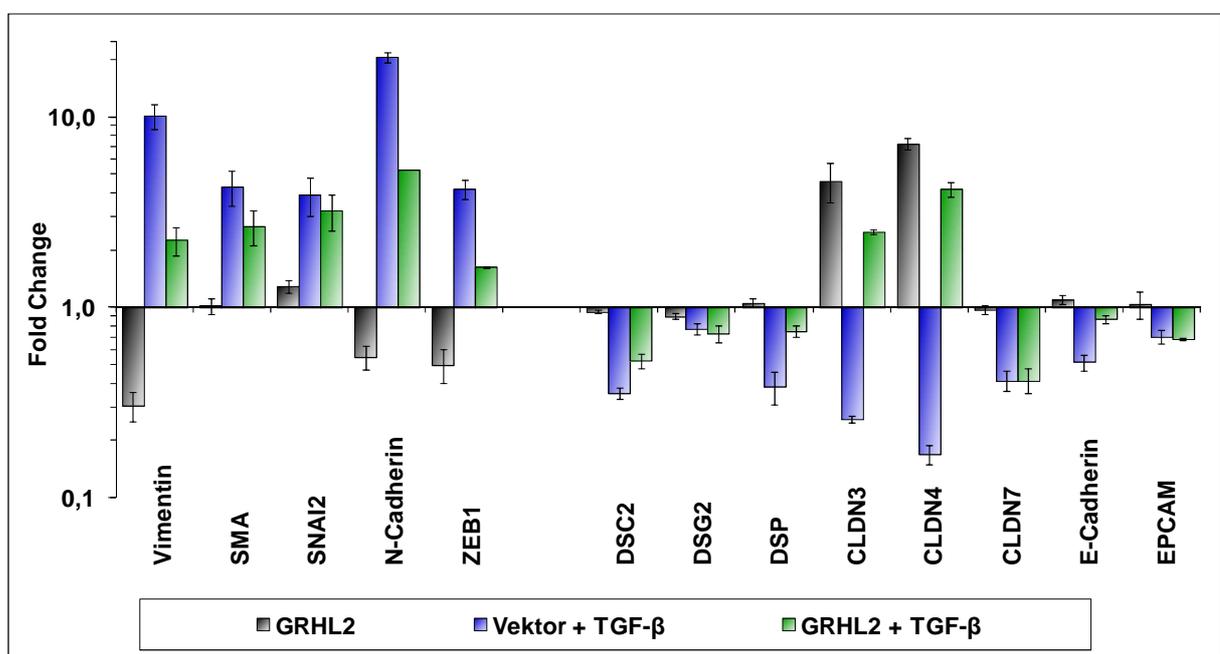
**Abb. 3-21: Morphologie des MCF-10A-Überexpressionssystems.**

Dargestellt sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der parentalen, Vektor-transfizierten und GRHL2-überexprimierenden MCF-10A-Zelllinien im Vergleich (100-fache Vergrößerung) vor der TGF- $\beta$ -Stimulation (oben) und danach (unten).

Die Induktion einer EMT durch Zugabe von 5 ng/ml TGF- $\beta$  löste drastische morphologische Veränderungen, die charakteristisch für eine EMT sind, in den parentalen und Vektor-transfizierten

Zellen aus (Abb. 3-21). Die Zellen wuchsen deutlich weniger kompakt und geordnet als vor der Stimulation, waren viel größer und wiesen eine spindelförmige Morphologie auf. Diese EMT-ähnlichen Veränderungen nach Induktion mit TGF- $\beta$  zeigten sich bei den GRHL2-exprimierenden Zellen nicht.

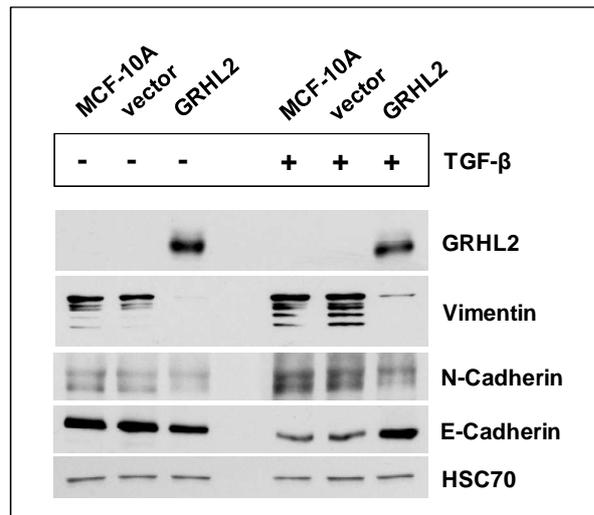
Die qRT-PCR-Analyse zeigte ebenfalls, dass durch die Stimulation der MCF-10A-Zellen mit TGF- $\beta$  Genexpressionsveränderungen ausgelöst wurden, die charakteristisch für eine EMT sind (Abb. 3-22, blaue Säulen). Die zusätzliche Überexpression von GRHL2 führte dagegen zu einer Abschwächung der Genexpressionsveränderungen in der Zelllinie im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen (Abb. 3-22, grüne Säulen).



**Abb. 3-22: Durch GRHL2- und TGF- $\beta$ -induzierte Genexpressionsveränderungen in den MCF-10A-Zellen.**

Gezeigt ist die qRT-PCR-Analyse von 13 verschiedenen Genen in der GRHL2-überexprimierenden Zelllinie im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen (schwarze Säulen). Die blauen und grünen Säulen geben die TGF- $\beta$ -induzierten Genexpressionsveränderungen der Vektor-transfizierten und der GRHL2-überexprimierenden Zelllinie im Vergleich zu den Kontrollen an. Der Fold Change beschreibt den relativen Expressionsunterschied.

Die Ergebnisse aus der qRT-PCR-Analyse wurden exemplarisch mittels Western Blot-Analyse für Vimentin, N- und E-Cadherin auf Proteinebene bestätigt (Abb. 3-23).



**Abb. 3-23: GRHL2- und TGF- $\beta$ -induzierte Veränderungen in der Proteinexpression.**

Dargestellt ist die Western Blot-Analyse der angegebenen Proteine in den GRHL2-überexprimierenden MCF-10A-Zellen im Vergleich zu den parentalen und den Vektor-transfizierten Kontrollen vor und nach TGF- $\beta$ -Stimulation. Die Proteine wurden mit den jeweils angegebenen Antikörpern detektiert. Zur Kontrolle gleicher Ladung diente das HSC70-Protein.

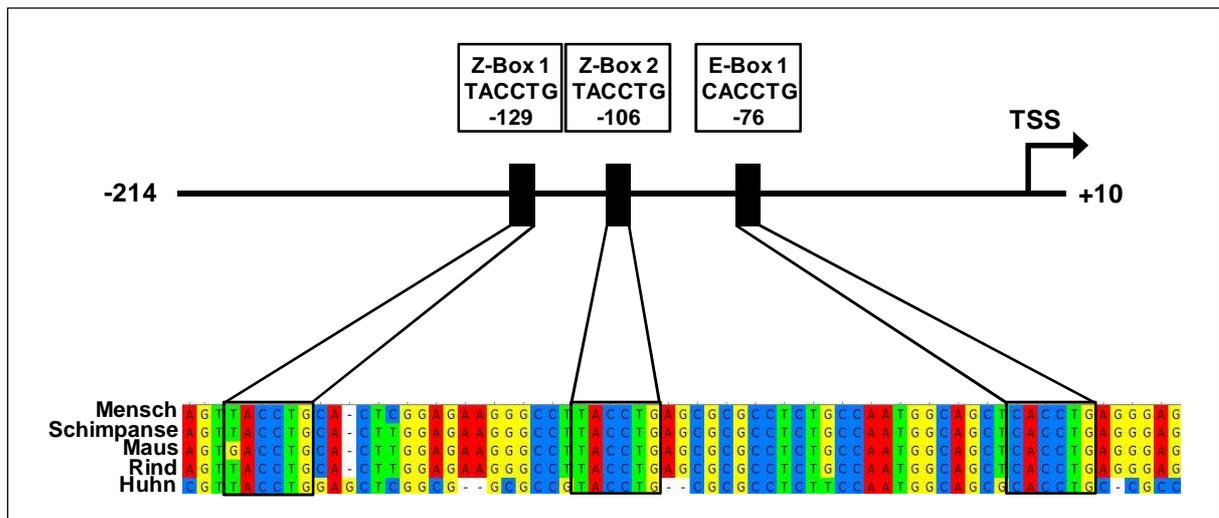
Der antagonisierende Effekt von GRHL2 auf die TGF- $\beta$ -induzierte EMT in den MCF-10A-Zellen fiel jedoch deutlich geringer aus, wenn die TGF- $\beta$ -Konzentration erhöht und die Stimulation an aufeinanderfolgenden Tagen kontinuierlich wiederholt wurde.

Dennoch stützte dieses Ergebnis unsere Beobachtungen, dass der Transkriptionsfaktor GRHL2 eine EMT-unterdrückende Funktion in Mammakarzinomzelllinien ausübt.

### 3.2 Regulation der GRHL2-Expression in humanen Mammakarzinomzelllinien durch ZEB1

Bisher ist in der Literatur noch nichts über die Regulation des GRHL2-Transkriptionsfaktors bei humanen Tumoren beschrieben. Deshalb sollte damit begonnen werden, die molekularen Mechanismen der Regulation der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzelllinien zu untersuchen. Zunächst erschien es sinnvoll, die regulatorische Region des *GRHL2*-Gens (-1000 bp oberhalb des Transkriptionsstartpunktes (TSS)) auf mögliche Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren hin zu untersuchen. Mit Hilfe einer *in silico*-Promotoranalyse (Kap. 2.5) wurden drei potentielle Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor *Zinc finger E-box-binding homeobox 1* (ZEB1) gefunden. Dieser Transkriptionsfaktor bindet an E-Boxen (häufigste Sequenzen sind 5'-CAGGTG-3', 5'-CATGTG-3' und 5'-CACCTG-3') und Z-Boxen (häufigste Sequenzen sind 5'-CAGGTA-3' und

5'-TACCTG-3') im proximalen Promotor seiner Zielgene, zum Beispiel *CDH1* (E-Cadherin) (Spaderna, Schmalhofer et al. 2006).

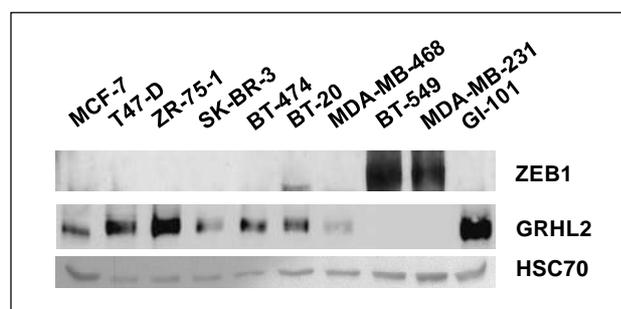


**Abb. 3-24: Schematische Darstellung der regulatorischen Region des humanen *GRHL2*-Gens.**

Die Sequenzen aller Z-/E-Boxen und ihre Positionen relativ zum Transkriptionsstartpunkt sind eingezeichnet. Die Promotorregionen von Mensch, Schimpanse, Maus, Rind und Huhn zeigt die evolutionäre Konservierung der Bindungsmotive für ZEB1. Die Übersicht wurde mit der frei erhältlichen Unipro UGENE Software 1.11 (<http://ugene.unipro.ru/>) erstellt.

Im *GRHL2*-Promotor wurden zwei Z-Boxen (Position -129 und -106) und eine E-Box (Position -76) identifiziert. Alle potentiellen Bindungsstellen waren evolutionär zwischen Mensch, Schimpanse, Maus, Rind und Huhn hoch konserviert, was eine physiologische Relevanz implizierte (Abb. 3-24).

Durch eine Western Blot-Analyse mit Hilfe des *GRHL2*-P1- und des ZEB1-H-102-Antikörpers (Tab. 8-10) konnte an zehn verschiedenen Mammakarzinomzelllinien ein inverses Expressionsmuster für *GRHL2* und ZEB1 detektiert werden.

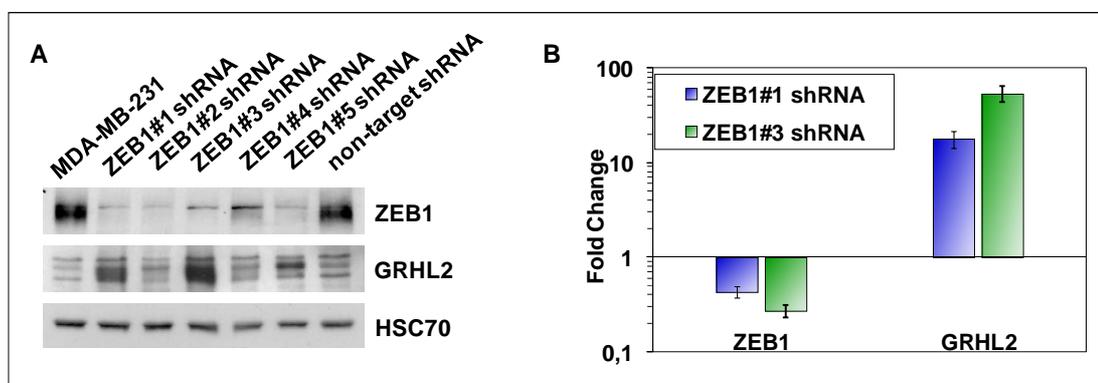


**Abb. 3-25: ZEB1- und GRHL2-Proteinexpressionsmuster in zehn humanen Mammakarzinomzelllinien.**

Die Western Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte von den aufgeführten Zelllinien wurden mit Hilfe der ZEB1-H-102- und *GRHL2*-P1-Antikörper durchgeführt. Als Kontrolle gleicher Ladung diente das HSC70-Protein.

Auffällig war, dass die eher malignen Zelllinien MDA-MB-231 und BT-549 der „Basal-B“-Unterklasse von Mammakarzinomzelllinien (Neve, Chin et al. 2006) eine sehr starke ZEB1-Expression aufwiesen (Abb. 3-25).

Um zu untersuchen, ob ZEB1 repressorisch auf den GRHL2-Promotor wirkt, sollte ein *Knockdown* der ZEB1-Genexpression mittels shRNA-Technologie in MDA-MB-231-Zellen erwirkt werden. Hierzu wurden HEK-293T-Zellen mit pLKO.1-Plasmiden, die für fünf verschiedene ZEB1-shRNAs kodieren (Tab. 8-4), zur Herstellung lentiviraler Überstände transfiziert. Anschließend wurden die Zielzellen mit diesen Überständen infiziert, und es wurde mit 1 µg/ml Puromycin auf polyklonale Linien selektioniert.

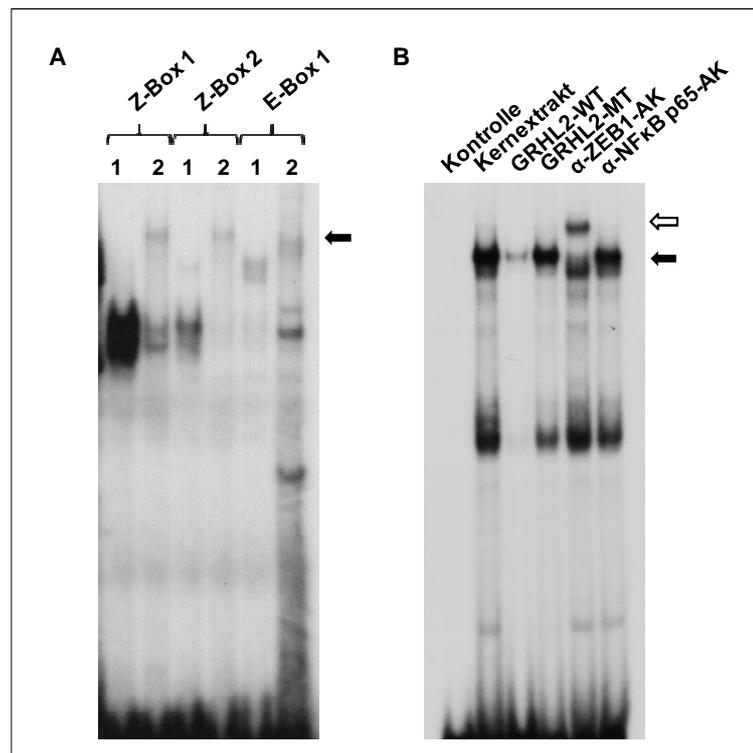


**Abb. 3-26: Knockdown der ZEB1-Genexpression und dessen Einfluss auf die GRHL2-Expression in MDA-MB-231-Zellen.**

(A) Zu sehen ist die Western Blot-Analyse von MDA-MB-231-Zellen transduziert mit 5 verschiedenen ZEB1-spezifischen shRNAs im Vergleich zu den parentalen Zellen und Zellen, die mit einer *non-target* shRNA als zusätzliche Kontrolle transduziert wurden. Das ZEB1-Protein wurde mit dem ZEB-H-102-Antikörper, das GRHL2-Protein mit dem GRHL2-P1-Antikörper detektiert. Als Kontrolle identischer Ladung wurde das HSC70-Protein verwendet. (B) Die Detektion der ZEB1- und der GRHL2-Genexpression in den mit ZEB1#1 shRNA- und ZEB1#3-transduzierten MDA-MB-231-Zellen erfolgte im Vergleich zu den Kontrollen mit Hilfe der qRT-PCR-Analyse. Der Fold Change beschreibt den relativen Expressionsunterschied.

Es zeigte sich, dass alle getesteten shRNAs zu einer starken Reduktion des endogenen ZEB1-Proteins im Vergleich zu den parentalen Zellen und Zellen, die mit einer *non-target* shRNA als zusätzliche Kontrolle transduziert wurden, führten (Abb. 3-26-A). Auffallend war, dass bei Transduktion der Zellen mit ZEB1#1 shRNA und ZEB1#3 shRNA die GRHL2-Expression im Vergleich zu den Kontrollen stark anstieg (Abb. 3-26-A). Der *Knockdown* der ZEB1-Expression und die einhergehende Zunahme der GRHL2-Expression im Vergleich zur parentalen und zur *non-target* shRNA-transduzierten Zelllinie konnte mittels qRT-PCR-Analyse für die ZEB1#1 shRNA und ZEB1#3 shRNA bestätigt werden (Abb. 3-26-B).

Mit Hilfe des *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) sollte herausgefunden werden, ob das ZEB1-Protein an die Sequenzen der E- und Z-Boxen bindet. Dafür wurde zunächst die ZEB1-cDNA mit Hilfe der Oligonukleotide ZEB1-up\_2 und ZEB1-do\_2 aus der Zelllinie MDA-MB-231 amplifiziert und in den phCMV3-Vektor (phCMV3/ZEB1) kloniert. Anschließend wurde dieses Expressionsplasmid in einer gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion eingesetzt. Im EMSA konnte gezeigt werden, dass ZEB1 an die radioaktiv-markierten Oligonukleotide, die jeweils eine der spezifischen E- oder Z-Box-Sequenzen einschlossen, band (Abb. 3-27-A).



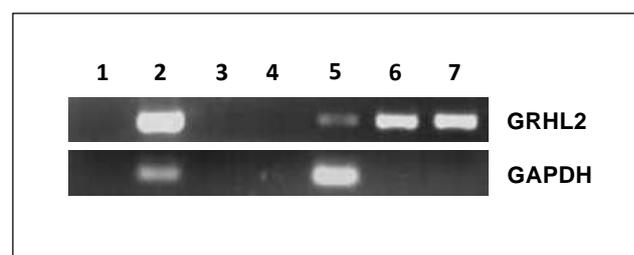
**Abb. 3-27: Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) für das ZEB1-Protein.**

(A) Es wurde eine gekoppelte Transkriptions-/Translationsreaktion durchgeführt und die *in vitro* hergestellten ZEB1-Proteine zusammen mit den radioaktiv-markierten Oligonukleotiden, die je eine der Z-/E-Boxen mit der ZEB1-Erkennungssequenz enthielten, für die Bindungsreaktion eingesetzt. Als Kontrolle diente eine Transkriptions-/Translationsreaktion ohne phCMV3/ZEB1. „1“: ohne Protein; „2“: mit Protein. Der schwarze Pfeil zeigt die Position des ZEB1-Proteins. (B) Man sieht die Bindungsreaktionen mit Zellkernextrakten von transient transfizierten HEK-293T-Zellen mit phCMV3/ZEB1. Es wurde das radioaktiv-markierte Oligonukleotid mit der ZEB1-Konsensus-Erkennungssequenz der Z-Box 2 verwendet. Als Kontrolle dienten Bindungsreaktionen ohne Kernextrakt. Die Spezifität der Bindung wurde durch die Zugabe eines nicht-markierten Oligonukleotids mit Wildtyp (GRHL2-WT) oder mutierter ZEB1-Konsensus-Erkennungssequenz (GRHL2-MT) und über den *Supershift* mit dem ZEB1-H-102-Antikörper gezeigt. Als Negativkontrolle diente der NFκB p65-Antikörper. Der schwarze Pfeil zeigt die Position des ZEB1-Proteins, der weiße Pfeil die Position des *Supershifts*.

In einem zweiten Experiment wurde das phCMV3/ZEB1-Plasmid in HEK-293T-Zellen transient zur Expression gebracht und anschließend wurden Zellkernextrakte hergestellt. In Abb. 3-27-B ist ein repräsentativer EMSA dargestellt, bei dem radioaktiv-markierte Oligonukleotide mit der ZEB1-

Konsensus-Erkennungssequenz der Z-Box 2 eingesetzt wurden. Eine Bindungsreaktion ohne Kernextrakt diente als Kontrolle. Die Spezifität der Bindung wurde zudem durch Konkurrenzexperimente mit nicht-markierten Oligonukleotiden (Tab. 8-8), die die wild-typischen (WT, TACCTG) oder die mutierten ZEB1-Erkennungssequenzen (MT, TACCGG) enthielten, demonstriert. Zusätzlich konnte ein *Supershift* des Proteins mit dem ZEB1-H-102-Antikörper erwirkt werden, wobei der NFkB p65-Antikörper als Negativkontrolle fungierte (Abb. 3-27-B). Diese Ergebnisse zeigten, dass ZEB1 *in vitro* an alle drei E- und Z-Box-Sequenzen im humanen GRHL2-Promotor zu binden in der Lage war.

Im letzten Schritt der Untersuchungen sollte mittels eines Chromatin-Immunopräzipitations-Assays (ChIP) festgestellt werden, ob der GRHL2-Promotor auch *in vivo* durch ZEB1 besetzt ist. Dafür wurde die Zelllinie MDA-MB-231 mit starker endogener ZEB1-Expression verwendet. Die Proteine wurden mit einer Formaldehydlösung an der DNA fixiert und die Chromatin/Protein-Komplexe anschließend durch Ultraschallbehandlung zerkleinert. Die Immunpräzipitation der an das Chromatin gebundenen Proteine wurde mit zwei spezifischen ZEB1-Antikörpern (H-102 und HPA027524) im Vergleich zu verschiedenen Kontrollen durchgeführt (Abb. 3-28). Alle Präzipitationen dienten als Matrize in einer RT-PCR-Analyse mit GRHL2-spezifischen Oligonukleotiden (Tab. 8-5), deren Amplikon alle drei E- und Z-Boxen abdeckte. Aus den Immunpräzipitationen mit den ZEB1-Antikörpern gelang eine Amplifikation der GRHL2-DNA, nicht jedoch aus den Negativkontrollen (Abb. 3-28, oben). Die Amplifikation der GAPDH-DNA diente als Positivkontrolle (Abb. 3-28, unten). Abschließend ließ sich festhalten, dass eine Bindung von ZEB1 an den GRHL2-Promotor auch *in vivo* nachweisbar war.



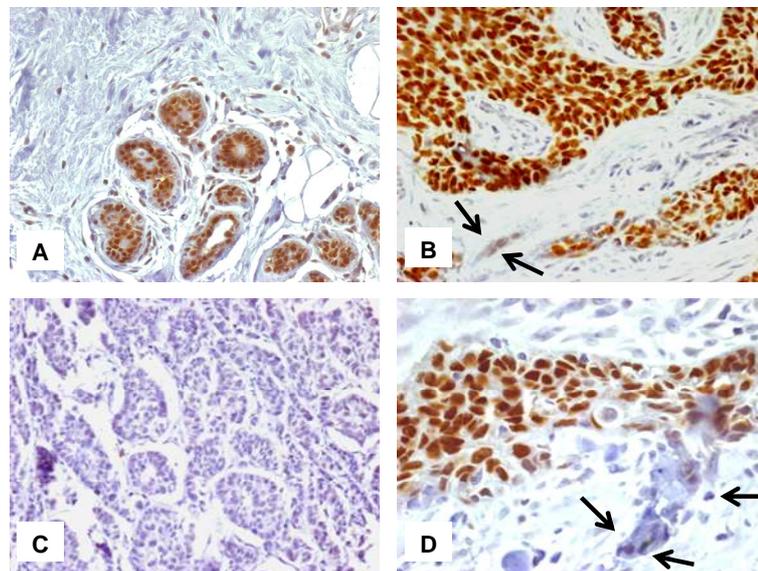
**Abb. 3-28: Chromatin Immunoprecipitation Assay (ChIP) für das ZEB1-Protein.**

Die Chromatin/Protein-Komplexe aus MDA-MB-231-Zellen wurden mit dem ZEB1-H-102- (Bahn 6) und dem ZEB1-HPA027524-Antikörper (Bahn 7) immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitationen ohne Antikörper (Bahn 3), mit Immunglobulin G (Active Motif, Bahn 4) und mit RNA pol II-Antikörper (Bahn 5) dienten als Kontrollen. Das für alle Präzipitationen eingesetzte Chromatin ist in Bahn 2 dargestellt. Das immunpräzipitierte Chromatin wurde mittels RT-PCR und GRHL2-spezifischen Oligonukleotide, die die regulatorische Region im GRHL2-Promotor abdeckten, amplifiziert (oben). Als Negativkontrolle dienten GAPDH-spezifische Oligonukleotide (unten). Kontrollreaktionen ohne Chromatin sind in Bahn 1 gezeigt.

Somit stellt einer der Regulationsmechanismen der GRHL2-Expression in humanen Mammakarzinomzelllinien vermutlich der Transkriptionsfaktor ZEB1 dar, der eine unterdrückende Wirkung auf die GRHL2-Expression hat.

### 3.3 GRHL2-Proteinexpression in humanen Mammakarzinomen

Um die pathophysiologische Relevanz des GRHL2-Transkriptionsfaktors für das humane Mammakarzinom zu untersuchen, wurden immunhistochemische Studien zur GRHL2-Proteinexpression durchgeführt. Unter Verwendung des polyklonalen GRHL2-P2-Antikörpers wurden zunächst 55 Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete normale und maligne Brustgewebe untersucht. Dabei konnte im Normalgewebe sowie in den meisten Tumoren eine hauptsächlich nukleäre Färbung festgestellt werden. In einigen Tumoren wurde interessanterweise keine oder nur eine sehr schwache GRHL2-Expression nachgewiesen, was auf eine Herunterregulation des Proteins während der Tumorprogression schließen lässt. Weiterhin war in einigen Proben der Verlust der GRHL2-Expression an der Invasionsfront des Tumors und in einzelnen Zellen, die keinen Kontakt mehr zum Primärtumor aufwiesen, zu beobachten (Abb. 3-29).



**Abb. 3-29: Immunhistochemischer Nachweis der GRHL2-Expression in normalem Brustdrüsengewebe und Mammakarzinomen.**

(A) Nukleäre GRHL2-Färbung in Normalgewebe. (B) Invasives duktales Mammakarzinom mit starker Kernfärbung für GRHL2. (C) Invasives duktales Karzinom ohne GRHL2-Expression. (D) Vergrößerung des invasiven Karzinoms aus B. Der Verlust der GRHL2-Expression an der Invasionsfront und in einzelnen Zellen, die keinen Kontakt mehr zum Primärtumor aufweisen ist mit Pfeilen gekennzeichnet. GRHL2-P2-Antikörper (braun); Kerngegenfärbung mit Hemalaun (blau). Originalvergrößerungen: A-C: x100; D: x400.

In einer zweiten Studie wurde ein Mammakarzinom-TMA mit Gewebeschnitten von Primärtumoren der Brust (n=2271) (Simon and Sauter 2002), der freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Guido Sauter (UKE Hamburg, Institut für Pathologie) für diese Studien zur Verfügung gestellt wurde, mit Hilfe des GRHL2-P2-Antikörpers immunhistologisch untersucht. Die GRHL2-Expression wurde mit den in Tab. 3-3 aufgeführten, für den TMA vorliegenden, klinisch-pathologischen Parametern korreliert. Die Ergebnisse zeigten, dass lobuläre Karzinome signifikant häufiger eine hohe GRHL2-Expression aufwiesen als duktale Mammakarzinome ( $p=0.016$ ). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die GRHL2-Expression mit der Expression der Estrogen- ( $p<0.0001$ ) und Progesteronrezeptoren ( $p<0.0001$ ) in den Tumoren signifikant korrelierte. Interessanterweise zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen einer hohen GRHL2-Expression und steigender Tumorgöße ( $p<0.0001$ ) bzw. vorhandenen Lymphknotenmetastasen ( $p<0.023$ ).

Insgesamt stehen die Resultate aus den immunhistochemischen Untersuchungen im Einklang mit den vorhergehenden Ergebnissen und unterstützen die unterdrückende Rolle von GRHL2 während der Progression des humanen Mammakarzinoms.

Tab. 3-3: Untersuchung der GRHL2-Proteinexpression in humanen Mammakarzinomen.

Tumor Klassifizierung	GRHL2-Expression*				P-Wert**
	0	1	2	3	
<b>Total (n=1510)</b>					
<b>Histologischer Typ (n=1273)</b>					
Duktale Karzinome (n=1085)	32	156	344	553	p=0.016
Lobuläre Karzinome (n=188)	3	18	48	119	
<b>Lymphknotenstatus (n=1243)</b>					
pN0 (n=620)	11	79	214	316	p=0.023
pN1/2 (n=623)	23	86	174	340	
<b>Tumorstadium (n=1502)</b>					
pT1 (n=487)	7	48	167	265	p<0.0001
pT2 (n=739)	22	101	235	381	
pT3 (n=90)	6	14	26	44	
pT4 (n=186)	10	40	51	85	
<b>Differenzierungsgrad (n=1411)</b>					
G1 (n=349)	12	42	118	177	n.s.
G2 (n=567)	14	77	160	316	
G3 (n=495)	14	79	166	236	
<b>Mitotischer Index (n=1409)</b>					
M1 (n=710)	22	83	218	387	p=0.055
M2 (n=263)	8	35	88	132	
M3 (n=436)	11	81	134	210	
<b>ER (n=1448)</b>					
Negativ (n=348)	18	71	122	137	p<0.0001
Positiv (n=1100)	25	129	338	608	
<b>PR (n=1510)</b>					
Negativ (n=1025)	38	167	339	481	p<0.0001
Positiv (n=485)	7	38	142	298	
<b>Alter (n=1231)</b>					
<50 (n=232)	4	27	69	132	n.s.
≥50 (n=999)	36	129	328	506	

\*: Intensität der Immunfärbung; 0: keine, 1: schwache, 2: mäßige, 3: starke GRHL2-Expression

\*\* : n.s.; nicht signifikant

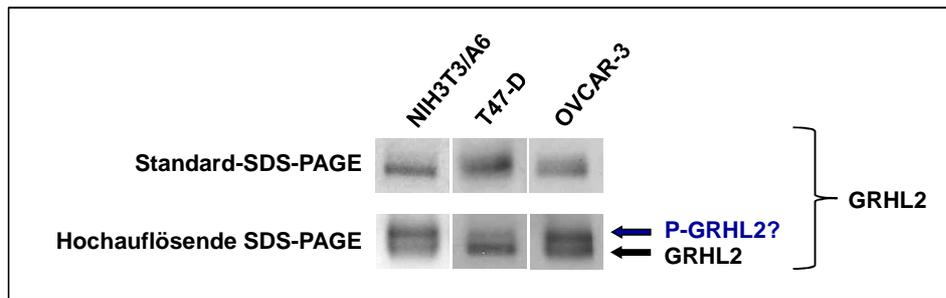
### 3.4 Regulation der GRHL2-Aktivität durch Phosphorylierung

Die Auswertung der immunhistologischen Analysen ergab keinen gravierenden Unterschied in der GRHL2-Expression zwischen Normal- und der Mehrzahl der Tumorgewebe (Kap. 3.3). Umgekehrt induzierte die funktionelle Inaktivierung des *GRHL2*-Gens über einen *Knockdown* der GRHL2-Expression oder durch die Überexpression eines dominant-negativ wirkenden GRHL2-Genprodukts eine starke Repression der Tumorzellproliferation in den Mammakarzinomzelllinien (Kap. 3.1.2 und Kap. 3.1.3). Aus diesen Ergebnissen ließ sich ableiten, dass das onkogene Potential von GRHL2 in den Tumorzellen nicht auf ein verändertes Expressionsniveau, sondern durch eine Interaktion mit anderen Molekülen bedingt und/oder auf posttranslationale Modifikationen (PTMs) zurückzuführen sein könnte.

#### 3.4.1 Identifizierung von Threonin<sup>211</sup> als mögliche Phosphorylierungsstelle des GRHL2-Proteins

In dieser Arbeit standen Untersuchungen zur möglichen Phosphorylierung des GRHL2-Transkriptionsfaktors im Vordergrund, da es in der Literatur zahlreiche Hinweise gab, dass Mitglieder der *grainyhead*-Familie von Transkriptionsfaktoren durch den MAPK-Signalweg in ihrer Aktivität reguliert werden (Pagon, Volker et al. 2003; Mace, Pearson et al. 2005; Saxena, Powell et al. 2009; Kim and McGinnis 2010; Saxena, Owens et al. 2010).

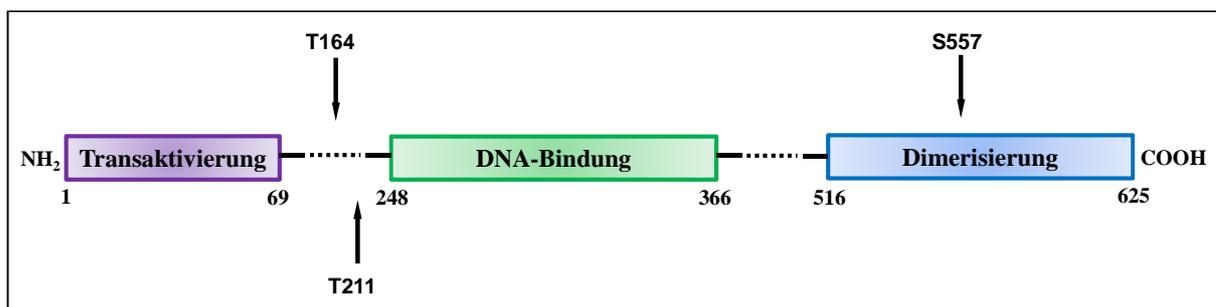
Einen ersten Hinweis auf eine mögliche Phosphorylierung des GRHL2-Proteins lieferte eine Gelelektrophorese mit höherer Auflösung und einer anschließenden Immunoblot-Analyse. Wie in Abb. 3-30 zu sehen, ließen sich die Signale für das GRHL2-Protein in stabil transfizierten NIH3T3-Fibroblasten sowie in einer Mamma- und in einer Ovarialkarzinomzelllinie unter diesen experimentellen Bedingungen in zwei Banden auftrennen.



**Abb. 3-30: Untersuchung des GRHL2-Proteinmusters mittels SDS-PAGE.**

Es wurden die genannten Zelllinien mittels Standard-SDS-PAGE im Vergleich zu einer SDS-PAGE mit höherer Auflösung und anschließender Immunoblot-Analyse untersucht. Die Positionen der GRHL2-Proteine und der potentiell phosphorylierten GRHL2-Proteine sind mit Pfeilen markiert und wurden über den GRHL2-P1-Antikörper detektiert.

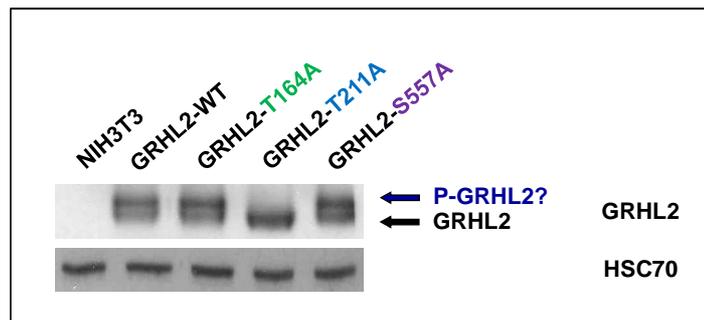
Mit Hilfe der ELM-Datenbank ([www.elm.eu.org](http://www.elm.eu.org)) wurden drei potentielle Konsensus-Sequenzen (S/TP-Motiv) für die Phosphorylierung durch den *mitogen activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg innerhalb des GRHL2-Proteins (T<sup>164</sup>, T<sup>211</sup>, S<sup>557</sup> (Abb. 3-31)) und verschiedene Bindungsstellen (*docking-Motive*) für die *extracellular signal-regulated kinases* (ERK1/2) identifiziert.



**Abb. 3-31: Schematische Darstellung der potentiellen Phosphorylierungsstellen des GRHL2-Proteins.**

Es sind die potentiellen Phosphorylierungsstellen für den MAPK-Weg in relativer Lage zu den funktionellen Domänen des Transkriptionsfaktors eingezeichnet.

Um zu testen, ob die potentielle Phosphorylierung an den genannten Aminosäuren einen Einfluss auf das Laufverhalten der Proteine in der SDS-PAGE hat, wurde die GRHL2-cDNA zunächst mit Hilfe der Oligonukleotide FL-A-f und GRHL2-2 (Tab. 8-5) aus GI-101-Mammakarzinomzelllinien amplifiziert und in den pBluescript II SK (+/-)-Vektor (pBSKII/GRHL2<sup>WT</sup>) kloniert. Durch eine zielgerichtete Mutagenese-PCR wurden die identifizierten Aminosäuren unter Verwendung von Oligonukleotiden mit eingefügter Mutation zu Alanin umgebaut (pBSKII/GRHL2<sup>T164A, T211A, S557A</sup>). Anschließend wurden die GRHL2-Wildtyp-cDNA (GRHL2<sup>WT</sup>) und die generierten DNAs der Mutanten in den pMXs-Vektor (pMXs/GRHL2<sup>WT, T164A, T211A, S557A</sup>) umklontiert. Für die stabile Expression des Transgens in NIH3T3-Fibroblasten wurden retrovirale Gentransfers durchgeführt.

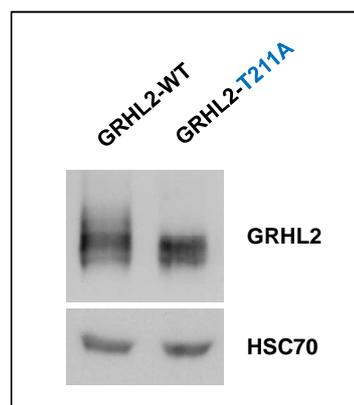


**Abb. 3-32: Untersuchung der mittels Mutagenese-PCR generierten GRHL2-Mutanten.**

Es wurde eine Western Blot-Analyse der an Aminosäureposition  $T^{164}$ ,  $T^{211}$  und  $S^{557}$  zu Alanin mutierten GRHL2-Proteine im Vergleich zum Wildtyp-Protein vorgenommen und mittels GRHL2-P1-Antikörper detektiert. NIH3T3-Fibroblasten (Bahn 1) dienten als Rezipientenzelllinie. Die Kontrolle identischer Ladung erfolgte über das HSC70-Protein.

In Abb. 3-32 ist zu sehen, dass nach der Gelelektrophorese mit höherer Auflösung und anschließender Immunoblot-Analyse nur die Mutation der Aminosäure  $T^{211}$  zu Alanin dazu führte, dass das in der SDS-PAGE langsamer-migrierende GRHL2-Protein verschwand. Einen Einfluss auf die transformierenden Eigenschaften des GRHL2-Proteins hatten die einzelnen Mutationen jedoch nicht.

Interessanterweise zeigte sich in einem weiterführenden Experiment, dass die Auftrennung des  $GRHL2^{WT}$ - und sogar des  $GRHL2^{T211A}$ -Proteins mittels SDS-PAGE in einem noch stärker auflösenden Gel ein multiples Bandenmuster erzeugte (Abb. 3-33). Diese hohe Anzahl an GRHL2-Proteinen mit differentem Migrationsverhalten legte den Schluss nahe, dass vermutlich verschiedene postranslationale Modifikationen (PTMs) an der Regulation des GRHL2-Transkriptionsfaktors beteiligt sind und weiter untersucht werden sollten.



**Abb. 3-33: Untersuchung des GRHL2-Proteinmusters in einem hochauflösenden Gel mittels SDS-PAGE.**

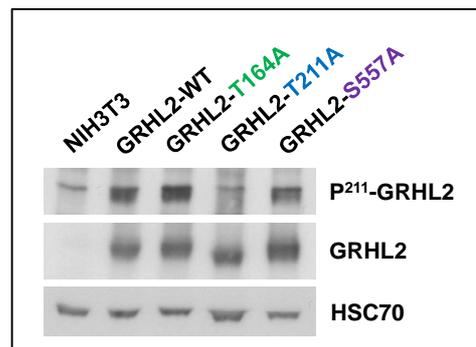
Es sind die  $GRHL2^{WT}$ - und die an Aminosäureposition  $T^{211}$  zu Alanin mutierten GRHL2-Proteine mittels hochauflösender SDS-PAGE im Maxigel mit anschließender Immunoblot-Analyse dargestellt. NIH3T3-Fibroblasten dienten als Rezipientenzelllinie. Die Detektion der GRHL2-Proteine erfolgte über den GRHL2-P1-Antikörper und der Nachweis identischer Ladung wurde mittels HSC70-Antikörper erbracht.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass das GRHL2-Protein möglicherweise an der Aminosäure T<sup>211</sup> phosphoryliert wird. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Studien der Fokus auf diese mögliche Phosphorylierungsstelle innerhalb des GRHL2-Proteins gelegt.

### 3.4.2 Generierung phosphorylierungsspezifischer P<sup>211</sup>-GRHL2-Antikörper

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörper, die gegen das an Aminosäure T<sup>211</sup> phosphorylierte Protein gerichtet sind, wurden zwei Kaninchen mit dem Peptid YLKDDQRS(pT)PDYTYSES immunisiert und die Seren aufgereinigt (P<sup>211</sup>-GRHL2-1 und P<sup>211</sup>-GRHL2-2). Dazu wurde eine Positiv-Negativ-Selektion zur Anreicherung phosphospezifischer Antikörper, wie in Kap. 2.4.2.1 beschrieben, vorgenommen.

Eine Western Blot-Analyse von NP40-Gesamtzellextrakten der in 3.4.1 hergestellten NIH3T3-Fibroblasten mit stabiler Überexpression der Mutanten zeigte, dass der P<sup>211</sup>-GRHL2-1-Antikörper alle GRHL2-Proteine bis auf die GRHL2<sup>T211A</sup>-Mutante erkannte (Abb. 3-34).

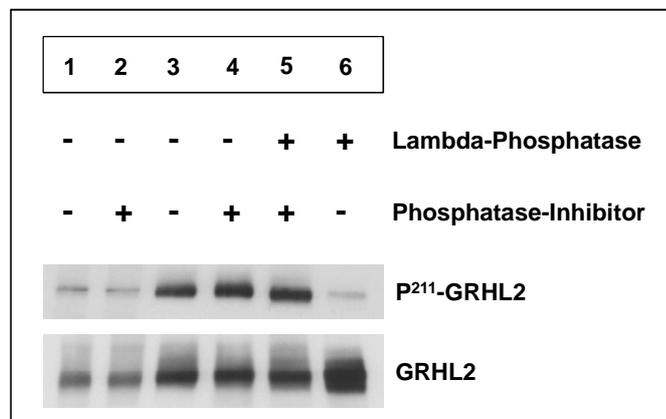


**Abb. 3-34: Untersuchung der GRHL2-Mutanten mit dem P<sup>211</sup>-GRHL2-1-Antikörper.**

Gezeigt ist die Western Blot-Analyse der an Aminosäureposition T<sup>164</sup>, T<sup>211</sup> und S<sup>557</sup> zu Alanin mittels Mutagenese-PCR mutierten GRHL2-Proteine im Vergleich zum Wildtyp-Protein detektiert mittels P<sup>211</sup>-GRHL2-1- und GRHL2-P1-Antikörper. NIH3T3-Fibroblasten (Bahn 1) dienen als Rezipientenzelllinie. Der Nachweis identischer Beladung des Gels erfolgte über das HSC70-Protein.

Zur weiteren Charakterisierung des P<sup>211</sup>-GRHL2-1-Antikörpers wurde eine Dephosphorylierung des GRHL2<sup>WT</sup>-Proteins mit der Lambda-Phosphatase durchgeführt. Dazu wurde die Zelllinie HEK-293T mit dem in Kap. 3.1.1 hergestellten pMXs-IP/GRHL2-Konstrukt transient transfiziert. An den C-Terminus der Proteine war über das 3'-Oligonukleotid eine zusätzliche Hämagglutinin (HA)-Aminosäure-Erkennungssequenz fusioniert, so dass mit Hilfe eines an die Agarose-Matrix gekoppelten Anti-HA-Antikörpers eine Immunpräzipitation der HA-Fusionsproteine durchgeführt werden konnte. Diese immunpräzipitierten Proteine wurden anschließend mit Lambda-Phosphatase dephosphoryliert und das Ergebnis im Vergleich zu den Kontrollen mittels Western Blot-Analyse ausgewertet.

In Abb. 3-35 ist zu erkennen, dass der P<sup>211</sup>-GRHL2-1-Antikörper alle GRHL2-Proteine, nur nicht das dephosphorylierte Protein (Bahn 6), erkannte.



**Abb. 3-35: Dephosphorylierung des GRHL2-Proteins mittels Lambda-Phosphatase.**

Gezeigt ist eine Western Blot-Analyse des Gesamtzellextrakts (Bahnen 1 und 2) und der immunpräzipitierten GRHL2-HA-Fusionsproteine (Bahnen 3 bis 6) aus transient transfizierten HEK-293T-Zellen. Es wurden NP40-Extrakte mit Phosphatase- (Bahn 1) und ohne Phosphatase-Inhibitoren (Bahn 2) hergestellt und anschließend präzipitiert. Die Zugabe von Lambda-Phosphatase und Phosphatase-Inhibitoren erfolgte wie angegeben. Die Detektion der Proteine erfolgte jeweils mit dem P<sup>211</sup>-GRHL2-1- und dem GRHL2-P1-Antikörper.

Insgesamt zeigte sich, dass keine Bindung der generierten P<sup>211</sup>-GRHL2-1-Antikörper an das an Aminosäureposition T<sup>211</sup> zu Alanin mutierte Protein und das mittels Lambda-Phosphatase dephosphorylierte GRHL2-Protein nachgewiesen werden konnte. Es wurde damit ein GRHL2-Antikörper hergestellt, der spezifisch für die Phosphorylierung des GRHL2-Proteins an Aminosäure T<sup>211</sup> ist.

Zusätzlich zu den Kaninchen wurden fünf Mäuse mit dem Peptid YLKDDQRS(pT)PDYTYSES immunisiert, um sich die Möglichkeit offen zu halten, monoklonale Antikörper herzustellen. Die polyklonalen Mausseren wurden nach der Immunisierung in einem ersten Test am GRHL2<sup>WT</sup>- und GRHL2<sup>T211A</sup>-Protein mittels Western Blot-Analyse untersucht und zeigten eine Spezifität für das phosphorylierte Protein an Aminosäure T<sup>211</sup> (Daten nicht gezeigt). Die Milzen der Mäuse wurden entnommen, tiefgefroren und stehen zur Produktion von monoklonalen Antikörpern zur Verfügung.

### 3.4.3 GRHL2 wird vermutlich nicht über ERK1/2 phosphoryliert

Durch bioinformatische Analysen und Datenbankrecherchen wurden verschiedene Konsensus-Sequenzen für Kinasen identifiziert, die an der Phosphorylierung der Aminosäure T<sup>211</sup> im GRHL2-Protein beteiligt sein könnten (Tab. 3-4). Da es Hinweise in der Literatur gab, dass Mitglieder der *grainyhead*-Familie von Transkriptionsfaktoren durch den MAPK-Signalweg über ERK1/2 in ihrer

Aktivität reguliert werden (Pagon, Volker et al. 2003; Mace, Pearson et al. 2005; Saxena, Powell et al. 2009; Kim and McGinnis 2010; Saxena, Owens et al. 2010), wurde zunächst getestet, ob GRHL2 ebenfalls über ERK1/2 reguliert wird.

**Tab. 3-4: Identifizierte Kinasen, die an der Phosphorylierung von T<sup>211</sup> im GRHL2-Protein beteiligt sein könnten.**

Datenbank/ Programm	Kinase <sup>1)</sup>						
	MAPK	GSK3	Cdc2	CDK5	Casein Kinase 1	PKA	PKC
ELM <sup>2)</sup>	MAPK	x	-	-	-	-	-
Phospho Motif Finder <sup>3)</sup>	ERK1	x	-	x	x	x	x
	ERK2						
Scansite 3 <sup>4)</sup>	-	x	x	x	-	-	-
NetPhosK 1.0 <sup>5)</sup>	p38	x	-	x	-	-	-
KinasePhos <sup>6)</sup>	MAPK	-	-	-	-	x	-

<sup>1)</sup> Name der Kinase; X: als phosphorylierende Kinase mit Hilfe der jeweiligen Datenbank/des jeweiligen Programms identifiziert; -: kein Treffer

<sup>2)</sup> [www.elm.eu.org](http://www.elm.eu.org)

<sup>3)</sup> [http://www.hprd.org/PhosphoMotif\\_finder](http://www.hprd.org/PhosphoMotif_finder)

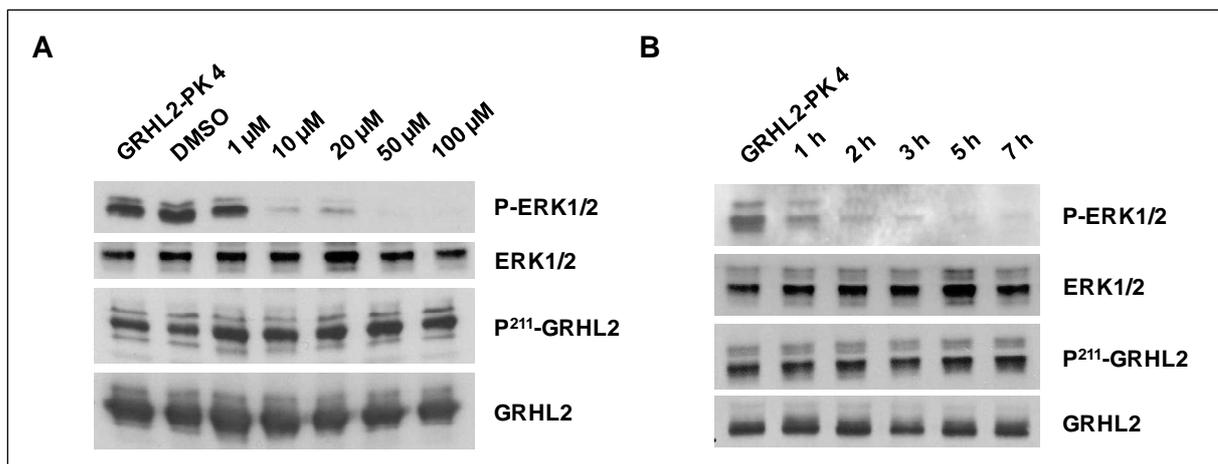
<sup>4)</sup> <http://scansite3.mit.edu/#home>

<sup>5)</sup> <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>

<sup>6)</sup> <http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/>

Dazu wurden verschiedene Untersuchungen mit dem MEK1 (*mitogen-activated protein kinase kinase 1*)-Inhibitor PD98059 durchgeführt. MEK1/2 ist die Kinase, die durch Phosphorylierung ERK1/2 aktiviert. Wird der Inhibitor dem Zellkulturmedium zugesetzt, bindet dieser an die inaktive Form von MEK1 und verhindert so ihre Aktivierung. Für diese Analysen wurde die in Kap. 3.1.1 generierte Zelllinie MDA-MB-231/GRHL2-PK 4 mit sehr starker GRHL2-Expression eingesetzt. Das Zellkulturmedium wurde mit verschiedenen Mengen des Inhibitors versetzt, um zunächst die Wirkung des PD98059 zu testen. Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse (Abb. 3-36-A) lassen erkennen, dass nach Zugabe des Inhibitors die Konzentration der phosphorylierten ERK1/2-Proteine im Vergleich zu parental Zellen und Zellen, die nur mit DMSO versetzt wurden und als zusätzliche Kontrolle dienten, stark abnahm. Die Konzentration der Gesamt-ERK1/2-Proteine blieb dabei stabil. Eine Abnahme des mit dem P<sup>211</sup>-GRHL2-1-Antikörper detektierten GRHL2-Proteins im Vergleich zu den Kontrollen oder der Gesamtmenge an GRHL2-Protein, die mit Hilfe des GRHL2-P1-Antikörpers dargestellt wurde, war nicht zu beobachten.

Weiterhin wurde ein Zeitexperiment mit dem PD98059 an der Zelllinie MDA-MB-231/GRHL2-PK 4 (Kap. 3.1.1) vorgenommen. Dafür wurden die Zellen mit dem Inhibitor (Endkonzentration 100  $\mu\text{M}$ ) über einen Zeitraum von 7 h behandelt. Es zeigte sich bei der Detektion mittels Western Blot-Analyse und dem P<sup>211</sup>-GRHL2-1-Antikörper erneut kein Einfluss auf die Konzentration des phosphorylierten GRHL2-Proteins im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 3-36-B).



**Abb. 3-36: Studien zur GRHL2-Phosphorylierung mittels MEK1-Inhibitor.**

(A) Der Zelllinie MDA-MB-231/GRHL2-PK 4 wurden verschiedene Konzentrationen von PD98059 zugesetzt und die Abnahme der ERK1/2-Phosphorylierung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen und Zellen, die nur mit DMSO versetzt wurden und als zusätzliche Kontrolle dienten, mittels Western Blot-Analyse überprüft. (B) Der Inhibitor wurde zu einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  dem Kulturmedium der MDA-MB-231/GRHL2-PK 4-Zellen zugegeben und die Abnahme der ERK1/2-Phosphorylierung nach 1 h, 2 h, 3 h, 5 h und 7 h im Vergleich zu den unbehandelten Zellen mittels Western Blot-Analyse überprüft. In beiden Experimenten wurde weiterhin die Konzentration an Gesamt-ERK1/2 und die GRHL2-Proteinexpression mit dem phosphospezifischen P<sup>211</sup>-GRHL2-1- und dem GRHL2-P1-Antikörper detektiert.

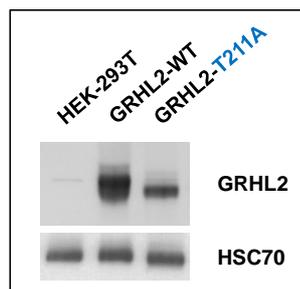
Die Konzentration der phosphorylierten ERK1/2-Proteine dagegen nahm nach der Behandlung mit dem Inhibitor stark ab und zeigte, dass die Inhibition von MEK1 erfolgreich war. Die Konzentrationen der Gesamt-ERK1/2- und Gesamt-GRHL2-Proteine, die als Kontrolle dienten, blieben stabil.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der MEK1-Inhibitor die Phosphorylierung dieser Kinase und damit auch die Phosphorylierung der ERK1/2-Proteine unterbinden konnte. Die IC<sub>50</sub> des Inhibitors lag dabei bei ungefähr 5-10  $\mu\text{M}$ . Somit konnte kein Hinweis auf eine Phosphorylierung von GRHL2 durch ERK1/2 an Aminosäure T<sup>211</sup> gefunden werden.

#### 3.4.4 Die Phosphorylierung an T<sup>211</sup> beeinflusst die Stabilität des GRHL2-Proteins

Auffällig bei allen Analysen war, dass bei jeder transienten oder stabilen Transfektion des GRHL2<sup>T211A</sup>-Proteins ein deutlich niedrigeres Expressionsniveau als für das GRHL2<sup>WT</sup>-Protein erzielt werden

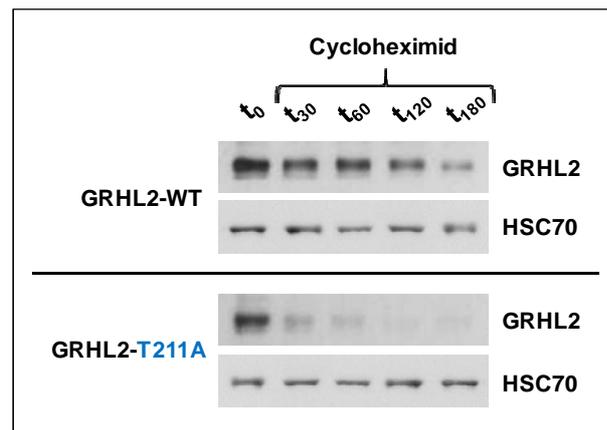
konnte. Als Beispiel sind HEK-293T-Zellen gezeigt, die mit dem in Kap. 3.1.1 hergestellten pMXs-IP/GRHL2-Konstrukt transient transfiziert wurden. Zusätzlich wurde die GRHL2<sup>T211A</sup>-cDNA aus dem als Matrize dienenden pBSKII/GRHL2<sup>T211A</sup>-Plasmid mit den Oligonukleotiden GRHL2-13 und GRHL2-12 (Tab. 8-5) amplifiziert, in den Expressionsvektor pMXs-IP kloniert (pMXs-IP/GRHL2<sup>T211A</sup>) und ebenfalls in HEK-293T Zellen transient zur Expression gebracht. In Abb. 3-37 erkennt man den drastischen Expressionsunterschied zwischen dem GRHL2<sup>WT</sup>- und dem GRHL2<sup>T211A</sup>-Protein unter identischen Bedingungen.



**Abb. 3-37: Expressionsstärke des GRHL2<sup>WT</sup>- und GRHL2<sup>T211A</sup>-Proteins.**

In HEK-293T-Zellen wurden GRHL2<sup>WT</sup>- und GRHL2<sup>T211A</sup>-Proteine transient zur Expression gebracht und mittels Western Blot-Analyse mit dem GRHL2-P1-Antikörper untersucht. Als Kontrolle gleicher Ladung diente das HSC70-Protein.

Um zu untersuchen, ob es einen Unterschied in der Stabilität der an T<sup>211</sup> phosphorylierten und unphosphorylierten GRHL2-Proteine gibt, wurde ihre Halbwertszeit mit Hilfe des Antibiotikums Cycloheximid, das die Proteinbiosynthese in Eukaryonten unterbindet, bestimmt. Für diese Untersuchungen wurde die in Kap. 3.1.1 hergestellte Zelllinie MDA-MB-231/GRHL2-PK 4 verwendet. Zusätzlich wurden  $\psi$ NX-ampho-Zellen mit dem pMXs-IP/GRHL2<sup>T211A</sup>-Plasmid transfiziert, die MDA-MB-231-Zellen mit den retroviralen Überständen infiziert und mit 1  $\mu$ g/ml Puromycin selektiert. Beide Zelllinien wurden mit Cycloheximidhaltigem Zellkulturmedium behandelt und der Abbau der bereits vorhandenen GRHL2<sup>WT</sup>- und GRHL2<sup>T211A</sup>-Proteine wurde über einen definierten Zeitraum von bis zu 3 h verfolgt. In Abb. 3-38 ist zu sehen, dass die Proteine mit der Mutation von Aminosäure T<sup>211</sup> zu Alanin schneller abgebaut wurden als die GRHL2<sup>WT</sup>-Proteine. Die Halbwertszeit für das GRHL2<sup>WT</sup>-Protein betrug ungefähr 60 min, für das an Aminosäure T<sup>211</sup> mutierte Protein war sie deutlich kleiner als 30 min.



**Abb. 3-38: Halbwertszeitbestimmung mittels Cycloheximid.**

Es ist die Western Blot-Analyse der Zelllinien MDA-MB-231/GRHL2-PK 4 (GRHL2<sup>WT</sup>) und /GRHL2<sup>T211A</sup> mit dem GRHL2-P1-Antikörper, deren Proteinbiosynthese gehemmt wurde, zu sehen. Die Abnahme der bereits vorhandenen Proteine über die Zeit im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ist dargestellt. Als Kontrolle identischer Ladung diente die HSC70-Proteinexpression. Das hier gezeigte identische Expressionsniveau zum Zeitpunkt  $t_0$  beider Proteine wurde künstlich über die eingesetzte Proteinmasse in der Western Blot-Analyse und die Expositionszeit des Röntgenfilms herbeigeführt.

Insgesamt hat sich eine Phosphorylierung an Aminosäure T<sup>211</sup> als wahrscheinlich herausgestellt und es konnten phosphorylierungsspezifische Antikörper gegen das an dieser Stelle phosphorylierte Protein hergestellt werden. Interessanterweise zeigte sich, dass der Austausch der Aminosäure T<sup>211</sup> zu Alanin zu einer Abnahme der Proteinstabilität im Vergleich zum GRHL2<sup>WT</sup>-Protein führte. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass erstmals Hinweise für eine Regulation der Aktivität des GRHL2-Transkriptionsfaktors durch Phosphorylierung an T<sup>211</sup> gefunden werden konnten.

## 4 Diskussion

Sowohl die Identifizierung als auch die strukturelle und funktionelle Charakterisierung neuer Mammakarzinom-assoziiertes Gene ist eine Grundvoraussetzung für das bessere Verständnis der molekularen Mechanismen, die dieser Erkrankung zu Grunde liegen. Die entsprechenden Genprodukte könnten mögliche neue Zielstrukturen für innovative therapeutische Ansätze zur Behandlung von Patientinnen mit Mammakarzinom darstellen. In umfangreichen Vorarbeiten konnte der bisher weitestgehend uncharakterisierte Transkriptionsfaktor GRHL2 als ein neues, möglicherweise Mammakarzinom-relevantes Gen identifiziert werden. Alle Analysen zum onkogenen Potential des GRHL2-Transkriptionsfaktors wurden bisher ausschließlich in murinen, embryonalen NIH3T3-Fibroblasten durchgeführt (Werner 2009), so dass der Frage nach der pathophysiologischen Relevanz der onkogenen Eigenschaften von GRHL2 für das Mammakarzinom eine herausragende Bedeutung zukommt. Ziel des Promotionsvorhabens war es deshalb, die mögliche Rolle des Transkriptionsfaktors GRHL2 in der Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms näher zu untersuchen.

### 4.1 Etablierung geeigneter Modellsysteme für die Analyse der Funktion von GRHL2 in humanen Mammakarzinomzellen

Eine Voraussetzung für die Analyse der Funktion des Transkriptionsfaktors GRHL2 beim humanen Mammakarzinom stellt die Entwicklung geeigneter Modellsysteme dar. Als Grundlage hierfür stand eine Reihe von Mammakarzinomzelllinien mit unterschiedlich starker GRHL2-Expression (Kap. 1.3.3, (Werner 2009)) zur Verfügung, die für eine Überexpression von GRHL2 bzw. eine shRNA-vermittelte Herunterregulation der endogenen GRHL2-Expression genutzt werden konnten. Obwohl es im Rahmen dieser Arbeit prinzipiell gelungen ist, entsprechende Modellsysteme zur Funktionsanalyse von GRHL2 zu etablieren, traten aber auch unerwartete Schwierigkeiten bei der Etablierung eines stabilen, shRNA-vermittelten *Knockdowns* in den Mammakarzinomzelllinien auf, deren Ursachen nicht eindeutig geklärt werden konnten. Tatsächlich stellte der nicht-stabile *Knockdown* der GRHL2-Expression eine der größten Herausforderungen dieser Arbeit dar. Normalerweise ist die Herunterregulation der Genexpression ein einfaches Experiment und wurde ohne Probleme schon für verschiedene Projekte in der Arbeitsgruppe durchgeführt. GRHL2 bildete dabei die einzige Ausnahme und es wurde über zwei Jahre lang vergeblich versucht, ein Modellsystem zu etablieren. Dabei blieben alle Maßnahmen, wie die Verwendung anderer Protokolle, Expressionssysteme und shRNAs oder eine variable *multiplicity of infection* (MOI), ohne Erfolg und die GRHL2-Expression erreichte nach ca. zwei Wochen wieder nahezu ihr Ausgangsniveau. Überraschenderweise ist dieses

Phänomen laut dem technischen Service der Firma Open Biosystems, von der die hier genutzten pLKO.1-shRNA-Konstrukte bezogen wurden, aber nicht so selten, wie die Literatur vermuten lässt. Diese Informationen werden von den meisten Wissenschaftlern zurückgehalten, weil die Veröffentlichung unerklärlicher Ergebnisse von möglichen Gutachtern meist nicht gern gesehen wird. Eine seltene Ausnahme stellt das *IRX2*-Gen dar, dessen Genexpression sich nicht über einen *Knockdown* herunterregulieren ließ (Kadota, Sato et al. 2009). Resistenzmechanismen, zu denen auch *Feedback*-Schleifen hinzuzurechnen sind und die bei der Regulation von GRHL2 eine Rolle zu spielen scheinen (Kap. 4.4, (Varma, Cao et al. 2012)), könnten Mechanismen darstellen, die die Zellen entwickelt haben, um sich gegen den Verlust der Expression besonders wichtiger Gene zu schützen. Auf Grund der Schwierigkeiten, einen stabilen *Knockdown* der GRHL2-Expression in humanen Mammakarzinomzellen zu erzielen, wurde parallel versucht, durch einen dominant-negativen Ansatz ein zweites Modellsystem, in dem ebenfalls ein GRHL2-Funktionsverlust herbeigeführt wurde, zu generieren. Diese Methode zur funktionellen Inaktivierung eines Transkriptionsfaktors wurde bereits durch (Attardi, Von Seggern et al. 1993) für das *Drosophila grainyhead*-Protein beschrieben und erfolgreich durchgeführt. Für das humane GRHL2-Protein wurden dazu N-terminal trunkierte GRHL2-Proteine ohne Transaktivierungsdomäne in die Zellen eingebracht, die einen dominant-negativen Effekt auf das endogene Wildtyp-Protein ausübten und es dadurch funktionell inaktivierten. Für die funktionelle Charakterisierung des GRHL2-Transkriptionsfaktors beim humanen Mammakarzinom standen somit drei Möglichkeiten zur Entwicklung von Modellsystemen bereit: die Überexpression in einer GRHL2-defizienten Zelllinie, ein shRNA-vermittelter *Knockdown* der *GRHL2*-Genexpression und eine Inaktivierung des GRHL2-Proteins über einen dominant-negativen Ansatz in GRHL2-exprimierenden Mammakarzinomzelllinien.

#### Onkogene Eigenschaften des GRHL2-Transkriptionsfaktors in humanen Mammakarzinomzellen

Mit Hilfe der oben aufgeführten Modellsysteme sollte zunächst untersucht werden, ob GRHL2 auch in humanen Mammakarzinomzelllinien onkogene Eigenschaften besitzt. Der shRNA-induzierte *Knockdown* der GRHL2-Expression und die funktionelle Inaktivierung über ein dominant-negatives GRHL2-Genprodukt in allen untersuchten Zelllinien resultierten in einer drastischen Abnahme der Zellteilung. Dagegen ließ sich in den eher malignen Zelllinien MDA-MB-231 und BT-549, die zur „Basal-B“-Unterklasse von Mammakarzinomzelllinien gehören (Neve, Chin et al. 2006), kein nennenswerter Einfluss von GRHL2 auf die Zellproliferation detektieren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Resultaten, die durch (Cieply, Riley et al. 2012) publiziert wurden. Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beruht sowohl auf ihrer Expressionsstärke als auf einer Reihe von anderen

Mechanismen, beispielsweise dem Aktivierungszustand, der über posttranslationale Modifikationen gesteuert wird (Tootle and Rebay 2005), und der Expression von Kofaktoren (Thomas and Chiang 2006). Es ist wahrscheinlich, dass in den schlecht differenzierten Zelllinien MDA-MB-231 und BT-549 die entscheidenden Kofaktoren für eine Regulation der Epithelzellproliferation durch GRHL2 fehlten. Diese Beobachtungen legten den Schluss nahe, dass GRHL2 tatsächlich tumorfördernde Eigenschaften besitzt, auch wenn sich diese nur auf bestimmte Subtypen von Mammakarzinomzelllinien beschränkten.

Die ersten Hinweise auf onkogene Eigenschaften des GRHL2-Transkriptionsfaktors erbrachten Tanaka et al. bereits 2008, die zeigten, dass die siRNA-vermittelte Herunterregulation der *GRHL2*-Genexpression zu einer verminderten Proliferation von HuH-6-Leberkarzinomzellen führte (Tanaka, Kanai et al. 2008). Weiter stellten sie die These auf, dass eine Amplifikation des *GRHL2*-Gens auf 8q22.3 mit einem Wiederauftreten des hepatozellulären Karzinoms assoziiert ist. Nicht gezeigte Studien dieser hier vorliegenden Arbeit ergaben aber, dass das *GRHL2*-Gen in der Leberkarzinomzelllinie HuH-6 weder amplifiziert noch exprimiert ist und dass die untersuchten hepatozellulären Karzinome keine GRHL2-Expression aufwiesen (Werner 2009).

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass das zur Familie der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) gehörende *ErbB3*-Gen in NIH3T3-Fibroblasten durch GRHL2 positiv reguliert wird (Werner 2009). Dieser Regulationsmechanismus konnte für das humane *ERBB3*-Gen auch in ungefähr 50% der untersuchten Mammakarzinomzelllinien bestätigt werden. Bemerkenswert ist, dass ein veränderter Aktivierungszustand des ERBB3-Proteins, das dazu in der Lage ist mit ERBB2 (HER2) onkogene Heterodimere zu bilden, beim humanen Mammakarzinom mit einer schlechteren Überlebensrate in Verbindung gebracht wird (Sithanandam and Anderson 2008). Weiterhin trägt es bei einer zielgerichteten Therapie zur Vermittlung von Resistenzen gegen Tamoxifen (Liu, Ordonez-Ercan et al. 2007; Folgiero, Avetrani et al. 2008), Trastuzumab (Wang, Xiang et al. 2008; Narayan, Wilken et al. 2009), Lapatenib (Garrett, Olivares et al. 2011) und Gefitinib (Engelman, Zejnullahu et al. 2007; Sergina, Rausch et al. 2007) bei. Entsprechend ist davon auszugehen, dass die Regulation des *ERBB3*-Gens durch GRHL2 auch eine herausragende klinische Bedeutung besitzt.

#### *GRHL2 unterdrückt die EMT in humanen Mammakarzinomzellen*

Das vielleicht wichtigste Ergebnis dieser Arbeit stellt die Identifizierung von GRHL2 als EMT-Suppressormolekül dar. So ging beispielsweise die funktionelle Inaktivierung des *GRHL2*-Gens in allen untersuchten Mammakarzinomzelllinien mit EMT-ähnlichen Veränderungen in den Zellen einher, die

durch eine eher mesenchymale Zellmorphologie und ein stärkeres Potential zur Migration und Invasion gekennzeichnet waren. Obwohl die Steigerung der migratorischen und invadierenden Fähigkeit der Zellen, die ihnen die Möglichkeit zur Metastasierung und damit zur Bildung von Fernmetastasen verleiht, zu einem Schlüsselereignis der EMT zählt (Hanahan and Weinberg 2000), gibt es noch eine hohe Anzahl weiterer Adaptionsmechanismen die während dieses Prozesses ablaufen. Die MDA-MB-468-Zellen mit GRHL2-DN-Expression zeigten im klonogenen Assay eine erhöhte Fähigkeit als Einzelzellen heranzuwachsen, was im direkten Zusammenhang mit einem höheren Potential zum Überleben von mesenchymalen Zellen steht. Zwischen dem gesteigerten verankerungsunabhängigen Wachstum der Zellen und ihrer Fähigkeit *in vivo* zu metastasieren, besteht ebenfalls eine direkte Korrelation. Dieser Zusammenhang konnte erstmals für Fibrosarkome nachgewiesen (Cifone and Fidler 1980) und anschließend für eine Vielzahl anderer Tumorentitäten bestätigt werden (Li, Price et al. 1989).

In den GRHL2-defizienten Zelllinien löste eine Überexpression von GRHL2 den umgekehrten Effekt einer MET aus. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten anderer Gruppen, die erst kürzlich veröffentlicht wurden (Cieply, Riley et al. 2012; Xiang, Deng et al. 2012). Die GRHL2-überexprimierenden Zellen zeigten eine schwächere Migration und Invasion und bildeten deutlich weniger Klone im Weich-Agar als die Kontrollzelllinien.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zu GRHL2-abhängigen Genexpressionsveränderungen in den drei etablierten Modellsystemen bestätigten die Annahme, dass GRHL2 eine EMT-Suppressorfunktion besitzt. So zeigte sich, dass eine Reihe von EMT-assoziierten Genen, wie z. B. *CDH1* (E-Cadherin), *DSC2*, *TJP1* (ZO-1), *VIM* (Vimentin), *ZEB1* und der Stammzellmarker *CD24* sowie die Zytokeratine und die Claudine, in den experimentellen Systemen durch GRHL2 reguliert wurden. Auffallend war, dass die GRHL2-Überexpression in den MDA-MB-231-Zellen in einer drastischeren Änderung des Genexpressionsmusters resultierte als der *Knockdown* der Genexpression bzw. die funktionelle Inaktivierung über dominant-negative GRHL2-Proteine in den MDA-MB-468-Zellen. Dies könnte darin begründet sein, dass die verbleibende GRHL2-Restexpression bzw. die Funktion der nicht-inaktivierten GRHL2-Proteine über den dominant-negativen Ansatz immer noch ausreichend ist, um eine Bindung des GRHL2-Transkriptionsfaktors an den Promotor seiner Zielgene zu bewirken und somit deren Expression nicht zu beeinflussen. Tatsächlich gibt es einige Veröffentlichungen, die dieses Thema behandeln und in denen geschildert wird, dass ein *Knockdown* der Expression von Transkriptionsfaktoren die funktionelle Charakterisierung erschweren und zu einer falschen Interpretation der Ergebnisse führen kann. Der bekannteste ist hierbei sicher der Übersichtsartikel von Peggy Farnham (Farnham 2009), der auf die beschränkten experimentellen Möglichkeiten der siRNA-Technologie bei Transkriptionsfaktoren hinweist. Dennoch bestätigen die

Studien zu den GRHL2-induzierten Genexpressionsveränderungen, dass der *Knockdown* der *GRHL2*-Genexpression und die funktionelle Inaktivierung über ein dominant-negatives GRHL2-Protein die gleichen Veränderungen im Expressionsprofil der MDA-MB-468-Zellen hervorrufen und somit äquivalente Ansätze darstellen.

Weiterhin konnte eine interessante Beobachtung zur GRHL2-induzierten Genexpressionsveränderung des Todeszellrezeptors *FAS* gemacht werden. In den MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen konnte durch die Überexpression des *GRHL2*-Gens eine positive Regulation des *FAS*-Rezeptors beobachtet werden. Diese Daten sind deshalb besonders interessant, da in der eigenen Arbeitsgruppe Hinweise dafür gefunden werden konnten, dass GRHL2 ein Suppressor der *FAS*-Genexpression in NIH3T3-Fibroblasten darstellt (Werner 2009). Die letztgenannten Daten stehen im Einklang mit kürzlich publizierten Befunden von Dompe et al., die GRHL2 mittels eines *pooled shRNA screenings* als negativen Regulator der *FAS*-Expression in HT1080-Fibrosarkomzellen identifizieren konnten (Dompe, Rivers et al. 2011). Dompe und Mitarbeiter konnten ferner demonstrieren, dass GRHL2 in diversen humanen Mammakarzinomzelllinien eine anti-apoptotische Wirkung entfaltet (Dompe, Rivers et al. 2011). Daraus lässt sich unmittelbar schlussfolgern, dass GRHL2 dazu in der Lage ist, die Expression von *FAS* sowohl positiv als auch negativ zu regulieren. Obwohl die zu Grunde liegenden regulatorischen Mechanismen der GRHL2-abhängigen Expression von *FAS* noch unklar sind, ist es interessant darauf hinzuweisen, dass das *Drosophila grainyhead* (*grh*) *in vitro* mit dem Protein PHO (Blastyak, Mishra et al. 2006) sowie *in vitro* und *in vivo* mit dem Dring-Protein (Tuckfield, Clouston et al. 2002), die beide zur Familie der Polycombproteine gehören, interagieren kann. Diese physikalische Interaktion der jeweiligen Proteine mit *grh* reprimiert die Zielgenexpression. Eine andere Theorie, die eine negative Regulation der Zielgene durch *grh* beschreibt, ist die gegenseitige Verdrängung von *grh* und anderen Faktoren bei der Bindung an die DNA. Beispielsweise zeigten Harrison et al., dass *grh* und der transkriptionelle Aktivator Zelda (*Zld*) bei der embryonalen Entwicklung von *Drosophila* um die Bindung an die DNA konkurrieren und so die Expression verschiedener Gene steuern (Harrison, Botchan et al. 2010). Zusammenfassend legen die hier vorliegenden Resultate und auch die Hinweise aus der Literatur die Vermutung nahe, dass der Transkriptionsfaktor GRHL2 möglicherweise durch die Interaktion mit Polycombproteinen oder die Konkurrenz mit anderen Transkriptionsfaktoren ebenfalls dazu in der Lage ist, eine positive und eine negative Regulation seiner Zielgene zu bewirken.

### GRHL2 stellt einen Suppressor der TGF- $\beta$ -induzierten EMT in den normalen Mammaepithelzellen MCF-10A dar

Die Etablierung eines Modellsystems zur Untersuchung der TGF- $\beta$ -induzierten EMT sollte helfen, die tumorsupprimierenden Eigenschaften von GRHL2 besser zu verstehen. Interessanterweise waren die hierfür verwendeten MCF-10A-Zellen bezüglich ihrer GRHL2-Expression in der Literatur völlig unterschiedlich eingestuft. Übereinstimmend mit den durch Cieply et al. gezeigten Resultaten konnte in der hier vorliegenden Arbeit nur eine sehr schwache GRHL2-Expression detektiert werden (Cieply, Riley et al. 2012). Interessanterweise wiesen Xiang et al. aber eine signifikante Expression mittels nicht-quantitativer RT-PCR-Analyse nach und zeigten, dass ein *Knockdown* der *GRHL2*-Genexpression zu EMT-ähnlichen Veränderungen in den Zellen führt (Xiang, Deng et al. 2012). In dieser Arbeit konnte jedoch nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von GRHL2 den epithelialen Phänotyp der MCF-10A-Zellen stabilisiert und antagonisierend auf die durch TGF $\beta$ -induzierte EMT wirkt. Weiterhin ging aus einer erst kürzlich veröffentlichten Studie hervor, dass die GRHL2-Überexpression in MCF-10A-Zellen zu einem mesenchymalen Phänotyp führt (Yang, Vasudevan et al. 2013). Der Grund für diese widersprüchlichen Daten ist bisher noch völlig unklar und sollte daher in jedem Fall weiter untersucht werden.

#### **4.2 Hinweise auf eine pathophysiologische Relevanz von GRHL2 für das humane Mammakarzinom**

Die Ergebnisse der immunhistologischen Analyse in dieser Arbeit basieren sowohl auf einem kleinen TMA mit 55 normalen und malignen Brustgeweben als auch auf einem Mammakarzinom-TMA mit über 2000 Gewebeschnitten, der statistisch ausgewertet wurde. Bemerkenswerterweise handelte es sich bei dieser Studie um die erste große Untersuchung zur GRHL2-Proteinexpression in einem Tumor. Zusammengenommen unterstützten einige Einzelergebnisse dieser Analysen die hier vertretene These, dass GRHL2 eine wichtige Rolle bei der EMT in der Mammakarzinogenese spielen könnte. Dazu gehörte unter anderem die signifikante Korrelation zwischen dem Verlust der GRHL2-Proteinexpression und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die GRHL2-Expression an der Invasionsfront des Tumors abnahm und dass Zellen, die keinen Kontakt mehr zum Primärtumor aufwiesen, negativ für GRHL2 waren. Da in der Regel nur wenige Zellen der Tumormasse bereits eine EMT durchlaufen haben und sich diese gering proliferierenden Zellen vornehmlich am Rand des Tumors befinden (Evdokimova, Tognon et al. 2009), deuteten die letzten Beobachtungen ebenfalls auf eine putative EMT-Suppressorfunktion von GRHL2 beim humanen Mammakarzinom hin. Interessanterweise konnte nicht beobachtet werden,

dass die GRHL2-Expression in den lobulären Karzinomen, die normalerweise keine E-Cadherin-Expression aufweisen und damit als besonders aggressiv gelten (Berx, Cleton-Jansen et al. 1996), geringer war als in den duktalem Karzinomen. Dies könnte mit den in dieser Arbeit im MDA-MB-231-Zellsystem gezeigten Daten in Zusammenhang stehen, dass die E-Cadherin-Expression nicht immer und auch nicht Gen-Dosis-abhängig durch GRHL2 gesteuert wurde. Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass das GRHL2-Expressionsniveau und möglicherweise sogar der Aktivierungszustand des Proteins die GRHL2-abhängige Expression von E-Cadherin bedingt.

Interessanterweise wurden in den letzten Monaten einige Studien zur Expression von GRHL2 in Primärtumoren der Brust veröffentlicht, die widersprüchliche Ergebnisse zeigten. So wurde unter anderem beschrieben, dass die GRHL2-Expression in der Vielzahl der Mammatumoren im Vergleich zum Normalgewebe heraufreguliert wird. Eine Ausnahme bildeten dabei nur die Tumoren der *Claudin-low*-Unterklasse (Cieply, Riley et al. 2012; Xiang, Deng et al. 2012; Yang, Vasudevan et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit hingegen konnten kein bedeutender Unterschied in der starken GRHL2-Expression zwischen Normal- und Tumorgewebe beobachtet werden. Möglicherweise ist die Heraufregulation der GRHL2-mRNA in den Brusttumoren, deren Daten durch Meta-Analysen von Expressionsdaten gewonnen wurden, ein Artefakt, da bei der Entnahme des Normalgewebes keine Mikrodissektion vorgenommen wurde. Dennoch brachten Xiang et al. eine erhöhte GRHL2-Expression mit einem kürzeren, Rezidiv-freien Überleben und einem stärkeren Metastasierungsrisiko in Verbindung (Xiang, Deng et al. 2012). Diese Ergebnisse wurden durch funktionelle Analysen unterstützt, die zeigten, dass die Überexpression von GRHL2 in der murinen Zelllinie 4T1 zu Tumorwachstum und Metastasierung führte (Xiang, Deng et al. 2012). Bisher sind die Gründe für diese höchst widersprüchlichen Resultate noch völlig unklar und müssen in weiteren Studien zur GRHL2-Expression beim humanen Mammakarzinom näher untersucht werden.

Die Resultate der immunhistologischen Analysen bekräftigten insgesamt aber die bisherigen Erkenntnisse aus den funktionellen Studien und somit die Hypothese, dass der Transkriptionsfaktor GRHL2 einen neuen Suppressor der EMT beim humanen Mammakarzinom darstellt.

Zusammengenommen legten die mit Hilfe von insgesamt vier unterschiedlichen Zellsystemen erhaltenen Ergebnisse der funktionellen Analysen die Schlussfolgerung nahe, dass es sich beim Transkriptionsfaktor GRHL2 um einen neuen Suppressor der EMT handelt.

### **4.3 Besitzt der Transkriptionsfaktor GRHL2 eine duale Rolle bei der Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms?**

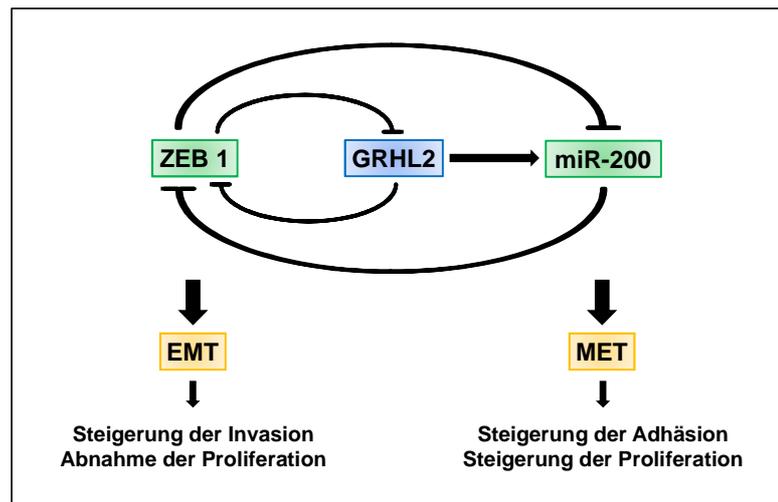
Obwohl die Resultate in den Mammakarzinommodellssystemen mit reduzierter GRHL2-Expression zunächst widersprüchlich erschienen, gibt es verschiedene Publikationen, in denen gezeigt wurde, dass eine Herunterregulation der Zellproliferation und ein Durchlaufen einer EMT keinesfalls gegensätzliche Ereignisse darstellen müssen. Ein Beispiel für ein weiteres Protein, das sowohl die Zellproliferation als auch die EMT steuert, ist der YB-1-Faktor (Evdokimova, Tognon et al. 2009; Evdokimova, Tognon et al. 2009). Während der EMT werden die Zell-Zell-Kontakte aufgebrochen, das Aktinzytoskelett wird neu organisiert und die Zellen nehmen einen mesenchymalen Phänotyp an, der ihr erhöhtes Potential zur Migration und Invasion bedingt (Nieto 2011). Die Zellen sind durch ihre mesenchymalen Eigenschaften in der Lage, zu metastasieren und in Folge dessen Fernmetastasen auszubilden. Das ablaufende genetische Programm der EMT beinhaltet jedoch noch weitere Faktoren, die inzwischen weitestgehende Akzeptanz fanden. So nehmen Zellen, die eine EMT durchlaufen wieder einen Stammzell-ähnlichen Charakter an (Polyak and Weinberg 2009), sie entwickeln Überlebensstrategien indem sie beispielsweise ihre Proliferationsrate senken sowie Resistenzen gegen Anoikis und verschiedene Zytostatika aufbauen (Thiery, Acloque et al. 2009). Obwohl eine gesteigerte Proliferation normalerweise als eines der Hauptmerkmale von Krebszellen gilt (Hanahan and Weinberg 2000), wird darüber spekuliert, ob diese für sie in Wirklichkeit nicht eher hinderlich ist, um während der Tumorzell dissemination und Metastasierung zu überleben (Evdokimova, Tognon et al. 2009). Die Herunterregulation der Zellproliferation um die genomische Integrität zu bewahren, die Verlangsamung des Zellstoffwechsels sowie ein erhöhtes Potential zum verankerungsunabhängigen Wachstum ist wichtig für disseminierende/metastasierende Zellen, um in der Blutbahn und in der für sie unwirtlichen Umgebung der Sekundärorgane zu überleben. Eine geringe Proliferationsrate kann für die Zellen in so fern nützlich sein, dass sie ihr migratorisches Potential zunächst voll ausschöpfen können, um anschließend die Zellteilung und damit das Tumorstadium wieder zu steigern (Evdokimova, Tognon et al. 2009). Bei Patientinnen mit Mammakarzinom kann häufig beobachtet werden, dass nach vielen Jahren Metastasen auftreten, obwohl die Behandlung der Krankheit als erfolgreich abgeschlossen galt. Die malignen Zellen haben sich vermutlich vom Primärtumor gelöst und blieben über den gesamten Zeitraum inaktiv, nur um ihr tumorigenes Potential im späteren Verlauf wieder zu entfalten. Das Vorhandensein von mikrometastatischen, dormanten Zellen steht in einem engen Zusammenhang mit einem Wiederauftreten und einer schlechten Prognose der Krebserkrankung (Braun, Pantel et al. 2000; Braun, Vogl et al. 2005). Welche Moleküle dafür verantwortlich sind, dass dormante Zellen wieder in den aktiven Zustand zurückkehren, ist bisher noch völlig unbekannt.

Denkbar ist, dass Faktoren wie GRHL2, die den EMT-/MET-Prozess, die Zellproliferation und das Überleben der Krebszellen steuern, Schlüsselgene für die Ausbildung von Metastasen darstellen könnten.

#### **4.4 GRHL2 unterliegt verschiedenen regulatorischen Mechanismen**

##### *GRHL2 ist Teil eines komplexen Netzwerkes zur Regulation der EMT*

Bisher gibt es sehr wenig Literatur, die sich mit den regulatorischen Mechanismen beschäftigt, die der Expression des GRHL2-Transkriptionsfaktors zu Grunde liegen. In dieser Arbeit konnte durch eine Vielzahl aufwendiger Experimente gezeigt werden, dass die Expression von GRHL2 durch den EMT-Transkriptionsfaktor ZEB1 reprimiert wird. Interessanterweise wurde erst kürzlich eine Studie einer amerikanischen Arbeitsgruppe veröffentlicht, in der *ZEB1* als direktes Zielgen von GRHL2 beschrieben wird (Cieply, Riley et al. 2012). Tatsächlich konnten auch in dieser Arbeit Hinweise dafür gefunden werden, dass ein *Knockdown* der GRHL2-Expression oder eine Inaktivierung über dominant-negative GRHL2-Proteine zu einer Zunahme der ZEB1-Expression führt. Zusammengenommen legten diese Daten die Vermutung nahe, dass die Transkriptionsfaktoren GRHL2 und ZEB1 eine doppelt-negative *Feedback*-Schleife bilden und so gegenseitig ihre Expression steuern (Abb. 4-1). Generell können *Feedback*-Schleifen völlig unterschiedliche Effekte auf die Genexpression ausüben. Befinden sich die Zellen in einem Zustand, in der beide Gene ihr normales Expressionsniveau aufweisen, stabilisieren sie sich gegenseitig. Wird dieses Gleichgewicht aber durch äußere Einflüsse oder durch eine künstlich-induzierte Herauf-/oder Herunterregulation eines der Gene gestört, verstärkt sich diese Deregulation durch *Feedback*-Schleifen noch.



**Abb. 4-1: Schematische Darstellung des regulatorischen ZEB1/GRHL2/miR-200-Netzwerks.**

Der Transkriptionsfaktor ZEB1 reprimiert die Mitglieder der miR200-Familie, die im Gegenzug die Expression von ZEB1 post-transkriptionell inhibieren. Diese doppelt-negative Feedback-Schleife ist mit einer weiteren Feedback-Schleife, bestehend aus GRHL2 und ZEB1, die sich gegenseitig reprimieren, verbunden. GRHL2 induziert eine Heraufregulation der miR-200-Familie durch bisher unbekannte Mechanismen. Eine Genexpressionsveränderung einzelner Gene dieses komplexen ZEB1/GRHL2/miR-200-Netzwerks durch äußere Faktoren kann entweder zu einer EMT oder aber einer MET der Zellen führen.

Interessanterweise ist in der Literatur beschrieben, dass Mitglieder der GRHL-Genfamilie ihre gegenseitige Regulation steuern (Chen, Xiao Liu et al. 2012) und die Transkriptionsfaktoren GRHL2 und Nkx2-1 eine *Feedback*-Schleife in Lungenepithelzellen bilden (Varma, Cao et al. 2012). Offenbar existiert also eine große Anzahl von *Feedback*-Mechanismen, die mit der Expression von GRHL2 in Zusammenhang gebracht wird und möglicherweise die hier beobachtete Reexpression von GRHL2 in den *Knockdown*-Experimenten bedingt.

Die GRHL2-/ZEB1-*Feedback*-Schleife scheint noch an einen weiteren Regulationsmechanismus gekoppelt zu sein. Es wurde durch Brabletz und Brabletz gezeigt, dass ZEB1 die Mitglieder der miR-200-Familie transkriptionell unterdrückt und diese wiederum die Expression von ZEB1 durch eine Bindung an den 3'-untranslatierten Bereich des Gens inhibieren (Brabletz and Brabletz 2010). Weiterhin gibt es eine Studie in der die Heraufregulation der miR-200b/c durch GRHL2 in Mammakarzinomzelllinien beschrieben wurde (Cieply, Riley et al. 2012).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass vermutlich ein sehr komplexes, regulatorisches Netzwerk aus GRHL2, ZEB1 und miR-200 existiert, das die EMT reguliert und dessen Zerstörung zur Metastasierung beim humanen Mammakarzinom beitragen kann (Abb. 4-1).

### Regulation der Aktivität des Transkriptionsfaktors GRHL2 durch posttranslationale Modifikationen (PTMs)

Aus den eigenen Daten geht hervor, dass GRHL2 im Normalgewebe stark exprimiert wird und dort für die Aufrechterhaltung des epithelialen Phänotyps verantwortlich zu sein. Da in den hier dargelegten Ergebnissen gezeigt wurde, dass GRHL2 onkogene Eigenschaften besitzt, ist die hohe Expression im Normalgewebe für sich genommen schon sehr ungewöhnlich. Hinzu kommt, dass auf Grund der Funktion von GRHL2 als EMT-Suppressor zu erwarten wäre, dass GRHL2 bei der Tumorentstehung und Progression verloren geht. Tatsächlich zeigte sich bei der Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen aber nur in Ausnahmefällen eine Herunterregulation der GRHL2-Proteinexpression in den Mammakarzinomen (Kap. 3.3). Durch diese Gegebenheiten drängte sich die Annahme auf, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors GRHL2 nicht nur über die transkriptionelle Ebene reguliert wird sondern wie der Großteil anderer Transkriptionsfaktoren auch über posttranslationale Modifikationen (PTMs) gesteuert werden könnte.

Tatsächlich gibt es einige Veröffentlichungen zur *Grainyhead*-Familie von Transkriptionsfaktoren, die PTMs der Proteine beschreiben. So werden beispielsweise einige Mitglieder der Genfamilie sumoyliert (Kang, Chae et al. 2005; Kang, Chae et al. 2010; To, Rodda et al. 2010) sowie das *Drosophila grainyhead*- (Mace, Pearson et al. 2005; Kim and McGinnis 2010) und das humane CP2-Protein (Volker, Rameh et al. 1997; Pagon, Volker et al. 2003; Saxena, Powell et al. 2009; Saxena, Owens et al. 2010) unter anderem über ERK1/2 des MAPK-Signalweges an verschiedenen Stellen phosphoryliert.

In dieser Arbeit konnten erstmals Hinweise dafür gefunden werden, dass auch GRHL2 durch PTMs in seiner Aktivität reguliert sein könnte. So gelang die Identifizierung einer Phosphorylierungsstelle im GRHL2-Protein (T<sup>211</sup>), die maßgeblich die Funktion von GRHL2 beeinflussen könnte. Allerdings konnte bisher noch keine Kinase identifiziert werden, die an der Phosphorylierung des GRHL2-Proteins an T<sup>211</sup> beteiligt ist. Es wurden verschiedene Experimente mit dem MEK1-Inhibitor PD98059 durchgeführt, die darauf hindeuteten, dass es sich bei der phosphorylierenden Kinase vermutlich nicht um ERK1/2 des MAPK-Weges handelt. Wie in Tab. 3-4 bereits erwähnt, brachten die *in silico*-Analysen eine Vielzahl von Kinasen hervor, die auf Grund ihrer angegebenen Konsensus-Sequenzen potentiell die Aminosäure T<sup>211</sup> im GRHL2-Protein phosphorylieren könnten. Hierzu zählen u.a. andere Kinasen des MAPK-Weges wie p38 oder Kinasen anderer Signalwege, die in den bisherigen Überlegungen noch keine Rolle spielten, wie beispielsweise GSK3, CDK5, PKA und PKC.

Obwohl der Einfluss dieser PTM auf die Aktivität von GRHL2 nicht mehr vollständig untersucht werden konnte, deuten erste Ergebnisse darauf hin, dass die Phosphorylierung an T<sup>211</sup> die Stabilität

des Proteins drastisch erhöht. Es ist möglich, dass die Phosphorylierung an Position T<sup>211</sup> die natürliche Faltung des Proteins unterstützt und der Austausch der Aminosäure Threonin gegen Alanin zu einer Konformationsänderung des GRHL2-Proteins führte. Denkbar wäre aber auch, dass die Phosphorylierung an T<sup>211</sup> gekoppelte PTMs, wie zum Beispiel eine Sumoylierung oder eine Ubiquitinierung bedingten, die die Stabilität des Proteins verändern können (Yang and Seto 2008).

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten Grundlage für die Erzeugung phosphorylierungsspezifischer Antikörper bilden, die dann eventuell auch als diagnostische Werkzeuge zum Nachweis des Aktivierungszustandes des GRHL2-Proto-Onkogens dienen könnten. Tatsächlich ist es in dieser Arbeit bereits gelungen, zwei polyklonale Antikörper herzustellen, die nur das an T<sup>211A</sup> phosphorylierte Protein, nicht aber das nicht-phosphorylierte GRHL2-Protein erkennen, was über verschiedene Analysen nachgewiesen werden konnte. Die Einsatzmöglichkeiten der generierten Antikörper sind jedoch beschränkt, da sie das phosphorylierte Protein in der Western Blot-Analyse nur detektierten, wenn es in sehr hoher Konzentration im Gesamtzellextrakt vorlag oder wenn es über eine Immunpräzipitation angereichert wurde. Aus diesen Gründen ist es nicht möglich, die polyklonalen, phosphospezifischen Antikörper in immunhistochemischen Analysen einzusetzen. Es erscheint aber lohnenswert, aktivierungsspezifische, monoklonale Antikörper gegen das an T<sup>211</sup>-phosphorylierte GRHL2-Protein für immundiagnostische Zwecke zu generieren. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bilden eine hervorragende Grundlage für die Erzeugung solcher neuartigen diagnostischen Werkzeuge, die es dann erlauben, die Regulation der Aktivität des Transkriptionsfaktors GRHL2 in weiterführenden Studien im Detail zu untersuchen und die somit wesentlich zum besseren Verständnis der Rolle des Transkriptionsfaktors GRHL2 beim Mammakarzinom beitragen könnten.

#### 4.5 Fazit

In dieser Arbeit ist es gelungen, verschiedene Modellsysteme zur funktionellen Charakterisierung des GRHL2-Transkriptionsfaktors in humanen Mammakarzinomzelllinien zu etablieren. Es konnte anhand dieser Modellsysteme gezeigt werden, dass GRHL2 tatsächlich onkogene Eigenschaften besitzt und die Expression des aus basiswissenschaftlicher und klinischer Sicht überaus bedeutsamen ERBB3-Rezeptors in Mammakarzinomzelllinien reguliert. Ferner konnte gezeigt werden, dass GRHL2 einen neuen Suppressor der EMT darstellt und somit von hoher Wichtigkeit bei der Invasion und Metastasierung dieser Tumorentität ist. Zusammenfassend lassen diese Befunde den Schluss zu, dass der Transkriptionsfaktor GRHL2 eine duale Rolle bei der Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms spielt.

In den Studien zur Regulation des Transkriptionsfaktors zeigte sich, dass die Expression von GRHL2 vermutlich über ein komplexes Netzwerk bestehend aus verschiedenen *Feedback*-Schleifen gesteuert wird, zu dem unter anderem der EMT-Transkriptionsfaktor ZEB1 gehört. Zusätzlich wird die GRHL2-Expression wahrscheinlich durch eine Vielzahl verschiedener PTMs beeinflusst, wobei die Regulation über die Phosphorylierung an Aminosäure T<sup>211</sup> in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Die durchgeführten immunhistologischen Analysen stellen die ersten Studien zur GRHL2-Proteinexpression in einem Tumor dar und unterstützen die hier aufgestellte Hypothese, dass GRHL2 die EMT supprimiert.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit den Schluss zu, dass der Transkriptionsfaktor GRHL2 eine wichtige Rolle beim humanen Mammakarzinom und dessen Progression spielt.

#### 4.6 Ausblick

Um weitere Erkenntnisse über die Funktion und letztlich auch die klinische Bedeutung des GRHL2-Transkriptionsfaktors für das humane Mammakarzinom zu gewinnen, sind weitere, vielfältige molekulare und auch tierexperimentelle Untersuchungen nötig.

Die bisher durchgeführten Studien zur Rolle des GRHL2-Transkriptionsfaktors beim humanen Mammakarzinom deuten darauf hin, dass das Gen in dieser Tumorentität einen neuen EMT-Suppressor darstellt und gleichzeitig die Proliferation von Tumorzellen beeinflusst. Eine entscheidende Frage besteht darin, wie diese unterschiedlichen Aktivitäten des GRHL2-Transkriptionsfaktors reguliert sein könnten. Ein Ansatzpunkt für die weitere Charakterisierung des *GRHL2*-Gens stellen die posttranslationalen Modifikationen (PTMs) des Proteins dar. Durch die Entwicklung monoklonaler, phosphospezifischer Antikörper gegen Aminosäure T<sup>211</sup> könnten neue diagnostische Werkzeuge geschaffen werden, die zum Nachweis des Aktivierungszustandes der GRHL2-Proteine beispielsweise durch immunhistologische Untersuchungen dienen könnten.

Die Identifizierung einer Kinase, die an der Phosphorylierung des GRHL2-Proteins beteiligt ist, stellt ebenfalls eine Herausforderung für zukünftige Projekte dar. Zunächst wäre es sinnvoll zu testen, ob GRHL2 abhängig von der Proliferation phosphoryliert wird und die Phosphorylierung des GRHL2-Proteins an T<sup>211</sup> nach mitogener Stimulation ansteigt.

Interessant könnte auch die Untersuchung des Mechanismus sein, der der negativen Regulation des FAS-Rezeptors durch GRHL2 zu Grunde liegt. Im Einklang mit den Modellen, die für das *Drosophila* grh bekannt sind, könnte die negative Regulation durch das GRHL2-Protein ebenfalls über die

Interaktion mit Polycombkomplexen oder durch eine kompetitive Bindung von GRHL2 an die Promotorregion des *FAS*-Gens erfolgen. Um Proteine zu identifizieren, die mit dem GRHL2-Protein interagieren, könnte beispielsweise ein *Yeast-Two-Hybrid*-Screening durchgeführt werden.

Bisher gibt es nur die in dieser Arbeit gezeigten, vorläufigen Daten zum Einfluss von GRHL2 auf das Tumorwachstum und die Metastasierung humaner Mammakarzinomzellen *in vivo*. Es wäre sinnvoll, diese Studien zu erweitern und beispielsweise die Zelllinie MDA-231BO (Yoneda, Williams et al. 2001), die ein hohes Potential zur Skelettsystemmetastasierung besitzt, zu verwenden. Die Expressionskonstrukte, die für das GRHL2<sup>WT</sup>-Protein bzw. die GRHL2<sup>T211A</sup>-Mutante kodieren, könnten in die Zelllinie eingebracht werden, um anschließend die Zellen in immundefiziente Mäuse zu implantieren. Die Ergebnisse sollten weitere Hinweise dazu liefern, ob GRHL2 das Tumorwachstum beeinflusst und/oder ob es einen Metastasierungssuppressor *in vivo* darstellt. Interessant wäre es in diesem Zusammenhang auch, das Blut und das Knochenmark der Mäuse auf vorhandene zirkulierende Tumorzellen (CTCs) bzw. disseminierte Tumorzellen (DTCs) zu untersuchen. Weiterhin könnten auch vergleichende immunhistochemische Analysen von Primärtumoren und davon abgeleiteten Metastasen derselben Patienten zum besseren Verständnis der Rolle von GRHL2 bei der EMT während der Invasion und Metastasierung des humanen Mammakarzinoms beitragen.

## 5 Zusammenfassung

*Grainyhead-like 2* (GRHL2) ist ein Mitglied der *Grainyhead*-Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung sowie bei der Wundheilung spielen. Mit Hilfe eines genetischen Screenings, einer so genannten Retrovirus-vermittelten cDNA-Expressionsklonierung, wurde GRHL2 zunächst als neues Proto-Onkogen identifiziert, das dazu in der Lage ist, eine Transformation von NIH3T3-Fibroblasten zu bewirken. Ziel dieses Promotionsvorhabens war es daher, die mögliche Relevanz des bisher noch weitestgehend uncharakterisierten Transkriptionsfaktors GRHL2 bei der Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms zu untersuchen.

Insgesamt wurden vier verschiedene experimentelle Ansätze gewählt, um die Funktion von GRHL2 in humanen Mammakarzinomzelllinien *in vitro* zu klären. Diese Modellsysteme beinhalteten die Überexpression von GRHL2 in MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen und in der normalen Mammaepithelzelllinie MCF-10A sowie den shRNA-vermittelten *Knockdown* der GRHL2-Expression und die funktionelle Inaktivierung von GRHL2 über dominant-negative wirkende GRHL2-Proteine in MDA-MB-468-Mammakarzinomzellen. Die wichtigsten Resultate aus diesen experimentellen Systemen können wie folgt zusammengefasst werden:

- Es konnte gezeigt werden, dass GRHL2 die Proliferation von Mammakarzinomzellen reguliert und somit onkogene Eigenschaften besitzt.
- Der Transkriptionsfaktor GRHL2 reguliert direkt die Expression des ERBB3/HER3-Rezeptors in Mammakarzinomzellen. Die Identifikation von *ERBB3/HER3* als direktes Zielgen von GRHL2 ist für das Mammakarzinom von entscheidender Bedeutung, da ein veränderter Aktivierungszustand des ERBB3/HER3-Proteins beim humanen Mammakarzinom mit einer schlechteren Überlebensrate in Verbindung gebracht wird und er bei einer zielgerichteten Therapie zur Vermittlung von Resistenzen beiträgt.
- Das wichtigste Resultat dieser Arbeit stellt die Identifizierung von GRHL2 als neuen Suppressor der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) in Mammakarzinomzellen dar.
- GRHL2 hat eine antagonisierende Wirkung auf die TGF- $\beta$ -induzierte EMT in MCF-10A-Mammaepithelzellen.
- Die GRHL2-Expression wird direkt durch den EMT-Transkriptionsfaktor *zinc-finger-enhancer binding protein 1* (ZEB1) supprimiert, der wiederum ein Ziel für die Repression durch GRHL2 darstellt. Diese Resultate lassen den Schluss zu, dass GRHL2 und ZEB1 eine doppelt-negative, die Transkription regulierende, *Feedback*-Schleife bilden, die die EMT, die Migration, die Invasion und die Metastasierung in Mammakarzinomzellen steuert.

- Vorläufige Resultate zeigen, dass GRHL2 die Metastasierung von Mammakarzinomzellen *in vivo* hemmt.
- Es wurden Anzeichen dafür gefunden, dass die Aktivität des GRHL2-Transkriptionsfaktors in Mammakarzinomzellen durch posttranslationale Modifikationen (PTMs) gesteuert wird. Insbesondere spielt dabei die Aminosäure Threonin<sup>211</sup> (T<sup>211</sup>) eine entscheidende Rolle, die als neue, mögliche Phosphorylierungsstelle einer bisher noch unbekanntem Kinase identifiziert werden konnte. Zudem ist es gelungen, aktivierungsspezifische Antikörper herzustellen, die das an T<sup>211</sup> phosphorylierte Protein erkennen und für weitere Studien eingesetzt werden können.

Zusätzlich zu diesen funktionellen Untersuchungen wurde eine immunhistochemische Analyse der GRHL2-Proteinexpression an primären Brusttumoren vorgenommen. Im Einklang mit der Funktion als EMT-Suppressormolekül wurde eine Abnahme der GRHL2-Expression an der Invasionsfront der Primärtumoren beobachtet. Eine pathophysiologische Relevanz zeigte sich zudem durch die statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Verlust der GRHL2-Expression in den Mammakarzinomen und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass verschiedene Zellsysteme zur Charakterisierung des *GRHL2*-Gens etabliert werden konnten. Die damit erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor GRHL2 eine doppelte Funktion während der Tumorprogression einnimmt, in dem er sowohl die Zellproliferation reguliert als auch als Suppressor der EMT in Mammakarzinomzellen fungiert. Die Resultate weisen auf eine große pathophysiologische Relevanz des *GRHL2*-Gens für das Mammakarzinom hin und könnten die Grundlage für weitere Untersuchungen zur immer noch unvollständig verstandenen und sogar gegensätzlichen Rolle des GRHL2-Transkriptionsfaktors beim humanen Mammakarzinom bilden.

## 6 Abstract

Grainyhead-like 2 (GRHL2) is a member of the grainyhead family of transcription factors which play a crucial role during embryonic development and wound healing. Using a retrovirus-mediated cDNA expression cloning approach, we originally identified GRHL2 as a novel protooncogene capable of transforming NIH3T3 fibroblasts. The aim of the PhD project therefore was to start to define the putative pathophysiological relevance of the yet largely uncharacterized transcription factor GRHL2 in breast cancer development and progression.

A total of four distinct experimental systems for analysis of GRHL2 function in human breast cancer cells were generated and used for *in vitro* studies. These model systems include overexpression of GRHL2 in MDA-MB-231 breast cancer and MCF-10A mammary epithelial cells as well as a shRNA-mediated knockdown of GRHL2 expression and functional inactivation of GRHL2 using dominant-negative GRHL2 proteins in MDA-MB-468 breast cancer cells, respectively. The most important findings employing these experimental breast cancer systems can be summarized as follows:

- GRHL2 is a potent regulator of breast cancer cell proliferation, thus confirming the oncogenic potential of GRHL2 in human cancer cells.
- The transcription factor GRHL2 directly regulates expression of the ERBB3/HER3 receptor in breast cancer cells. The identification of *ERBB3/HER3* as a GRHL2 target gene has very important implications for breast cancer in that an abnormal activation of ERBB3/HER3 has been linked to decreased survival in breast cancer and has been functionally involved in resistance to targeted therapies.
- Most importantly, GRHL2 could also be identified as a novel suppressor of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cell lines.
- GRHL2 antagonizes TGF- $\beta$  induced EMT in MCF-10A mammary epithelial cells.
- Expression of GRHL2 is directly suppressed by the EMT transcription factor Zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1) which in turn is a direct target for repression by GRHL2, suggesting that GRHL2 and ZEB1 form a double-negative transcriptional regulatory feedback loop regulating EMT, migration, invasion, and metastasis of breast cancer cells.
- Preliminary results suggest that GRHL2 represses the metastasis of breast cancer cells *in vivo*.
- Evidence is provided that the activity of the GRHL2 transcription factor in breast cancer cells is modulated by posttranslational modifications (PTMs). In particular, residue Threonine<sup>211</sup> (T<sup>211</sup>) could be identified within the GRHL2 protein as a potential phosphorylation site by a yet unknown kinase. Activation-specific polyclonal antibodies for the detection of T<sup>211</sup>-phosphorylated GRHL2 proteins were generated and could be used for further studies.

In addition to these functional studies, a comprehensive immunohistochemical analysis of GRHL2 protein expression in primary breast cancers was performed. Consistent with its role as an EMT-suppressor molecule, a loss of GRHL2 expression at the invasive front of primary tumors was observed. A pathophysiological relevance in breast cancer metastasis was further demonstrated by our finding of a statistically significant association between loss of GRHL2 expression in primary breast cancers and lymph-node metastasis.

In conclusion, different experimental cell systems for functional characterization of the *GRHL2* gene were generated. The results strongly suggest dual roles of GRHL2 in breast cancer progression in that the GRHL2 transcription factor regulates both cell proliferation and EMT-like phenotypical and gene expression changes in breast cancer cells. The results demonstrate a strong pathophysiological relevance of the *GRHL2* gene in breast cancer and could pave the way for further investigations of the still enigmatic or even contradictory roles of the GRHL2 transcription factor in breast cancer.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aguirre-Ghiso, J. A. (2007). "Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy." Nat Rev Cancer **7**(11): 834-46.
- Albini, A., Y. Iwamoto, et al. (1987). "A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells." Cancer Res **47**(12): 3239-45.
- Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Attardi, L. D. and R. Tjian (1993). "Drosophila tissue-specific transcription factor NTF-1 contains a novel isoleucine-rich activation motif." Genes Dev **7**(7B): 1341-53.
- Attardi, L. D., D. Von Seggern, et al. (1993). "Ectopic expression of wild-type or a dominant-negative mutant of transcription factor NTF-1 disrupts normal Drosophila development." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10563-7.
- Auden, A., J. Caddy, et al. (2006). "Spatial and temporal expression of the Grainyhead-like transcription factor family during murine development." Gene Expr Patterns **6**(8): 964-70.
- Ausubel, F. M., R. Brent, et al., Eds. (2001). Current Protocols in Molecular Biology. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Balkwill, F. and A. Mantovani (2001). "Inflammation and cancer: back to Virchow?" Lancet **357**(9255): 539-45.
- Bednarz-Knoll, N., C. Alix-Panabieres, et al. (2012). "Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies." Cancer Metastasis Rev **31**(3-4): 673-87.
- Berx, G., A. M. Cleton-Jansen, et al. (1996). "E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain." Oncogene **13**(9): 1919-25.
- Bissell, M. J. and D. Radisky (2001). "Putting tumours in context." Nat Rev Cancer **1**(1): 46-54.
- Blastyak, A., R. K. Mishra, et al. (2006). "Efficient and specific targeting of Polycomb group proteins requires cooperative interaction between Grainyhead and Pleiohomeotic." Mol Cell Biol **26**(4): 1434-44.
- Bloushtain-Qimron, N., J. Yao, et al. (2008). "Cell type-specific DNA methylation patterns in the human breast." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(37): 14076-81.
- Boglev, Y., T. Wilanowski, et al. (2011). "The unique and cooperative roles of the Grainy head-like transcription factors in epidermal development reflect unexpected target gene specificity." Dev Biol **349**(2): 512-22.
- Brabletz, S. and T. Brabletz (2010). "The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer?" EMBO Rep **11**(9): 670-7.
- Brabletz, T. (2012). "To differentiate or not--routes towards metastasis." Nat Rev Cancer **12**(6): 425-36.
- Braun, S., K. Pantel, et al. (2000). "Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer." N Engl J Med **342**(8): 525-33.

- Braun, S., F. D. Vogl, et al. (2005). "A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer." N Engl J Med **353**(8): 793-802.
- Bray, S. J. and F. C. Kafatos (1991). "Developmental function of Elf-1: an essential transcription factor during embryogenesis in *Drosophila*." Genes Dev **5**(9): 1672-83.
- Brouns, M. R., S. C. De Castro, et al. (2011). "Over-expression of Grhl2 causes spina bifida in the Axial defects mutant mouse." Hum Mol Genet **20**(8): 1536-46.
- Brown, K. A., M. E. Aakre, et al. (2004). "Induction by transforming growth factor-beta1 of epithelial to mesenchymal transition is a rare event in vitro." Breast Cancer Res **6**(3): R215-31.
- Caddy, J., T. Wilanowski, et al. (2010). "Epidermal wound repair is regulated by the planar cell polarity signaling pathway." Dev Cell **19**(1): 138-47.
- Cao, Y. (2005). "Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis." Nat Rev Cancer **5**(9): 735-43.
- Cavallaro, U., B. Schaffhauser, et al. (2002). "Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch?" Cancer Lett **176**(2): 123-8.
- Chambers, A. F., A. C. Groom, et al. (2002). "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." Nat Rev Cancer **2**(8): 563-72.
- Chen, W., Q. Dong, et al. (2010). "Grainyhead-like 2 enhances the hTERT gene expression by inhibiting DNA methylation at the 5'-CpG island in normal human keratinocytes." J Biol Chem **285**(52): 40852-63.
- Chen, W., Z. Xiao Liu, et al. (2012). "Grainyhead-like 2 (GRHL2) inhibits keratinocyte differentiation through epigenetic mechanism." Cell Death Dis **3**: e450.
- Cheng, L., P. Wang, et al. (2012). "Identification of genes with a correlation between copy number and expression in gastric cancer." BMC Med Genomics **5**: 14.
- Chiang, A. C. and J. Massague (2008). "Molecular basis of metastasis." N Engl J Med **359**(26): 2814-23.
- Cieply, B., P. t. Riley, et al. (2012). "Suppression of the epithelial-mesenchymal transition by Grainyhead-like-2." Cancer Res **72**(9): 2440-53.
- Cifone, M. A. and I. J. Fidler (1980). "Correlation of patterns of anchorage-independent growth with in vivo behavior of cells from a murine fibrosarcoma." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(2): 1039-43.
- Cox, A. D. and C. J. Der (1994). "Biological assays for cellular transformation." Methods Enzymol **238**: 277-94.
- Davies, C., J. Godwin, et al. (2011). "Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials." Lancet **378**(9793): 771-84.
- De Craene, B. and G. Berx (2013). "Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression." Nat Rev Cancer **13**(2): 97-110.
- Dompe, N., C. S. Rivers, et al. (2011). "A whole-genome RNAi screen identifies an 8q22 gene cluster that inhibits death receptor-mediated apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(43): E943-51.

- Dvorak, H. F. (1986). "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing." N Engl J Med **315**(26): 1650-9.
- Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." Nucleic Acids Res **32**(5): 1792-7.
- ENCODE Project Consortium, (2011). "A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE)." PLoS Biol **9**(4): e1001046.
- Engelman, J. A., K. Zejnullahu, et al. (2007). "MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling." Science **316**(5827): 1039-43.
- Evdokimova, V., C. Tognon, et al. (2009). "Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition." Cancer Cell **15**(5): 402-15.
- Evdokimova, V., C. Tognon, et al. (2009). "Reduced proliferation and enhanced migration: two sides of the same coin? Molecular mechanisms of metastatic progression by YB-1." Cell Cycle **8**(18): 2901-6.
- Farmer, P., H. Bonnefoi, et al. (2005). "Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis." Oncogene **24**(29): 4660-71.
- Farnham, P. J. (2009). "Insights from genomic profiling of transcription factors." Nat Rev Genet **10**(9): 605-16.
- Folgiero, V., P. Avetrani, et al. (2008). "Induction of ErbB-3 expression by alpha6beta4 integrin contributes to tamoxifen resistance in ERbeta1-negative breast carcinomas." PLoS One **3**(2): e1592.
- Gao, X., C. M. Vockley, et al. (2013). "Evidence for multiple roles for grainyheadlike 2 in the establishment and maintenance of human mucociliary airway epithelium." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(23): 9356-61.
- Garcia, J. A., F. K. Wu, et al. (1987). "Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus." EMBO J **6**(12): 3761-70.
- Garrett, J. T., M. G. Olivares, et al. (2011). "Transcriptional and posttranslational up-regulation of HER3 (ErbB3) compensates for inhibition of the HER2 tyrosine kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(12): 5021-6.
- Goldhirsch, A., W. C. Wood, et al. (2011). "Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011." Ann Oncol **22**(8): 1736-47.
- Guiu, S., S. Michiels, et al. (2012). "Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement." Ann Oncol **23**(12): 2997-3006.
- Hammond, M. E., D. F. Hayes, et al. (2010). "American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer." Arch Pathol Lab Med **134**(6): 907-22.
- Han, Y., Y. Mu, et al. (2011). "Grhl2 deficiency impairs otic development and hearing ability in a zebrafish model of the progressive dominant hearing loss DFNA28." Hum Mol Genet **20**(16): 3213-26.

- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Harden, N. (2005). "Cell biology. Of grainy heads and broken skins." Science **308**(5720): 364-5.
- Harrison, M. M., M. R. Botchan, et al. (2010). "Grainyhead and Zelda compete for binding to the promoters of the earliest-expressed Drosophila genes." Dev Biol **345**(2): 248-55.
- Hay, E. D. (1968). Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryos. Epithelial-Mesenchymal Interactions: 18th Hahnemann Symposium. R. Fleischmajer, Billingham, R.E., Williams & Wilkins: 31–35.
- Hay, E. D. (1995). "An overview of epithelio-mesenchymal transformation." Acta Anat (Basel) **154**(1): 8-20.
- Hellman, S. H. (2000). Diseases of the breast. Philadelphia, Lippicott William and Willkins: 407-423.
- Herschkowitz, J. I., K. Simin, et al. (2007). "Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors." Genome Biol **8**(5): R76.
- Hu, Z., C. Fan, et al. (2006). "The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms." BMC Genomics **7**: 96.
- Huang, N. and W. L. Miller (2000). "Cloning of factors related to HIV-inducible LBP proteins that regulate steroidogenic factor-1-independent human placental transcription of the cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc." J Biol Chem **275**(4): 2852-8.
- Huang, S., N. P. Wang, et al. (1990). "Two distinct and frequently mutated regions of retinoblastoma protein are required for binding to SV40 T antigen." EMBO J **9**(6): 1815-22.
- Inada, R., M. Matsuki, et al. (2000). "Facilitated wound healing by activation of the Transglutaminase 1 gene." Am J Pathol **157**(6): 1875-82.
- Janicke, M., B. Renisch, et al. (2010). "Zebrafish grainyhead-like1 is a common marker of different non-keratinocyte epidermal cell lineages, which segregate from each other in a Foxi3-dependent manner." Int J Dev Biol **54**(5): 837-50.
- Janni, W., B. Rack, et al. (2005). "The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence." Cancer **103**(5): 884-91.
- Jones, K. A., P. A. Luciw, et al. (1988). "Structural arrangements of transcription control domains within the 5'-untranslated leader regions of the HIV-1 and HIV-2 promoters." Genes Dev **2**(9): 1101-14.
- Kadota, M., M. Sato, et al. (2009). "Identification of novel gene amplifications in breast cancer and coexistence of gene amplification with an activating mutation of PIK3CA." Cancer Res **69**(18): 7357-65.
- Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-8.
- Kang, H. C., J. H. Chae, et al. (2010). "PIAS1 regulates CP2c localization and active promoter complex formation in erythroid cell-specific alpha-globin expression." Nucleic Acids Res **38**(16): 5456-71.

- Kang, H. C., J. H. Chae, et al. (2005). "Erythroid cell-specific alpha-globin gene regulation by the CP2 transcription factor family." Mol Cell Biol **25**(14): 6005-20.
- Kang, X., W. Chen, et al. (2009). "Regulation of the hTERT promoter activity by MSH2, the hnRNPs K and D, and GRHL2 in human oral squamous cell carcinoma cells." Oncogene **28**(4): 565-74.
- Kim, C. H., C. Heath, et al. (1987). "Specific stimulation of simian virus 40 late transcription in vitro by a cellular factor binding the simian virus 40 21-base-pair repeat promoter element." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(17): 6025-9.
- Kim, M. and W. McGinnis (2010). "Phosphorylation of Grainy head by ERK is essential for wound-dependent regeneration but not for development of an epidermal barrier." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(2): 650-5.
- Kitamura, T., M. Onishi, et al. (1995). "Efficient screening of retroviral cDNA expression libraries." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9146-50.
- Kleinman, H. K. and G. R. Martin (2005). "Matrigel: basement membrane matrix with biological activity." Semin Cancer Biol **15**(5): 378-86.
- Kokoszynska, K., J. Ostrowski, et al. (2008). "The fold recognition of CP2 transcription factors gives new insights into the function and evolution of tumor suppressor protein p53." Cell Cycle **7**(18): 2907-15.
- Kudryavtseva, E. I., T. M. Sugihara, et al. (2003). "Identification and characterization of Grainyhead-like epithelial transactivator (GET-1), a novel mammalian Grainyhead-like factor." Dev Dyn **226**(4): 604-17.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Li, L., J. E. Price, et al. (1989). "Correlation of growth capacity of human tumor cells in hard agarose with their in vivo proliferative capacity at specific metastatic sites." J Natl Cancer Inst **81**(18): 1406-12.
- Lim, L. C., S. L. Swendeman, et al. (1992). "Molecular cloning of the alpha-globin transcription factor CP2." Mol Cell Biol **12**(2): 828-35.
- Lin, Y. H., C. C. Wu, et al. (2011). "The grainyhead-like 2 gene (GRHL2) single nucleotide polymorphism is not associated with age-related hearing impairment in Han Chinese." Laryngoscope **121**(6): 1303-7.
- Liu, B., D. Ordonez-Ercan, et al. (2007). "Downregulation of erbB3 abrogates erbB2-mediated tamoxifen resistance in breast cancer cells." Int J Cancer **120**(9): 1874-82.
- Mace, K. A., J. C. Pearson, et al. (2005). "An epidermal barrier wound repair pathway in Drosophila is mediated by grainy head." Science **308**(5720): 381-5.
- Moreno-Bueno, G., F. Portillo, et al. (2008). "Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer." Oncogene **27**(55): 6958-69.
- Moussian, B. and A. E. Uv (2005). "An ancient control of epithelial barrier formation and wound healing." Bioessays **27**(10): 987-90.

- Murata, T., M. Nitta, et al. (1998). "Transcription factor CP2 is essential for lens-specific expression of the chicken alphaA-crystallin gene." Genes Cells **3**(7): 443-57.
- Narayan, M., J. A. Wilken, et al. (2009). "Trastuzumab-induced HER reprogramming in "resistant" breast carcinoma cells." Cancer Res **69**(6): 2191-4.
- Neve, R. M., K. Chin, et al. (2006). "A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes." Cancer Cell **10**(6): 515-27.
- Nieto, M. A. (2011). "The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **27**: 347-76.
- Nüsslein-Volhard, C., E. Wieschaus, et al. (1984). "Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome." Roux's Arch Dev Biol **195**(5): 267-282.
- Pagon, Z., J. Volker, et al. (2003). "Mammalian transcription factor LSF is a target of ERK signaling." J Cell Biochem **89**(4): 733-46.
- Pantel, K. and R. H. Brakenhoff (2004). "Dissecting the metastatic cascade." Nat Rev Cancer **4**(6): 448-56.
- Pantel, K., R. H. Brakenhoff, et al. (2008). "Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells." Nat Rev Cancer **8**(5): 329-40.
- Parker, J. S., M. Mullins, et al. (2009). "Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes." J Clin Oncol **27**(8): 1160-7.
- Peinado, H., D. Olmeda, et al. (2007). "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?" Nat Rev Cancer **7**(6): 415-28.
- Perou, C. M., T. Sorlie, et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." Nature **406**(6797): 747-52.
- Peters, L. M., D. W. Anderson, et al. (2002). "Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28." Hum Mol Genet **11**(23): 2877-85.
- Polyak, K. and R. A. Weinberg (2009). "Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits." Nat Rev Cancer **9**(4): 265-73.
- Price, J. E., A. Polyzos, et al. (1990). "Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice." Cancer Res **50**(3): 717-21.
- Pyrgaki, C., A. Liu, et al. (2011). "Grainyhead-like 2 regulates neural tube closure and adhesion molecule expression during neural fold fusion." Dev Biol **353**(1): 38-49.
- Rifat, Y., V. Parekh, et al. (2010). "Regional neural tube closure defined by the Grainy head-like transcription factors." Dev Biol **345**(2): 237-45.
- Rodda, S., S. Sharma, et al. (2001). "CRTR-1, a developmentally regulated transcriptional repressor related to the CP2 family of transcription factors." J Biol Chem **276**(5): 3324-32.
- Sanger, F. and A. R. Coulson (1975). "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase." J Mol Biol **94**(3): 441-8.

- Sarrio, D., S. M. Rodriguez-Pinilla, et al. (2008). "Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype." Cancer Res **68**(4): 989-97.
- Saxena, U. H., L. Owens, et al. (2010). "Prolyl isomerase Pin1 regulates transcription factor LSF (TFCP2) by facilitating dephosphorylation at two serine-proline motifs." J Biol Chem **285**(41): 31139-47.
- Saxena, U. H., C. M. Powell, et al. (2009). "Phosphorylation by cyclin C/cyclin-dependent kinase 2 following mitogenic stimulation of murine fibroblasts inhibits transcriptional activity of LSF during G1 progression." Mol Cell Biol **29**(9): 2335-45.
- Senga, K., K. E. Mostov, et al. (2012). "Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25." Mol Biol Cell **23**(15): 2845-55.
- Sergina, N. V., M. Rausch, et al. (2007). "Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3." Nature **445**(7126): 437-41.
- Simon, R. and G. Sauter (2002). "Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors." Exp Hematol **30**(12): 1365-72.
- Sithanandam, G. and L. M. Anderson (2008). "The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy." Cancer Gene Ther **15**(7): 413-48.
- Sorlie, T., C. M. Perou, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10869-74.
- Sorlie, T., R. Tibshirani, et al. (2003). "Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8418-23.
- Spaderna, S., O. Schmalhofer, et al. (2006). "A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer." Gastroenterology **131**(3): 830-40.
- Stramer, B. and P. Martin (2005). "Cell biology: master regulators of sealing and healing." Curr Biol **15**(11): R425-7.
- Sueyoshi, T., R. Kobayashi, et al. (1995). "A nuclear factor (NF2d9) that binds to the male-specific P450 (Cyp 2d-9) gene in mouse liver." Mol Cell Biol **15**(8): 4158-66.
- Tanaka, Y., F. Kanai, et al. (2008). "Gain of GRHL2 is associated with early recurrence of hepatocellular carcinoma." J Hepatol **49**(5): 746-57.
- Tao, J., E. Kulyev, et al. (2005). "BMP4-dependent expression of Xenopus Grainyhead-like 1 is essential for epidermal differentiation." Development **132**(5): 1021-34.
- Thiery, J. P., H. Acloque, et al. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." Cell **139**(5): 871-90.
- Thiery, J. P. and J. P. Sleeman (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(2): 131-42.
- Thomas, M. C. and C. M. Chiang (2006). "The general transcription machinery and general cofactors." Crit Rev Biochem Mol Biol **41**(3): 105-78.

- Ting, S. B., J. Caddy, et al. (2005). "A homolog of Drosophila grainy head is essential for epidermal integrity in mice." Science **308**(5720): 411-3.
- Ting, S. B., T. Wilanowski, et al. (2003). "The identification and characterization of human Sister-of-Mammalian Grainyhead (SOM) expands the grainyhead-like family of developmental transcription factors." Biochem J **370**(Pt 3): 953-62.
- To, S., S. J. Rodda, et al. (2010). "Modulation of CP2 family transcriptional activity by CRTR-1 and sumoylation." PLoS One **5**(7): e11702.
- Tootle, T. L. and I. Rebay (2005). "Post-translational modifications influence transcription factor activity: a view from the ETS superfamily." Bioessays **27**(3): 285-98.
- Tuckfield, A., D. R. Clouston, et al. (2002). "Binding of the RING polycomb proteins to specific target genes in complex with the grainyhead-like family of developmental transcription factors." Mol Cell Biol **22**(6): 1936-46.
- Uv, A. E., E. J. Harrison, et al. (1997). "Tissue-specific splicing and functions of the Drosophila transcription factor Grainyhead." Mol Cell Biol **17**(11): 6727-35.
- Uv, A. E., C. R. Thompson, et al. (1994). "The Drosophila tissue-specific factor Grainyhead contains novel DNA-binding and dimerization domains which are conserved in the human protein CP2." Mol Cell Biol **14**(6): 4020-31.
- van 't Veer, L. J., H. Dai, et al. (2002). "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer." Nature **415**(6871): 530-6.
- Van Laer, L., E. Van Eyken, et al. (2008). "The grainyhead like 2 gene (GRHL2), alias TFCP2L3, is associated with age-related hearing impairment." Hum Mol Genet **17**(2): 159-69.
- Varma, S., Y. Cao, et al. (2012). "The Transcription Factors Grainyhead-like 2 and NK2 Homeobox 1 Form a Regulatory Loop that Coordinates Lung Epithelial Cell Morphogenesis and Differentiation." J Biol Chem **287**(44): 37282-95.
- Venkatesan, K., H. R. McManus, et al. (2003). "Functional conservation between members of an ancient duplicated transcription factor family, LSF/Grainyhead." Nucleic Acids Res **31**(15): 4304-16.
- Volker, J. L., L. E. Rameh, et al. (1997). "Mitogenic stimulation of resting T cells causes rapid phosphorylation of the transcription factor LSF and increased DNA-binding activity." Genes Dev **11**(11): 1435-46.
- Vona, B., I. Nanda, et al. (2013). "Confirmation of GRHL2 as the gene for the DFNA28 locus." Am J Med Genet A.
- Wang, S. and C. Samakovlis (2012). "Grainy head and its target genes in epithelial morphogenesis and wound healing." Curr Top Dev Biol **98**: 35-63.
- Wang, S. E., B. Xiang, et al. (2008). "Transforming growth factor beta engages TACE and ErbB3 to activate phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in ErbB2-overexpressing breast cancer and desensitizes cells to trastuzumab." Mol Cell Biol **28**(18): 5605-20.
- Weber, K., U. Mock, et al. (2010). "Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis." Gene Ther **17**(4): 511-20.

- Weigelt, B., J. L. Peterse, et al. (2005). "Breast cancer metastasis: markers and models." Nat Rev Cancer **5**(8): 591-602.
- Weinberg, R. A. (2007). The Biology of Cancer. New York; Abingdon, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
- Werner, S. (2009). Die Rolle des Transkriptionsfaktors Grainyhead-like 2 (GRHL2) in der Karzinogenese. Biologie. Hamburg, Universität Hamburg: 125.
- Werth, M., K. Walentin, et al. (2010). "The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex." Development **137**(22): 3835-45.
- Wilanowski, T., J. Caddy, et al. (2008). "Perturbed desmosomal cadherin expression in grainy head-like 1-null mice." EMBO J **27**(6): 886-97.
- Wilanowski, T., A. Tuckfield, et al. (2002). "A highly conserved novel family of mammalian developmental transcription factors related to Drosophila grainyhead." Mech Dev **114**(1-2): 37-50.
- Woelfle, U., J. Cloos, et al. (2003). "Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer." Cancer Res **63**(18): 5679-84.
- Wolff, A. C., M. E. Hammond, et al. (2007). "American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer." J Clin Oncol **25**(1): 118-45.
- Wu, F. K., J. A. Garcia, et al. (1988). "Purification of the human immunodeficiency virus type 1 enhancer and TAR binding proteins EBP-1 and UBP-1." EMBO J **7**(7): 2117-30.
- Xiang, X., Z. Deng, et al. (2012). "Grhl2 determines the epithelial phenotype of breast cancers and promotes tumor progression." PLoS One **7**(12): e50781.
- Yan, G. R., S. H. Xu, et al. (2011). "Global identification of miR-373-regulated genes in breast cancer by quantitative proteomics." Proteomics **11**(5): 912-20.
- Yang, X., P. Vasudevan, et al. (2013). "Bridging cancer biology with the clinic: relative expression of a GRHL2-mediated gene-set pair predicts breast cancer metastasis." PLoS One **8**(2): e56195.
- Yang, X. J. and E. Seto (2008). "Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications." Mol Cell **31**(4): 449-61.
- Yin, W., Y. Jiang, et al. (2011). "Trastuzumab in the adjuvant treatment of HER2-positive early breast cancer patients: a meta-analysis of published randomized controlled trials." PLoS One **6**(6): e21030.
- Yoneda, T., P. J. Williams, et al. (2001). "A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro." J Bone Miner Res **16**(8): 1486-95.
- Yu, Z., K. K. Lin, et al. (2006). "The Grainyhead-like epithelial transactivator Get-1/Grhl3 regulates epidermal terminal differentiation and interacts functionally with LMO4." Dev Biol **299**(1): 122-36.

## 8 Anhang

### 8.1 Laborgeräte

**Tab. 8-1: Häufig verwendete Laborgeräte und deren Hersteller.**

Gerätebezeichnung	Hersteller/Vertreiber	Firmensitz
Analysenwaage Satorius BP6100	MS Laborgeräte	Heidelberg
Analysenwaage Satorius CP2245	MS Laborgeräte	Heidelberg
Biofuge pico Heraeus	Kendro	Langenselbold
DAKO Färbeautomat	DAKO Diagnostika GmbH	Hamburg
Dampfsterilisator	H+P	Oberschleißheim
Digitale Bildverarbeitung KAPPA	KAPPA opto-electronics GmbH	Gleichen
DNA Engine PTC-200	MJ Research	Waltham, USA
Durchlichtmikroskop mit Kamera	Leica Mikroskopie und Systeme GmbH	Wetzlar
Durchlichtmikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH	Wetzlar
Filmentwickler Curix 60	AGFA HealthCare	Bonn
Geldokumentationssystem GeneGenius 2	Syngene	Cambridge, UK
Gelkammer ComPor L Mini	Bioplastics RV	Landgraaf, NL
Geltrockner 583	BioRad	München
Gießstand Hoefer	Amersham Biosciences	Buckinghamshire, UK
Heizblock DRI-BLOCK® DB-2A	Techne	Staffordshire, UK
Hera150-Brutschrank	Kendro	Langenselbold
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf AG	Hamburg
Mikrowelle	Promicro	München
Minigelkammern Hoefer SE 250	Amersham Biosciences	Buckinghamshire, UK
Netzteil E143	Consort	Turnhout, BE
Netzteil E835	Consort	Turnhout, BE
pH-Meter inoLab	WTW	Heidelberg
Photometer 6131	Eppendorf AG	Hamburg

Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt
Reagenzglas-Mischer	neoLab	Heidelberg
Realplex <sup>4</sup> Mastercycler eppgradient S	Eppendorf AG	Hamburg
Rollmischer Stuart SRT1	Bibby Sterilin	Staffordshire, UK
Scanner Epson 1680	LaserSoft Imaging AG	Kiel
Schüttler	Heidolph Instruments GmbH	Schwabach
Semidry-Blotapparatur	BioRad	München
Thermocycler Flexigene	Techne	Staffordshire, UK
Trockenschrank Heraeus B12	Kendro	Langselbold
Vortex-Genie 2	Scientific Industries	New York, USA
Wasserbad GFL-1003	GmbH für Labortechnik	Burgwedel
Zentrifuge Heraeus 3S-R	Kendro	Langselbold
Zentrifuge Rotofix 32	Hettich	Villingen-Schwenningen

## 8.2 Vektoren und Expressionsplasmide

**Tab. 8-2: Auflistung der verwendeten Vektoren.**

Bezeichnung	Größe	Bezugsquelle/Referenz
pBluescript II SK (+/-)	2961 bp	Stratagene, La Jolla, USA
pMXs	5871 bp	(Kitamura, Onishi et al. 1995)
pMXs-IP	5847 bp	(Kitamura, Onishi et al. 1995)
phCMV3	5284 bp	Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, USA

**Tab. 8-3: Auflistung der generierten Expressionsplasmide.**

Bezeichnung	Experiment
pBSKII/GRHL2 <sup>WT</sup>	3.4.1
pBSKII/GRHL2 <sup>T164A</sup>	3.4.1
pBSKII/GRHL2 <sup>T211A</sup>	3.4.1

pBSKII/GRHL2 <sup>S557A</sup>	3.4.1
pMXs/GRHL2 <sup>WT</sup>	3.4.1
pMXs/GRHL2 <sup>T164A</sup>	3.4.1
pMXs/GRHL2 <sup>T211A</sup>	3.4.1
pMXs/GRHL2 <sup>S557A</sup>	3.4.1
pMXs-IP/GRHL2	3.1.1, 3.1.5
pMXs-IP/GRHL2-DN	3.1.3
pMXs-IP/GRHL2 <sup>T211A</sup>	3.4.4
phCMV3/ZEB1	3.2

**Tab. 8-4: Auflistung der shRNA-Expressionsplasmide.**

Interne Bezeichnung	TRC-Referenznummer	Zielgen	Vektor	Bezugsquelle
GRHL2#1 shRNA	TRCN0000015808	<i>GRHL2</i>	pLKO.1	Open Biosystems, Huntsville, USA
GRHL2#2 shRNA	TRCN0000015809	<i>GRHL2</i>	pLKO.1	Open Biosystems, Huntsville, USA
GRHL2#3 shRNA	TRCN0000015810	<i>GRHL2</i>	pLKO.1	Open Biosystems, Huntsville, USA
GRHL2#4 shRNA	TRCN0000015811	<i>GRHL2</i>	pLKO.1	Open Biosystems, Huntsville, USA
GRHL2#5 shRNA	TRCN0000015812	<i>GRHL2</i>	pLKO.1	Open Biosystems, Huntsville, USA
ZEB1#1 shRNA	TRCN0000017563	<i>ZEB1</i>	pLKO.1	Open Biosystems, Huntsville, USA
ZEB1#2 shRNA	TRCN0000017564	<i>ZEB1</i>	pLKO.1	Open Biosystems, Huntsville, USA
ZEB1#3 shRNA	TRCN0000017565	<i>ZEB1</i>	pLKO.1	Open Biosystems, Huntsville, USA
ZEB1#4 shRNA	TRCN0000017566	<i>ZEB1</i>	pLKO.1	Open Biosystems, Huntsville, USA
ZEB1#5 shRNA	TRCN0000017567	<i>ZEB1</i>	pLKO.1	Open Biosystems, Huntsville, USA
non-target shRNA	Bestellnr: SHC002	-	pLKO.1	Sigma-Aldrich, München
GFP-shRNA	Bestellnr: SHC005	<i>eGFP</i>	pLKO.1	Sigma-Aldrich, München

### 8.3 Oligonukleotide

**Tab. 8-5: Für Klonierungen und PCR-Analysen verwendete Oligonukleotide.**

Name	Art	Experiment	Zielgen	Sequenz
FL-A-f	5'	3.4.1	<i>GRHL2</i>	GCGCATCGTAGGATCCGGATC AAACATGTCACAAGAGTCG
GRHL2-2	3'	3.4.1	<i>GRHL2</i>	GCGCTACAGTCGACTTAAGCGTA ATCCGGAACATCGTATGGGTAGA TTTCATGAGCGTGACCTTGAAGC
GRHL2-12	3'	3.1.1, 3.1.3, 3.4.4	<i>GRHL2</i>	GCGCTACAGCGCCGCTTAAGCGTAAT CCGGAACATCGTATGGGTAGGATCC GATTTCCATGAGCGTGACCTTGAAGC
GRHL2-13	5'	3.1.1, 3.4.4	<i>GRHL2</i>	GCGCATCGTAAGATCTGGATCA AACATGTCACAAGAGTCG
GRHL2-DN-up	5'	3.1.3	<i>GRHL2</i>	TCACGGTGGTGAAAGCTGAAG
ZEB1-up_2	5'	3.2	<i>ZEB1</i>	GCGCATCGGATCCGGCTTCATT TGTCTTTTCTTCAGACAC
ZEB1-do_2	3'	3.2	<i>ZEB1</i>	GCGCTACACTCGAGGTGACTCGA GCATTTAGACACAAGCG
L2-ChIP-PCR-up-2	5'	3.2	<i>GRHL2</i>	CCACAATCCCTAGTGTTCAGGTGTTGC
L2-ChIP-PCR-do-2	3'	3.2	<i>GRHL2</i>	CTAAAGGGTACAAGCCCCGAGGGACGAGC
GRHL2-fwd	5'	3.1.5	<i>GRHL2</i>	AACAGGAAGAAAGGGAAAGGCCAGG
GRHL2-rev	3'	3.1.5	<i>GRHL2</i>	TAGATTTCCATGAGCGTGACCTTG
$\beta$ -Actin-fwd	5'	3.1.5	<i><math>\beta</math>-Aktin</i>	CCTCCCTGGAGAAGAGCTACG
$\beta$ -Actin-rev	3'	3.1.5	<i><math>\beta</math>-Aktin</i>	AGGACTCCATGCCAGGAAG

**Tab. 8-6: Für quantitative Realtime-PCR verwendete Oligonukleotide.**

Name	Art	Experiment	Zielgen	Sequenz
ACTA2-f (SMA-f)	5'	3.1.4, 3.1.5	<i>ACTA2</i>	CTACTGCTGAGCGTGAGATTGTC
ACTA2-r (SMA-r)	3'	3.1.4, 3.1.5	<i>ACTA2</i>	CAGGCAACTCGTAACTCTTCTCAAG
CD24-f	5'	3.1.4	<i>CD24</i>	CACTGCTCCTACCCACGCAGAT

---

CD24-r	3'	3.1.4	<i>CD24</i>	CTTGGTGGTGGCATTAGTTGG
CD44-f	5'	3.1.4	<i>CD44</i>	CTACAGCATCTCTCGGACGGAGG
CD44-r	3'	3.1.4	<i>CD44</i>	CTGGGAGGTGTTGGATGTGAGG
CLDN3-f	5'	3.1.4, 3.1.5	<i>CLDN3</i>	CTTCATCGGCAGCAACATCATCAC
CLDN3-r	3'	3.1.4, 3.1.5	<i>CLDN3</i>	GTCGTACACCTTGCACTGCATCTG
CLDN4-f	5'	3.1.4, 3.1.5	<i>CLDN4</i>	CCTTCATCGGCAGCAACATTG
CLDN4-r	3'	3.1.4, 3.1.5	<i>CLDN4</i>	GATGATGCTGATGATGACGAG
CLDN6-f	5'	3.1.4	<i>CLDN6</i>	CATCGGCAACAGCATCGTGGTG
CLDN6-r	3'	3.1.4	<i>CLDN6</i>	GAATCCTTCTCCTCCACACAGG
CLDN7-f-2	5'	3.1.4, 3.1.5	<i>CLDN7</i>	CTGTGGATGGACTGCGTCACG
CLDN7-r-2	3'	3.1.4, 3.1.5	<i>CLDN7</i>	GTGCACTTCATGCCCATCGTGG
DR4-f	5'	3.1.4	<i>DR4</i>	GAGTTGTGTCCACCAGGATCTCAT
DR4-r	3'	3.1.4	<i>DR4</i>	GCTGTACATGGGAGGCAAGCAAAC
DR5-f	5'	3.1.4	<i>DR5</i>	GGTGTGATTCAGGTG AAGTGG
DR5-r	3'	3.1.4	<i>DR5</i>	GCACATCTCAGGAGAATCTTC
DSC2-f	5'	3.1.4, 3.1.5	<i>DSC2</i>	CGTCCTGTAGATCGTGAGCAG
DSC2-r	3'	3.1.4, 3.1.5	<i>DSC2</i>	CTTCAGGCGTGTGTGCATCGTG
DSG2-f	5'	3.1.4, 3.1.5	<i>DSG2</i>	GGACAGAGAGGAACACAGCAGC
DSG2-r	3'	3.1.4, 3.1.5	<i>DSG2</i>	CCTCCTTCATTTCTGATGC
DSP-f	5'	3.1.4, 3.1.5	<i>DSP</i>	GACCAACTTGTCCTCAATCAGC
DSP-r	3'	3.1.4, 3.1.5	<i>DSP</i>	GGTATGCTTCAGTAGACTGCG
E-CADHERIN-f	5'	3.1.4, 3.1.5	<i>CDH1</i>	CAGGAACCTCTGTGATGGAG
E-CADHERIN-r	3'	3.1.4, 3.1.5	<i>CDH1</i>	CACTGATGACTCCTGTGTTCTCTG
EPCAM-f-3	5'	3.1.4, 3.1.5	<i>EPCAM</i>	CGCAGCTCAGGAAGAATGTG
EPCAM-r-3	3'	3.1.4, 3.1.5	<i>EPCAM</i>	GAAGTACACTGGCATTGACG
ERBB3-f	5'	3.1.4	<i>ERBB3</i>	AAGCTCTACGAGAGGTGTGA
ERBB3-r	3'	3.1.4	<i>ERBB3</i>	TGGGCAATGGTAGAGTAGAG
FAS-f	5'	3.1.4	<i>FAS</i>	CCTCTGGTTCTTACGTCTGTTGC
FAS-r	3'	3.1.4	<i>FAS</i>	GCCTCCAAGTTCTGAGTCTCAAC

---

---

GAPDH-f	5'	3.1.4, 3.1.5, 3.2	<i>GAPDH</i>	TGTTGCCATCAATGACCCCTT
GAPDH-r	3'	3.1.4, 3.1.5, 3.2	<i>GAPDH</i>	CTCCACGACGTACTIONCAGCG
GRHL2-f-exo	5'	3.1.4, 3.1.5	<i>GRHL2</i>	CATGCCTGATCTCCACTCACAG
GRHL2-r-exo	3'	3.1.4, 3.1.5	<i>GRHL2</i>	CTGCCACCTTCTCGTTCATCA
GRHL2-f-endo	5'	3.1.4, 3.2	<i>GRHL2</i>	CACACACCTTCACCTGCACAG
GRHL2-r-endo	3'	3.1.4, 3.2	<i>GRHL2</i>	TTTGATCCAATGAACTTGCTCC
KRT7-f	5'	3.1.4	<i>KRT7</i>	CATCGACAAGGTGCGGTTTCTGG
KRT7-r	3'	3.1.4	<i>KRT7</i>	CTGCTCTTGGCCGACTTCTGCTC
KRT8-f	5'	3.1.4	<i>KRT8</i>	CAGCAGCAGAAGACGGCTCGAAGC
KRT8-r	3'	3.1.4	<i>KRT8</i>	CTTCAGTTCTCCTGGCCCAGAGTCTC
KRT18-f	5'	3.1.4	<i>KRT18</i>	GAGTCAAGTATGAGACAGAGCTGGC
KRT18-r	3'	3.1.4	<i>KRT18</i>	CTCTGTCTCCAGCTGCAGTCGTGTG
N-CADHERIN-f-2	5'	3.1.5	<i>CDH2</i>	GCTTCAGGCGTCTGTAGAGGCTTC
N-CADHERIN-r-2	3'	3.1.5	<i>CDH2</i>	GAGAAGAGGCTGTCCTTCATGC
OCLN-f	5'	3.1.4	<i>OCLN</i>	GAACCCAACTGCTCAGTCTTCTGG
OCLN-r	3'	3.1.4	<i>OCLN</i>	CAGTACAATGGCAATGGCCTCCTG
P-CADHERIN-f	5'	3.1.4	<i>CDH3</i>	CCCAGAGACTGAATCAGCTC
P-CADHERIN-r	3'	3.1.4	<i>CDH3</i>	GCAATCTCCTCCCGGTCCAG
RAB25-f	5'	3.1.4	<i>RAB25</i>	CAAGGTGGTCTGATCGGCGAATC
RAB25-r	3'	3.1.4	<i>RAB25</i>	GGCTGTCGTGGCTGAACTCATTG
RPLP0-f	5'	3.1.4, 3.1.5, 3.2	<i>RPLP0</i>	ACCCAGCTCTGGAGAACTGC
RPLP0-r	3'	3.1.4, 3.1.5, 3.2	<i>RPLP0</i>	TGAGGTCTCCTTGGTGAACA
SLUG-f	5'	3.1.5	<i>SNAI2</i>	CATTAGAACTCACACGGGGGAGAAG
SLUG-r	3'	3.1.5	<i>SNAI2</i>	GTGCAGGAGAGACATTCTGGAG
TERT-f	5'	3.1.4	<i>TERT</i>	GCATTGGAATCAGACAGCAC
TERT-r	3'	3.1.4	<i>TERT</i>	CGTAGTCCATGTTTACAATCGG
VIMENTIN-f	5'	3.1.4, 3.1.5	<i>VIM</i>	CAGACAGGATGTTGACAATGCGTC
VIMENTIN-r	3'	3.1.4, 3.1.5	<i>VIM</i>	GTGAGGTCTCAGGCTTGAAACATCC
ZEB1-f	5'	3.1.4, 3.1.5, 3.2	<i>ZEB1</i>	GCACCTGAAGAGGACCAGAG

---

ZEB1-r	3'	3.1.4, 3.1.5, 3.2	<i>ZEB1</i>	TGCATCTGGTGTTCATTTT
ZO-1-f	5'	3.1.4	<i>TJP1</i>	ACGCTTCACAGGGCTCCTGGATTG
ZO-1-r	3'	3.1.4	<i>TJP1</i>	CTGTCCTTCAGCTGGTCCTCCTTC

**Tab. 8-7: Zur Einführung zielgerichteter Mutationen verwendete Oligonukleotide.**

Name	Art	Experiment	Zielgen	Sequenz
GRHL2T164Aup	5'	3.4.1	<i>GRHL2</i>	GGTGAAAGCTGAAGATTTTCGACCAGTT TTCATGGCCCCACC
GRHL2T164Ado	3'	3.4.1	<i>GRHL2</i>	GGTGGGGCCATGAAAAGTGGTGCGAAAT CTTCAGCTTTCCACC
GRHL2T211Aup	5'	3.4.1	<i>GRHL2</i>	CTCAAAGACGACCAGCGCAGCGCTCCGGA CAGCACATACAGCGAG
GRHL2T211Ado	3'	3.4.1	<i>GRHL2</i>	CTCGCTGTATGTGCTGTCCGGAGCGCTGC GCTGGTCGCTTTGAG
GRHL2S557Aup	5'	3.4.1	<i>GRHL2</i>	GCATTGATGTTGAAGGCTCCACAGTGAAGG
GRHL2S557Ado	3'	3.4.1	<i>GRHL2</i>	CCTTCACTGTGGGAGCCTTCAACATCAATGC

**Tab. 8-8: Für EMSA verwendete Oligonukleotide.**

Name	Art	Experiment	Zielgen	Sequenz
L2ZEB1Box1-wt-up	5'	3.2	<i>GRHL2</i>	CGGAGTGAGTTACCTGCACTCGGAGA
L2ZEB1Box1-wt-do	3'	3.2	<i>GRHL2</i>	TCTCCGAGTGACAGGTAAGTCACTCCG
L2ZEB1Box1-mt-up	5'	3.2	<i>GRHL2</i>	CGGAGTGAGTTACCGGCACTCGGAGA
L2ZEB1Box1-mt-do	3'	3.2	<i>GRHL2</i>	TCTCCGAGTGCCGGTAAGTCACTCCG
L2ZEB1Box2-wt-up	5'	3.2	<i>GRHL2</i>	AGAAGGGCCTTACCTGAGCGCGCCTC
L2ZEB1Box2-wt-do	3'	3.2	<i>GRHL2</i>	GAGGCGCGCTCAGGTAAGGCCCTTCT
L2ZEB1Box2-mt-up	5'	3.2	<i>GRHL2</i>	AGAAGGGCCTTACCGGAGCGCGCCTC
L2ZEB1Box2-mt-do	3'	3.2	<i>GRHL2</i>	GAGGCGCGCTCCGGTAAGGCCCTTCT
L2ZEB1Box3-wt-up	5'	3.2	<i>GRHL2</i>	CAATGGCAGCTCACCTGAGGGAGCTCC
L2ZEB1Box3-wt-do	3'	3.2	<i>GRHL2</i>	GGAGCTCCCTCAGGTGAGCTGCCATTG

L2ZEB1Box3-mt-up	5'	3.2	GRHL2	CAATGGCAGCTCACCGGAGGGAGCTCC
L2ZEB1Box3-mt-do	3'	3.2	GRHL2	GGAGCTCCCTCCGGTGAGCTGCCATTG

**Tab. 8-9: Für DNA-Sequenzierungsanalysen verwendete Oligonukleotide.**

Name	Art	Experiment	Ziel	Sequenz
T3	5'	3.4.1	pBSKII	AATTAACCCTCACTAAAGGG
pT7	3'	3.4.1	pBSKII	TTAATACGACTCACTATAGGG
GRHL2-Seq1	5'	3.4.1	GRHL2	CCCACCTGTGCACTATCCC
GRHL2-Seq2	3'	3.4.1	GRHL2	GGTATGGCAGCCAACCTCC

## 8.4 Antikörper

**Tab. 8-10: Für immunchemische Analysen verwendete Primärantikörper.**

Antigen	m*, p*	Spezies	Klon	Herkunft
GRHL2-P1	p	Kaninchen	-	eigene Herstellung (Davids Biotechnologie, Regensburg)
GRHL2-P2	p	Kaninchen	-	eigene Herstellung (Davids Biotechnologie, Regensburg)
P <sup>211</sup> -GRHL2-1	p	Kaninchen	-	eigene Herstellung (Davids Biotechnologie, Regensburg)
P <sup>211</sup> -GRHL2-2	p	Kaninchen	-	eigene Herstellung (Davids Biotechnologie, Regensburg)
CD24	m	Maus	SWA11	P. Altevogt (DKFZ Heidelberg)
EPCAM	m	Maus	VU-1D9	Novacastra
E-Cadherin	m	Maus	36	BD Biosciences
p44/42 MAPK (Erk1/2)	m	Kaninchen	137F5	Cell Signaling Technology
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)	m	Kaninchen	D13.14.4E	Cell Signaling Technology
ErbB3	p	Kaninchen	C17	Santa Cruz
HSC70	m	Maus	B6	Santa Cruz
KRT-8	m	Maus	Ks 8.7	Progen Biotechnik

N-Cadherin	p	Kaninchen	NB600-1038	Novus Biologicals
NFKB p65	p	Kaninchen	A	Santa Cruz
RNA pol II	m	Maus	39097	Active Motif
Vimentin	m	Maus	RV202	BD Biosciences
ZEB1	p	Kaninchen	H-102	Santa Cruz
ZEB1	p	Kaninchen	HPA027524	Sigma-Aldrich

\*: m=monoklonal; p=polyklonal

**Tab. 8-11: Verwendete konjugierte Sekundärantikörper.**

Antigen	Spezies	Konjugat	Herkunft
Kaninchen	Schwein	Peroxidase	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Maus	Kaninchen	Peroxidase	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

## 8.5 Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1-1: Anatomie der duktulo-lobulären Einheit der Brustdrüse mit histologischen Veränderungen.</i>	2
<i>Abb. 1-2: Schematische Darstellung des Ablaufs der EMT und des reversen Prozesses, der MET.</i>	6
<i>Abb. 1-3: Schematischer Aufbau der Grainyhead-Transkriptionsfaktoren.</i>	8
<i>Abb. 1-4: Phylogenetischer Stammbaum der Grainyhead-Familie von Transkriptionsfaktoren.</i>	10
<i>Abb. 1-5: Analyse der GRHL2-Expression in Mammakarzinomzelllinien.</i>	14
<i>Abb. 3-1: MDA-MB-231-Zellen mit stabiler GRHL2-Proteinexpression.</i>	49
<i>Abb. 3-2: Zellmorphologie des MDA-MB-231-Überexpressionssystems.</i>	50
<i>Abb. 3-3: Analyse der ERBB3-Expression und des Proliferationsverhaltens von MDA-MB-231-Zellen mit stabiler GRHL2-Expression.</i>	50
<i>Abb. 3-4: Bestimmung des verankerungsunabhängigen Wachstums der Zelllinien mittels Weich-Agar-Assay.</i>	51
<i>Abb. 3-5: Untersuchung der Migrations- und Invasionsfähigkeit von MDA-MB-231-Zellen mit stabiler GRHL2-Expression.</i>	52
<i>Abb. 3-6: Vergleich der Primärtumorgröße in immundefizienten Mäusen.</i>	53
<i>Abb. 3-7: Analyse der Lungenmetastasen in den Rag2<sup>-/-</sup> γ<sup>-/-</sup>- und den SCID γ<sup>-/-</sup>-Mäusen.</i>	54
<i>Abb. 3-8: Knockdown der GRHL2-Genexpression in T47-D-Zellen.</i>	55
<i>Abb. 3-9: Knockdown der GRHL2-Genexpression in MDA-MB-468-Zellen.</i>	56
<i>Abb. 3-10: Zellmorphologie des MDA-MB-468-Knockdown-Systems.</i>	56
<i>Abb. 3-11: Analyse der ERBB3-Expression und des Proliferationsverhaltens von MDA-MB-468-Zellen mit einem Knockdown der GRHL2-Expression.</i>	57
<i>Abb. 3-12: Analyse der ERBB3-Expression von T47-D-Zellen mit einem Knockdown der GRHL2-Expression.</i>	58

Abb. 3-13: Zeitabhängiger Knockdown der GRHL2-Genexpression in MDA-MB-468-Zellen. _____	59
Abb. 3-14: Darstellung der GRHL2-DN-Proteinexpression in MDA-MB-468-Zellen. _____	60
Abb. 3-15: Zellmorphologie des MDA-MB-468-Zellsystems mit Überexpression von GRHL2-DN. _____	60
Abb. 3-16: Analyse der ERBB3-Expression und des Proliferationsverhaltens von MDA-MB-468-Zellen mit stabiler GRHL2-DN-Expression. _____	61
Abb. 3-17: Untersuchung des klonalen und verankerungsunabhängigen Wachstums von MDA-MB-468-Zellen mit stabiler GRHL2-DN-Expression. _____	62
Abb. 3-18: Untersuchung der Migrations- und Invasionsfähigkeit von MDA-MB-468-Zellen mit stabiler GRHL2-DN-Expression. _____	63
Abb. 3-19: GRHL2-induzierte Veränderungen in der Proteinexpression. _____	66
Abb. 3-20: Untersuchung der GRHL2-Expression in MCF-10A-Zellen. _____	67
Abb. 3-21: Morphologie des MCF-10A-Überexpressionssystems. _____	68
Abb. 3-22: Durch GRHL2- und TGF- $\beta$ -induzierte Genexpressionsveränderungen in den MCF-10A-Zellen. _____	69
Abb. 3-23: GRHL2- und TGF- $\beta$ -induzierte Veränderungen in der Proteinexpression. _____	70
Abb. 3-24: Schematische Darstellung der regulatorischen Region des humanen GRHL2-Gens. _____	71
Abb. 3-25: ZEB1- und GRHL2-Proteinexpressionsmuster in zehn humanen Mammakarzinomzelllinien. _____	71
Abb. 3-26: Knockdown der ZEB1-Genexpression und dessen Einfluss auf die GRHL2-Expression in MDA-MB-231-Zellen. _____	72
Abb. 3-27: Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) für das ZEB1-Protein. _____	73
Abb. 3-28: Chromatin Immunoprecipitation Assay (ChIP) für das ZEB1-Protein. _____	74
Abb. 3-29: Immunhistochemischer Nachweis der GRHL2-Expression in normalem Brustdrüsengewebe und Mammakarzinomen. _____	75
Abb. 3-30: Untersuchung des GRHL2-Proteinmusters mittels SDS-PAGE. _____	79
Abb. 3-31: Schematische Darstellung der potentiellen Phosphorylierungsstellen des GRHL2-Proteins. _____	79
Abb. 3-32: Untersuchung der mittels Mutagenese-PCR generierten GRHL2-Mutanten. _____	80
Abb. 3-33: Untersuchung des GRHL2-Proteinmusters in einem hochauflösenden Gel mittels SDS-PAGE. _____	80
Abb. 3-34: Untersuchung der GRHL2-Mutanten mit dem P <sup>211</sup> -GRHL2-1-Antikörper. _____	81
Abb. 3-35: Dephosphorylierung des GRHL2-Proteins mittels Lambda-Phosphatase. _____	82
Abb. 3-36: Studien zur GRHL2-Phosphorylierung mittels MEK1-Inhibitor. _____	84
Abb. 3-37: Expressionsstärke des GRHL2 <sup>WT</sup> - und GRHL2 <sup>T211A</sup> -Proteins. _____	85
Abb. 3-38: Halbwertszeitbestimmung mittels Cycloheximid. _____	86
Abb. 4-1: Schematische Darstellung des regulatorischen ZEB1/GRHL2/miR-200-Netzwerks. _____	96

## 8.6 Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Molekulare Klassifizierung der Mammakarzinome. _____	3
Tab. 1-2: Auflistung der wichtigsten EMT-Transkriptionsfaktoren und deren Strukturmotiv.* _____	7
Tab. 2-1: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien und -zusätze. _____	17

Tab. 2-2: Bezeichnung und Herkunft der verwendeten Zelllinien.	18
Tab. 3-1: GRHL2-induzierte Genexpressionsveränderungen in den Mammakarzinom-Modellsystemen.	65
Tab. 3-2: Einfluss des veränderten GRHL2-Expressionsniveaus auf die ERBB3-Expression in humanen Mammakarzinomzelllinien.	67
Tab. 3-3: Untersuchung der GRHL2-Proteinexpression in humanen Mammakarzinomen.	77
Tab. 3-4: Identifizierte Kinasen, die an der Phosphorylierung von T <sup>211</sup> im GRHL2-Protein beteiligt sein könnten.	83
Tab. 8-1: Häufig verwendete Laborgeräte und deren Hersteller.	A-1
Tab. 8-2: Auflistung der verwendeten Vektoren.	A-2
Tab. 8-3: Auflistung der generierten Expressionsplasmide.	A-2
Tab. 8-4: Auflistung der shRNA-Expressionsplasmide.	A-3
Tab. 8-5: Für Klonierungen und PCR-Analysen verwendete Oligonukleotide.	A-4
Tab. 8-6: Für quantitative Realtime-PCR verwendete Oligonukleotide.	A-4
Tab. 8-7: Zur Einführung zielgerichteter Mutationen verwendete Oligonukleotide.	A-7
Tab. 8-8: Für EMSA verwendete Oligonukleotide.	A-7
Tab. 8-9: Für DNA-Sequenzierungsanalysen verwendete Oligonukleotide.	A-8
Tab. 8-10: Für immunchemische Analysen verwendete Primärantikörper.	A-8
Tab. 8-11: Verwendete konjugierte Sekundärantikörper.	A-9
Tab. 8-12: Verwendete Gefahrstoffe.	A-14
Tab. 8-13: Liste der GHS-Kodierungen und der dazugehörigen Piktogramme.	A-16

## 8.7 Abkürzungen

A	Ampere, Alanin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
ChIP	<i>Chromatin Immunoprecipitation Assay</i>
CMV	Cytomegalovirus
CP	<i>Crossing Point</i>
DCIS	Ductal carcinoma in situ
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Dominant-negativ
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>

---

dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ERBB3	<i>v-erb-B2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated Kinases</i>
FC	<i>Fold Change</i>
FCS	<i>Fetale Calf Serum</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Grh	<i>Grainyhead</i>
GRHL	<i>Grainyhead-like</i>
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSC-70	<i>Heat Shock Protein Cognate 70</i>
IP	Immunopräzipitation
Kap.	Kapitel
kb	Kilo-Basenpaar
kDa	Kilo-Dalton
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth Medium</i>
LCIS	Lobular Carcinoma in situ
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MEK1	<i>Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 1</i>
MET	Mesenchymale-epitheliale Transition
min	Minute
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MT	Mutante

---

MTT	<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NP40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pBSKII	pBluescript II SK (+/-)
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
ψNX-ampho	Phoenix amphotrop
ψNX-eco	Phoenix ecotrop
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PTM	Posttranslationale Modifikation
(q)RT-PCR	<i>(quantitative) realtime Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	<i>Rounds per Minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
sec	Sekunde
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
T	Threonin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	<i>Tris buffered Acetic Acid EDTA</i>
TBE	<i>Tris buffered Boric Acid EDTA</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TMA	<i>Tissue Micro Array</i>
TSS	Transkriptionsstartpunkt
U	<i>Unit</i>
UV	Ultraviolett

V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
ZEB1	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 1</i>

## 8.8 Sicherheitstechnische Daten

Nachfolgend sind die in der Arbeit verwendeten Gefahrstoffe aufgelistet. Für jede Substanz sind die Sicherheitskodierungen sowie die P- und H-Sätze nach dem „Global harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien“ (GHS) angegeben.

**Tab. 8-12: Verwendete Gefahrstoffe.**

Substanz	GHS-Kodierung	H-Sätze	P-Sätze
Acrylamid	GHS06/08	H301, 312, 315, 317, 319, H332, 340, 350, 361f, 372	P201, 281, 301+310, 302+352, 304+340, 305+351+338
Ampicillin	GHS07/08	315, 317, 319, 334, 335	261, 280, 305+351+338, 342+311
APS	GHS03/07/08	H272, 302, 319, 335, 334, 317	P280, 305+351+338, 302+352, 304+341, 342+311
Borsäure	GHS08	360FD	201, 308+313
Calciumchlorid	GHS07	319	305+351+338
Chloroform	GHS07/08	H351, 302, 373, 315	P302+352, 314
Cycloheximid	GHS06/08/09	341, 360D, 300, 411	201, 264, 273, 281, 301+310, 308+313
DAB	GHS08	H341, H350	P201, P281, P308 + P313
DTT	GHS07	302, 315, 319	302+352, 305+351+338
EDTA	GHS07	H319	P264, 280, 305+351+338, 337+313
Essigsäure	GHS02/05/07	H226, 332, 302, 314, 335	P280, 301+330+331, 305+351+338
Ethanol	GHS02	H225	P210, 240, 243, 280, 303+361+353
Ethidiumbromid	GHS06/08	H341, 330, 302	P281, 304+P340

Formaldehydsg., 37%	GHS05/06/08	H330, 301+311, 314, 317, 335, 351, 370	P280, 301+330+331, 302+352, 304+340, 305+351+338
Formamid	GHS08	360D	201, 308+313
Hämalaun	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338, 302+352, 321, 405, 501
Hydrocortison	GHS08	361	281
Isopropanol	GHS02/07	H225, 319, 336	P210, 233, 305+351+338
Kaliumhydroxid	GHS05/07	302, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 309, 310
Kanamycin	GHS08	360	201, 308+313
Kristallviolett	GHS05/07/08/09	350, 302, 318, 410	273, 280, 305+351+338, 308+313
Luminol	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Manganchlorid	GHS06	301, 412	273, 301+310
Methanol	GHS02/06/08	H225, 301, 311, 331, 370	P243, 280, 301+310, 302+350, 304+340, 307+311
Natriumazid	GHS06/09	H300, 410	P273
Natriumhydroxid	GHS05	H314, 290	P280, 301+330+331, 305+351+338
Nonidet P-40	GHS05/07/09	302, 318, 411	273, 280, 305+351+338
Paraformaldehyd	GHS02/07/08	H228, 302, 315, 317, 319, 332, 335, 351	P202, 280, 302+352, 305+351+338, 308+313, 362
Phenol	GHS05/06/08	H301, 311, 314, 331, 341, 373	P261, 280, 301+310, 305+351+338, 310
PMSF	GHS05/06	301, 314	280, 305+351+338, 310
ProteinaseK	GHS07/08	315, 319, 334, 335	261, 305+351+338, 342+311
Puromycin	GHS07	302	-
Salzsäure, 37%	GHS06/07	H314, 335, 290	P280, 301+330+331, 305+351+338
SDS	GHS02/06	H228, 302, 311, 315, 319, 335	P210, 261, 280, 305+351+338

TEMED	GHS02/05/07	H225, 302, 314, 332	P243, 260, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340
Trizma Base	GHS07	H315, 319, 335	P261, 305+351+338
Wasserstoffperoxid, 30%	GHS03/05/07	H: 271, 332, 302, 314	P220, 261, 280, 305+351+338, 310

Tab. 8-13: Liste der GHS-Kodierungen und der dazugehörigen Piktogramme.

Piktogramm	GHS-Kodierung	Signalwort	Gefahrstoffklasse
	GHS01	Gefahr	Instabile explosive Stoffe, Gemische und Erzeugnisse mit Explosivstoff(en), selbstzersetzliche Stoffe und Gemische, Organische Peroxide
	GHS02	Gefahr	Entzündbar, selbsterhitzungsfähig, selbstzersetzlich, pyrophor, Organische Peroxide
	GHS03	Gefahr	Entzündend (oxidierend) wirkend
	GHS04	Achtung	Gase unter Druck, verdichtete, verflüssigte, tiefgekühlt verfl., gelöste Gase
	GHS05	Gefahr/Achtung	Auf Metalle korrosiv wirkend, hautätzend, schwere Augenschädigung
	GHS06	Gefahr	Akute Toxizität
	GHS07	Achtung	Diverse Gesundheitsgefahren

	GHS08	Gefahr	Zusätzliche Kennzeichnung diverser Kategorien
	GHS09	Achtung/Gefahr	Gewässergefährdend

## Auflistung der H- und P-Sätze

### H-Sätze

#### **H200-Reihe: Physikalische Gefahren**

H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H272	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
H280	Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

#### **H300-Reihe: Gesundheitsgefahren**

H300	Lebensgefahr bei Verschlucken.
H301	Giftig bei Verschlucken.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H310	Lebensgefahr bei Hautkontakt.
H311	Giftig bei Hautkontakt.
H312	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H318	Verursacht schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H330	Lebensgefahr bei Einatmen.
H331	Giftig bei Einatmen.

---

H332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H340	Kann genetische Defekte verursachen.
H341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.
H350	Kann Krebs erzeugen.
H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen.
H360	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt; Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H360FD	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H361	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt; Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H361f	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H370	Schädigt die Organe.
H371	Kann die Organe schädigen.
H372	Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.

**H400-Reihe: Umweltgefahren**

H400	Sehr giftig für Wasserorganismen.
H410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
H411	Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

**P-Sätze****P200-Reihe: Prävention**

P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.

---

P210	Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P240	Behälter und zu befüllende Anlage erden.
P243	Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P264	Nach Gebrauch gründlich waschen.
P270	Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P281	Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.

**P300-Reihe: Reaktion**

P309	Bei Exposition oder Unwohlsein: ...
P310	Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P321	Besondere Behandlung.
P330	Mund ausspülen.
P362	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
P363	Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.

**P400-Reihe: Aufbewahrung**

P405	Unter Verschluss aufbewahren.
------	-------------------------------

**P500-Reihe: Entsorgung**

P501	Inhalt/Behälter ... zuführen.
------	-------------------------------

**Kombinationen der P-Sätze**

P301+310	Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P301+312	Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P301+330+331	Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.
P302+350	Bei Kontakt mit der Haut: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
P302+352	Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.

- 
- P303+361+353 Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle verschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
- P304+340 Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P304+341 Bei Einatmen: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P305+351+338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
- P307+311 Bei Exposition: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P308+313 Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P332+313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen /ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P342+311 Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P410 + P403 Vor Sonnenbestrahlung geschützt an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Publikationen in Fachzeitschriften:

***Dual Roles of the Transcription Factor Grainyhead-like 2 (GRHL2) in Breast Cancer***

Stefan Werner#, **Sabrina Frey**#, Sabine Riethdorf, Christian Schulze, Malik Alawi, Lea Kling, Vida Vafaizadeh, Guido Sauter, Luigi Terracciano, Udo Schumacher, Klaus Pantel, und Volker Assmann

J. Biol. Chem. 2013 288: 22993-23008. First Published on June 29, 2013, doi:10.1074/jbc.M113.456293

# geteilte Erstautorenschaft

Kongressbeiträge:

***The transcription factor Grainyhead-like 2 (GRHL2) is a regulator of EMT and cell proliferation in breast cancer***

**Sabrina Frey**, Stefan Werner, Sabine Riethdorf, Klaus Pantel, und Volker Assmann

*9<sup>th</sup> Symposium of Minimal Residual Cancer* (25.–27. September 2013); Paris, Frankreich

Der Beitrag wurde für eine Posterpräsentation und einen Kurzvortrag ausgewählt.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel habe ich kenntlich gemacht und im beigefügten Verzeichnis angegeben.

Ich versichere außerdem, dass dies mein erster Promotionsversuch ist und ich diese Dissertation bisher weder an dieser noch an einer anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren zu eröffnen.

Hamburg, den 16. August 2013

---

Sabrina Frey