

**Zur Regulation der Genexpression von
Trefoil Factor Family (TFF) Peptiden
in humanen Retinoblastomzelllinien und
zur Bedeutung von TFF3 für das Zellverhalten**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Claudia Winter, geb. Philippeit
aus Haan

August 2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Anatomie II (Neuroanatomie) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Nicole Dünker

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Horsthemke

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. rer. nat. Peter Bayer

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2015

Teile dieser Dissertation sind bereits veröffentlicht:

Philippeit C., Busch M. und Dünker N. (2014) Epigenetic control of trefoil factor family (TFF) peptide expression in human retinoblastoma cell lines. Cell Physiol Biochem **34**(3):1001-1014.

Publikationen:

Philippeit C., Busch M. und Dünker N. (2014) Epigenetic control of trefoil factor family (TFF) peptide expression in human retinoblastoma cell lines. Cell Physiol Biochem **34**(3):1001-1014.

Busch M., **Philippeit C.**, Weise A. und Dünker N. (2015) Re-characterization of established human retinoblastoma cell lines. Histochem Cell Biol **143**(3): 325-338.

Müller P., Doliva R., Busch M., **Philippeit C.**, Stephan H. und Dünker N. (2015) Additive effects of retinoic acid (RA) and bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) apoptosis signaling in retinoblastoma cell lines. PLoS One **10**(7): e0131467. doi: 10.1371/journal.pone.0131467 eCollection 2015.

Tagungsbeiträge:

Philippeit C. und Dünker N. (2012) Influence of promoter methylation on trefoil factor family (TFF) expression in retinoblastoma cells. Posterpräsentation im Rahmen des 11. Forschungstages der Medizinischen Fakultät des UK Essen.

Philippeit C. und Dünker N. (2013) Epigenetic regulation of trefoil factor family (TFF) peptide expression in retinoblastoma cell lines. Posterpräsentation im Rahmen des 12. Forschungstages der Medizinischen Fakultät des UK Essen.

Philippeit C. und Dünker N. (2013) It's all about epigenetics: Regulation of Trefoil factor family (TFF) peptide expression in retinoblastoma cell lines. Posterpräsentation auf dem 9. "NeuroVisionen"-Kongress in Köln.

Philippeit C. und Dünker N. (2014) Circumvention of cell death by epigenetic down-regulation of trefoil factor family peptide 3 in retinoblastoma cells. Posterpräsentation im Rahmen des 13. Forschungstages der Medizinischen Fakultät des UK Essen.

Philippeit C. und Dünker N. (2014) Retinoblastoma cells circumvent cell death by epigenetic down-regulation of trefoil factor family peptide 3. Posterpräsentation auf dem 10. "NeuroVisionen"-Kongress in Jülich.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungen | i |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Das Retinoblastom | 1 |
| 1.2 Regulation der Genexpression | 5 |
| 1.2.1 Grundlagen der Epigenetik | 5 |
| 1.2.2 DNA-Methylierung und Histon-Modifikation | 6 |
| 1.2.3 Epigenetik in der Tumorbilogie | 8 |
| 1.3 TFF-Peptide | 9 |
| 1.3.1 Struktur und Expression | 9 |
| 1.3.2 Biologische Bedeutung | 11 |
| 1.3.3 Pathologischer Kontext..... | 13 |
| 1.4 Zielsetzung und Fragestellung | 15 |
| 2 Material | 17 |
| 2.1 Zelllinien | 17 |
| 2.2 Gewebeproben | 17 |
| 2.3 Chemikalien und Reagenzien | 18 |
| 2.4 Kommerzielle Kits | 20 |
| 2.5 Antikörper | 21 |
| 2.5.1 Primärantikörper | 21 |
| 2.5.2 Sekundärantikörper | 21 |
| 2.5.3 Puffer zur Antikörperverdünnung..... | 21 |
| 2.6 Oligonukleotidprimer | 22 |
| 2.7 TaqMan® Gene Expression Assays | 22 |
| 2.8 Restriktionsenzyme | 22 |
| 2.9 Vektoren | 23 |
| 2.9.1 Vektoren zur transienten Expression | 23 |
| 2.9.2 Vektoren zur stabilen Expression | 23 |
| 2.10 Zellkulturmedien | 24 |
| 2.11 Bakterienkulturmedien | 24 |
| 2.12 Basis-Puffer | 24 |
| 2.13 Geräte | 25 |
| 2.14 Software | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 2.15 Verbrauchsmaterialien | 27 |
| 3 Methoden | 29 |
| 3.1 Molekularbiologische Methoden | 29 |
| 3.1.1 Isolation von Nukleinsäuren..... | 29 |
| 3.1.2 Konzentrationsbestimmung | 29 |
| 3.1.3 Agarosegelelektrophorese | 29 |
| 3.1.4 Reverse Transkription..... | 30 |
| 3.1.5 Polymerasekettenreaktion | 31 |
| 3.1.6 Quantitative <i>Realtime</i> RT-PCR | 32 |
| 3.1.7 Restriktion..... | 34 |
| 3.1.8 Bisulfitkonvertierung | 34 |
| 3.1.9 Amplifikation der Promotorregion..... | 35 |
| 3.1.10 TOPO [®] TA Klonierung | 36 |
| 3.1.11 Plasmid-Konstrukte zur TFF3-Überexpression..... | 37 |
| 3.1.12 Ligation | 39 |
| 3.1.13 Bakterientransformation..... | 40 |
| 3.1.14 Starterkulturen | 40 |
| 3.1.15 Isolation von Plasmid-DNA | 41 |
| 3.1.16 Sequenzierung..... | 41 |
| 3.2 Proteinbiochemische Methoden | 41 |
| 3.2.1 Proteinisolation aus Zelllysaten | 41 |
| 3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchonsäure-Assay | 42 |
| 3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese | 42 |
| 3.2.4 Western-Blot und Immundetektion..... | 44 |
| 3.2.5 Proteom-Array | 45 |
| 3.2.6 TFF3-Immunfluoreszenzfärbung an fixierten Zellen | 46 |
| 3.3 Zellkulturtechnik | 46 |
| 3.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen | 46 |
| 3.3.2 Adhärenz und Fixierung auf Deckgläschen | 47 |
| 3.3.3 Subkultivierung | 47 |
| 3.3.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen | 47 |
| 3.3.5 Zellzahlbestimmung..... | 48 |
| 3.3.6 Behandlung mit epigenetischen Reagenzien..... | 48 |
| 3.3.7 Behandlung mit rekombinantem TFF3..... | 50 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.3.8 | Transiente Transfektion | 51 |
| 3.3.9 | Lentivirale Transduktion..... | 51 |
| 3.3.10 | Caspase-Inhibition | 53 |
| 3.4 | Funktionelle <i>in vitro</i> Analysen | 53 |
| 3.4.1 | WST-1-Viabilitätsassay..... | 53 |
| 3.4.2 | 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Zelltodassay | 54 |
| 3.4.3 | 5-Bromo-2'-desoxyuridin-Zellproliferationsassay..... | 55 |
| 3.4.4 | Wachstumskinetik..... | 56 |
| 3.4.5 | Soft-Agarose-Assay..... | 56 |
| 3.5 | Statistik | 58 |
| 4 | Ergebnisse..... | 59 |
| 4.1 | Regulation der <i>TFF</i>-Genexpression in Retinoblastomzelllinien | 59 |
| 4.1.1 | Endogene <i>TFF</i> -Expression..... | 59 |
| 4.1.2 | Promotoranalysen..... | 62 |
| 4.1.3 | Einfluss von Methylierung und Acetylierung auf die <i>TFF</i> -Expression | 68 |
| 4.1.4 | Einfluss epigenetischer Reagenzien auf den Methylierungsstatus | 71 |
| 4.2 | Rolle von <i>TFF3</i> in Y-79 Retinoblastomzellen | 73 |
| 4.2.1 | Einfluss von r <i>TFF3</i> auf die Zellviabilität | 73 |
| 4.2.2 | Einfluss von r <i>TFF3</i> auf Apoptose- und Proliferationsverhalten | 74 |
| 4.2.3 | Phosphokinase-Array | 76 |
| 4.2.4 | Etablierung einer transienten Transfektion | 78 |
| 4.2.5 | Nachweis transienter <i>TFF3</i> -Überexpression..... | 79 |
| 4.2.6 | Einfluss transienter <i>TFF3</i> -Überexpression auf Apoptose- und Proliferationsverhalten | 81 |
| 4.2.7 | Stabile <i>TFF3</i> -Überexpression | 83 |
| 4.2.8 | Einfluss stabiler <i>TFF3</i> -Überexpression auf die Zellviabilität..... | 83 |
| 4.2.9 | Einfluss stabiler <i>TFF3</i> -Überexpression auf Apoptose- und Proliferationsverhalten | 84 |
| 4.2.10 | Koloniebildungseffizienz <i>TFF3</i> -überexprimierender Y-79 RB-Zellen . | 86 |
| 5 | Diskussion | 88 |
| 5.1 | Regulation der <i>TFF</i>-Genexpression in Retinoblastomzelllinien | 88 |
| 5.1.1 | Endogene <i>TFF</i> -Expression..... | 88 |
| 5.1.2 | Korrelation von <i>TFF</i> -Expression und Promotormethylierung | 89 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 5.1.3 | Einfluss epigenetischer Reagenzien auf den Methylierungsstatus und die <i>TFF</i> -Expression | 90 |
| 5.1.4 | Rolle von Transkriptionsfaktor-Bindestellen..... | 94 |
| 5.1.5 | Klinische Relevanz | 96 |
| 5.2 | Rolle von TFF3 in Y-79 Retinoblastomzellen | 98 |
| 5.2.1 | Einfluss von TFF3 auf Zellviabilität, Apoptose und Zellproliferation.... | 99 |
| 5.2.2 | Einfluss von TFF3 auf die Invasivität | 101 |
| 5.2.3 | Potenziell beteiligte Signalwege | 102 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 105 |
| 7 | Abstract..... | 106 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 107 |
| | Danksagung | 122 |
| | Lebenslauf | 123 |
| | Eidesstattliche Erklärung | 124 |

Abkürzungen

| | |
|--------------------|---|
| A | Adenin |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| AMPK | AMP-aktivierte Proteinkinase |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| 5-Aza-dC | 5-Aza-2'-desoxycytidin |
| BCA | <i>Bicinchoninic acid</i> |
| bp | Basenpaare |
| BrdU | 5-Bromo-2'-desoxyuridin |
| BSA | <i>Bovine serum albumin</i> |
| C | Cytosin |
| CAM | Chorioallantoismembran |
| cAMP | Cyclisches Adenosinmonophosphat |
| cm ² | Quadratzenimeter |
| CPBP | <i>Core promoter-binding protein</i> |
| CpG | Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotid |
| CREB | <i>cAMP-responsive element binding protein</i> |
| C _T | <i>Threshold cycle</i> |
| C-terminal | Carboxy-terminal |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| ddH ₂ O | Doppelt-destilliertes Wasser |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>Desoxyribonucleic acid</i> |
| DNMT | DNA-Methyltransferase |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| E2F | <i>E2F-myc activator / cell cycle regulator</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGFR | <i>Epidermal growth factor receptor</i> |
| Elk-1 | <i>E26-transformation-specific-like gene 1</i> |
| ERE | <i>Estrogen response element</i> |
| ERK1/2 | Extrazellulär-regulierte Kinase 1/2 |
| <i>et al.</i> | <i>Et alteri</i> |
| FBS | <i>fetal bovine serum</i> |
| <i>for</i> | <i>Forward</i> |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer |

| | |
|------------------|--|
| g | Gramm |
| <i>g</i> | Gravitation |
| G | Guanin |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GCL | <i>Ganglion cell layer</i> |
| gDNA | Genomische DNA |
| GFP | <i>Green fluorescent protein</i> |
| h | Stunde |
| H2A, H2B, H3, H4 | Histonprotein 2A, 2B, 3 und 4 |
| HAT | Histon-Acetyltransferase |
| HDAC | Histon-Deacetylase |
| HDM | Histon-Demethylase |
| HEK | <i>Human embryonic kidney cells</i> |
| HMT | Histon-Methyltransferase |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| HSP60 | Hitzeschockprotein 60 |
| IF | Immunfluoreszenz |
| IMDM | <i>Iscove´s modified Dulbecco´s medium</i> |
| INL | <i>Inner nuclear layer</i> |
| IPL | <i>Inner plexiform layer</i> |
| JNK | C-Jun N-terminale Kinase |
| K | Lysin |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| LB | <i>Lysogeny broth</i> |
| LOH | <i>Loss of heterozygosity</i> |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| µM | Mikromolar |
| mA | Miliampere |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| MCS | <i>Multiple cloning site</i> |
| MDM2 | <i>Mouse double minute 2 homolog</i> |
| me | Methyliert |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |

| | |
|------------------|---|
| mM | Millimolar |
| mRNA | <i>Messenger RNA</i> |
| miRNA | Mikro RNA |
| Myc/Max | <i>Myelocytomatosis viral oncogene homolog/ myc-associated factor X</i> |
| MYCN | <i>N-myc proto-oncogene protein</i> |
| NF- κ B | <i>Nuclear factor-kappa beta</i> |
| NGS | <i>Normal goat serum</i> |
| nm | Nanometer |
| ns | Nicht signifikant |
| N-terminal | Amino-terminal |
| OD | Optische Dichte |
| ONL | <i>Outer nuclear layer</i> |
| OPL | <i>Outer plexiform layer</i> |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBA | β -Phenyl- γ -aminobuttersäure |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PEI | Polyethylenimin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pH | <i>Potentia Hydrogenii</i> |
| PI3K | <i>Phosphoinositide 3-kinase</i> |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| pRB1 | Phosphoryliertes Retinoblastomprotein |
| RB | Retinoblastom |
| RB1 / <i>RB1</i> | Retinoblastomprotein / Retinoblastomgen |
| <i>rev</i> | <i>Reverse</i> |
| RIPA | Radioimmunpräzipitationsassay |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | <i>Rounds per minute</i> |
| RQ | <i>Relative quantification</i> |
| RT | Reverse Transkriptase |
| rTFF3 | Rekombinantes TFF3 |
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> |
| sec | Sekunde |
| SEM | <i>Standard error of the mean</i> |
| Ser | Serin |
| SKP2 | <i>S-phase kinase-associated protein 2</i> |

| | |
|------------------|--|
| SP1 | <i>Stimulating protein 1</i> |
| T | Thymin |
| TAE | Tris-acetate-EDTA |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBP | TATA-binding protein |
| TBS | Tris-buffered saline |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TF | Transkriptionsfaktor |
| TFF / <i>TFF</i> | <i>Trefoil factor family</i> Protein / Gen |
| Thr | Threonin |
| TOPO | Topoisomerase |
| TSA | Trichostatin A |
| Tyr | Tyrosin |
| u | <i>Unit</i> |
| UBQ | Ubiquitin-C |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| WB | Western-Blot |
| WNK | <i>With no lysine</i> |
| WST-1 | <i>Water soluble tetrazolium-1</i> |

1 Einleitung

1.1 Das Retinoblastom

Das Retinoblastom (RB) ist der häufigste maligne, intraokulare Tumor des frühen Kindesalters. Die Inzidenz liegt bei 1:15.000 bis 1:20.000 Lebendgeburten, unabhängig von Geschlecht oder Herkunft (DiCiommo *et al.* 2000; Jehanne *et al.* 2014). Die Diagnose wird meist in den ersten fünf Lebensjahren gestellt. Dabei fällt die Erkrankung oft durch eine weiß getrübbte Pupille (Leukokorie; Abbildung 1.1) oder durch verstärktes Schielen (Strabismus) auf (DiCiommo *et al.* 2000).

Die Erkrankung kann sowohl ein Auge (unilateral) oder beide Augen (bilateral) betreffen. Unterschieden wird zudem zwischen einer sporadischen und einer vererbten Retinoblastom-Variante. Während die unilaterale Form, die etwa 60-75% aller Retinoblastom-Fälle ausmacht, zu 90% spontan entsteht, ist die Entstehung von bilateralen Tumoren mit einer genetischen Prädisposition verbunden (Jehanne *et al.* 2014; Rodriguez-Galindo *et al.* 2015).



Abbildung 1.1: Kind mit unilateralem Retinoblastom

Die Abbildung zeigt eines der für diese Erkrankung typischsten Charakteristika: die Leukokorie. (<http://www.kinderaugenkrebsstiftung.de/> Stand: März 2015)

Ursächlich für die Entstehung eines Retinoblastoms ist der funktionelle Verlust beider Allele des Retinoblastomgens *RB1* in einer Retinazelle, wofür nach der von Knudson im Jahre 1971 postulierten *two-hit*-Hypothese zumindest zwei Mutationsereignisse stattfinden müssen (Knudson 1971). *RB1* gilt als das erste im Menschen identifizierte Tumorsuppressorgen (Knudson 1971; Friend *et al.* 1986). Ist der Verlust des ersten *RB1*-Allels durch eine Keimbahnmutation des Erbguts eines Elternteils bedingt, sind alle Zellen des betroffenen Individuums heterozygot für die *RB1*-Mutation und es handelt sich um die vererbte Form des Tumors. Erfolgt der Verlust durch eine

somatische Mutation in der betroffenen Retinazelle, wird von einer spontanen oder sporadischen Variante gesprochen (Zhu *et al.* 1992; Benavente und Dyer 2015). Der Verlust des zweiten Allels kann durch somatische Mutation oder Deletion einzelner Chromosomenabschnitte während des *crossing-over* in der Mitose erfolgen (Benavente und Dyer 2015). Neben genetischen Veränderungen kann auch eine Hypermethylierung des entsprechenden Genabschnitts als zweites Ereignis zur funktionellen Inaktivierung des *RB1*-Tumorsuppressorgens führen, die bereits in verschiedenen sporadischen Tumoren beschrieben wurde (Greger *et al.* 1989; Ohtani-Fujita *et al.* 1997).

Der Ursprung des Retinoblastoms liegt in der unreifen Retina. Die Entwicklung der Retina beginnt mit multipotenten retinalen Progenitorzellen, die mehrere Schritte durchlaufen, bis es zur Spezifikation und schließlich zur terminalen Zelldifferenzierung kommt (Dyer und Bremner 2005). Die reife Retina setzt sich aus sieben Hauptzelltypen zusammen, die in einer festgelegten Anordnung die verschiedenen Schichten der Retina bilden (Abbildung 1.2). Die Entwicklung der einzelnen Zellen ist dabei evolutionär und zeitlich determiniert (Martins und Pearson 2008).

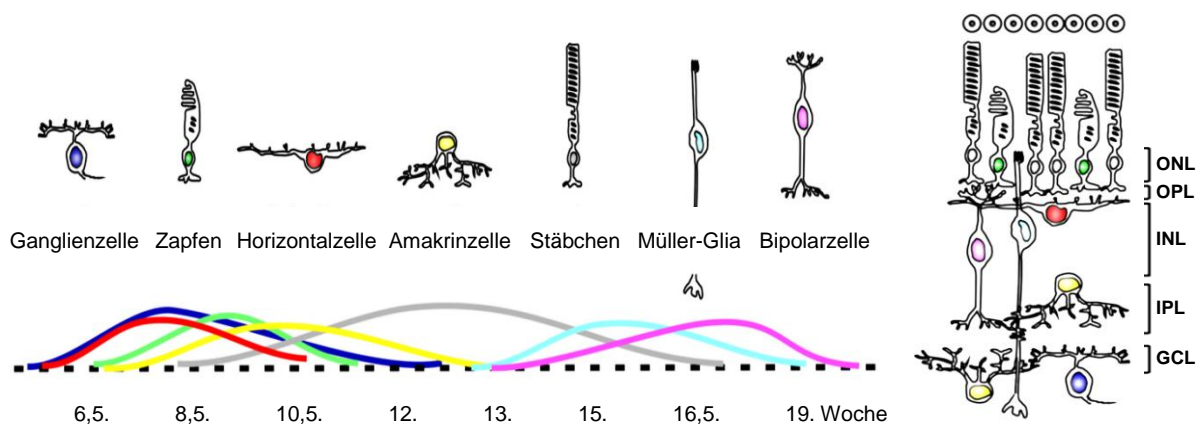


Abbildung 1.2: Zeitliche Entwicklung und Anordnung der Zellen in der humanen Retina

Die reife Retina beinhaltet sieben Zelltypen, die sich in einer festgelegten Reihenfolge aus retinalen Progenitorzellen entwickeln. In der Abbildung ist die zeitliche Entwicklung der humanen Retina in Wochen angegeben. Die reife Retina setzt sich aus drei wesentlichen Schichten zusammen. In der äußeren Körnerschicht (ONL, *outer nuclear layer*) liegen die Zellkörper der Photorezeptoren (Zapfen und Stäbchen). Die Photorezeptoren bilden zusammen mit den Horizontal- und Bipolarzellen Synapsen aus, die in der äußeren plexiformen Schicht (OPL, *outer plexiform layer*) liegen. In der inneren Körnerschicht (INL, *inner nuclear layer*) befinden sich die Zellkörper der Horizontal-, Bipolar-, Amakrin- und Müller-Glia Zellen. Die darauf folgende Schicht beinhaltet die Dendriten der Zellen und wird als innere plexiforme Schicht (IPL, *inner plexiform layer*) bezeichnet. Das Axon der Müller-Glia Zellen reicht in die Ganglienzellschicht (GCL, *ganglion cell layer*) hinein, in der auch die Ganglienzellen lokalisiert sind. Abbildung modifiziert nach (Martins und Pearson 2008).

Um die molekularen Ereignisse, die an der Tumorentstehung beteiligt sind, besser zu verstehen, wird seit langem nach der Ursprungszelle des Retinoblastoms geforscht. Da sich die meisten Retinoblastome aus verschiedenen Zelltypen zusammensetzen, währte die Annahme, dass sie sich aus einer multipotenten retinalen Progenitorzelle oder einer Mischung differenzierter Übergangszellen entwickeln (Chen *et al.* 2004; Dyer und Bremner 2005). Es wurden verschiedene Modelle postuliert, die auf eine Dysregulation der Zelldifferenzierung sowie Proliferation schließen, jedoch keine Begründung für das ausschließliche Auftreten des Tumors im Auge liefern (Dyer und Bremner 2005). Zudem wurden in der Literatur bereits verschiedene Fälle von Retinoblastomen bei Erwachsenen dokumentiert (Biswas *et al.* 2000; Sharifzadeh *et al.* 2014; Yousef *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2015).

Derzeit wird vermutet, dass es sich bei der Ursprungszelle um Vorläuferzellen der Zapfen-Photorezeptoren handelt. Aktuelle Studien an humanen embryonalen Retinazellen mit *RB1-knockdown* zeigten, dass speziell Zapfen-Vorläuferzellen mit ungehinderter Proliferation auf den Verlust des Tumorsuppressorgens reagieren und nach Transplantation in Empfängerermäuse zur Ausbildung von Retinoblastomen führen (Xu *et al.* 2009; Xu *et al.* 2014). Dieses Ergebnis korreliert mit vorherigen Analysen, in denen gezeigt wurde, dass Retinoblastome Zapfen-spezifische Transduzine exprimieren (Bogenmann *et al.* 1988) und die Zapfen selbst hohe Level an RB1 exprimieren (DiCiommo *et al.* 2000). Zapfen-Vorläuferzellen sind zudem die einzigen Zellen der Retina, die sich auch nach der Entwicklung weiter differenzieren können, wodurch die Notwendigkeit ausgeschlossen werden kann, dass es sich um eine Stamm- oder Progenitorzelle handeln muss (Bremner und Sage 2014).

Durch den Verlust des Retinoblastomproteins RB1 entwickelt sich zunächst ein benignes Vorläuferstadium des Retinoblastoms, welches als Retinom bezeichnet wird (Gallie *et al.* 1982). RB1 ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der über Phosphorylierung reguliert wird und direkten Einfluss auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse hat. Dazu zählen sowohl die Regulation von Zellproliferation und Apoptose als auch die Zelldifferenzierung. So bindet und inhibiert das aktivierte Protein pRB1 unter physiologischen Bedingungen Mitglieder der E2F-Transkriptionsfaktorfamilie, die Gene für die DNA-Synthese aktivieren, worüber der Zellzyklus reguliert wird (DiCiommo *et al.* 2000). Zur Manifestation und Progression des malignen Retinoblastoms sind jedoch weitere Mutationen essentiell, die Gene betreffen

können, welche an der Regulation von Differenzierung oder Zelltod beteiligt sind (Dyer und Bremner 2005).

Aktuelle Untersuchungen deuten darauf hin, dass es sich bei den Veränderungen jedoch weniger um genetische Aberrationen, als vielmehr um epigenetische Mechanismen handelt, die in die Entwicklung des Retinoblastoms involviert sind (Zhang *et al.* 2012). So ist das Retinoblastomprotein selbst an der Regulation epigenetischer Prozesse beteiligt, zu denen die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen und DNA-Methyltransferasen zählen, die insgesamt zu einer repressiven Chromatinkonformation führen (siehe auch Kapitel 1.2) (Brehm *et al.* 1998; Robertson *et al.* 2000; Gonzalo und Blasco 2005).

Die Studie von Zhang und Mitarbeitern ist die Erste, die epigenetische Mechanismen als Auslöser von Krebs postulieren, wenn keine weiteren genetischen Aberrationen nachweisbar sind (Zhang *et al.* 2012). In derselben Studie wurden 60 Gene mit einer epigenetisch-veränderten Expression im Retinoblastom identifiziert, von denen zehn in Zusammenhang mit Tumoren stehen. Ein sehr geringer Teil von weniger als 3% aller Retinoblastome weist keinerlei Mutation im *RB1*-Gen auf. In mehr als der Hälfte dieser Tumore ist jedoch eine Amplifikation des *MYCN*-Onkogens nachweisbar (Rushlow *et al.* 2013). Zusammen mit *SKP2* und *MDM2* ist *MYCN* eines der stark exprimierten Proteine in den differenzierenden Zapfen-Vorläuferzellen, die bei Verlust von *RB1* weitere Zellproliferation erlauben und möglicherweise zur Zelltransformation führen (Bremner und Sage 2014; Xu *et al.* 2014).

Trotz verbesserter therapeutischer Möglichkeiten, die entsprechend der Tumormanifestation (Größe, Lage, uni- oder bilaterale Ausprägung) angepasst und mittels Chemo-, Kryo-, Laser- oder Radiotherapien verwirklicht werden (Rodriguez-Galindo *et al.* 2007; Jehanne *et al.* 2014), ist ein Verständnis über die molekularen Mechanismen, die an der Entstehung und Progression des Tumors beteiligt sind, essentiell. Die aktuelle Forschung trägt dazu bei, alternative Mechanismen zu verstehen und neue Möglichkeiten für therapeutische Ansätze zu entwickeln.

1.2 Regulation der Genexpression

1.2.1 Grundlagen der Epigenetik

Die Zellen eines Individuums sind ihrem Ursprung nach genetisch identisch. Dennoch unterscheiden sie sich mitunter erheblich in ihrem morphologischen Aufbau und ihrer Funktion. Durch unterschiedliche Genaktivität und der daraus resultierenden Proteinausstattung ist der Charakter einer jeden Zelle geprägt. Dabei ist die Regulation der Genexpression ein komplexer Mechanismus aus genetischen und epigenetischen Faktoren (Jaenisch und Bird 2003). Entscheidend für die lokale und zeitweilige Genaktivität ist dabei vor allem die Chromatinstruktur (Bird und Wolffe 1999).

Das Chromatin stellt den höchsten Verpackungsgrad der DNA dar. Auf Grund ihrer Länge liegt die DNA nicht als freies Molekül im Zellkern vor, sondern wird in einzelne Einheiten verpackt. Histonproteine bilden ein hochkonserviertes Oktamer aus je zwei Untereinheiten H2A, H2B, H3 und H4, das die DNA mit einer Länge von 146 bp zweimal umwickelt. Diese Einheit stellt den Kernpartikel des Nukleosoms dar. Die Dichte einzelner Nukleosomen bestimmt die Stärke der Chromatinkondensation (Kornberg und Lorch 1999). Funktionell lässt sich das Chromatin in zwei Klassen einteilen, die als Hetero- und Euchromatin bezeichnet werden. Das Heterochromatin ist kompakt und stark kondensiert. Es beinhaltet vorwiegend repetitive Elemente und ist transkriptionell inert. Das Euchromatin beinhaltet nahezu alle Gene und stellt den aktiven Bereich des Genoms dar, wobei die Gene sowohl aktiv als auch inaktiv vorliegen können (Grewal und Moazed 2003).

Das komplexe Zusammenspiel epigenetischer Mechanismen ist durch das Herbeiführen von reversiblen Veränderungen der Chromatinstruktur maßgeblich an der Regulation der Genexpression beteiligt (Abbildung 1.3). Die Epigenetik beschreibt alle mitotisch und meiotisch vererbaren Veränderungen der Genexpression, die keine Veränderung der DNA-Sequenz hervorrufen (Holliday 1987). Eine neuere Definition, die sowohl stabile als auch transiente Modifikationen miteinschließt, beschreibt die Epigenetik als eine strukturelle Anpassung chromosomaler Bereiche, die zu einem veränderten Aktivitätsstatus der Zelle führen und zu dessen Aufrechterhaltung beitragen (Bird 2007). Dazu zählen in erster Linie die DNA-Methylierung und Modifikationen der Histonproteine.

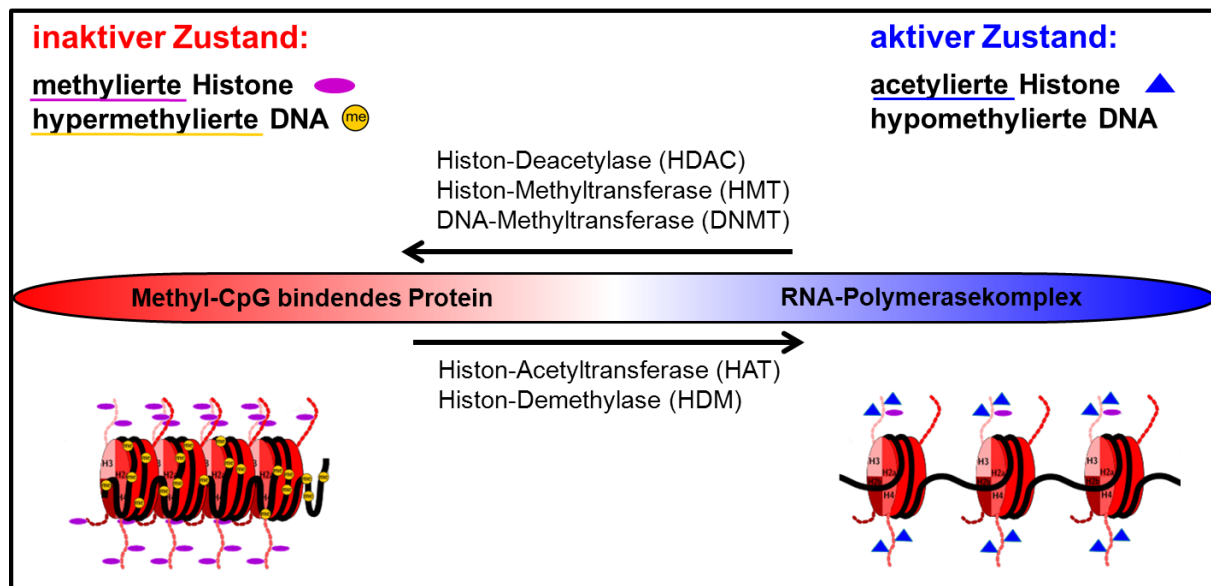


Abbildung 1.3: Einfluss von Methylierung und Acetylierung auf die Chromatinkonformation

Durch enzymatische Modifikation der DNA (schwarz dargestellt) und der Histone (rot dargestellt) kann das Chromatin einen geschlossenen, inaktiven oder geöffneten, aktiven Zustand einnehmen. Charakteristisch für den inaktiven Zustand ist die kompakte Anordnung der Nucleosomen, die durch methylierte, deacetylierte Histone sowie eine hypermethylierte DNA hervorgerufen wird. Durch Aufhebung der Methylierung und erhöhter Histon-Acetylierung nimmt das Chromatin einen lockeren Zustand ein, bei dem die DNA für den RNA-Polymerasekomplex zugänglich ist und Gene aktiv transkribiert werden können. Abbildung modifiziert nach B. Kleine (Urheber) im Original vom 13.02.2009. Die Abbildung wurde mit einer CC BY-SA Lizenz veröffentlicht (<https://creativecommons.org/licenses/> Stand: März 2015).

1.2.2 DNA-Methylierung und Histon-Modifikation

Die Methylierung der DNA ist eine der häufigsten epigenetischen Veränderungen. Sie ist essentiell in der Embryonalentwicklung (Li *et al.* 1992; Ehrlich 2003) und spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Chromosomenstabilität (Robertson 2005), der X-Chromosomalen-Inaktivierung (Bird 2002), beim genomischen Imprinting (Robertson 2005) und der Inaktivierung repetitiver Elemente (Miranda und Jones 2007).

Die DNA-Methylierung erfolgt durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs), die eine Methylgruppe auf das fünfte Kohlenstoffatom von Cytosinresten übertragen, die 5' zu einem Guanin in sogenannten CpG-Dinukleotiden lokalisiert sind (Bird 2002). Die Erhaltungsmethyltransferase DNMT1 vervollständigt hemi-methylierte DNA während der DNA-Replikation, sodass das gewebsspezifische Methylierungsmuster stabil über mehrere Generationen weitergegeben wird (Bird und Wolffe 1999; Bird 2002; Esteller und Herman 2002). Eine Neu- bzw. *de novo*-Methylierung erfolgt in erster

Linie während der Embryonalentwicklung durch die Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B (Okano *et al.* 1998).

Die Verteilung der einzelnen CpG-Dinukleotide im humanen Genom ist nicht homogen (Esteller und Herman 2002). Kurze CpG-reiche Sequenzen mit einer Länge von 0,5 kb-4 kb werden als CpG-Inseln bezeichnet und sind in der proximalen Promotorregion von 50% aller humanen Gene lokalisiert. Unabhängig von der Genexpression liegen diese meist unmethyliert vor und die Regulation erfolgt über die assoziierten Proteine und die daraus resultierende Chromatinkonformation (Gardiner-Garden und Frommer 1987; Jones und Baylin 2002). Die Promotorregion der anderen 50% aller Gene weist nur wenige CpG-Dinukleotide auf und unterscheidet sich kaum vom restlichen Genom (Jones und Baylin 2002).

Im Allgemeinen ist eine erhöhte CpG-Methylierung mit einer Reduktion der Genexpression verbunden (Wachsman 1997). Einer der Mechanismen, die zu einer methylierungsbedingten Repression führen, ist die blockierte Interaktion zwischen der methylierten DNA der Promotorregion und der für die Transkription essentiellen Transkriptionsfaktoren (Watt und Molloy 1988). Transkriptionsfaktoren regulieren die Genexpression durch Erkennung und Bindung an spezifische DNA-Sequenzen der Promotorregion und haben je nach Funktion eine aktivierende oder reprimierende Wirkung auf die Expression des zugehörigen Gens (Jaenisch und Bird 2003). Viele Transkriptionsfaktoren verfügen über GC-reiche Bindestellen oder haben direkt CpG-Dinukleotide in ihrer Erkennungssequenz und können aufgrund der Cytosinmethylierung nicht ordnungsgemäß binden (Bird und Wolffe 1999). Im Falle der CpG-armen Promotoren kann bereits die Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide zum Ausschluss von Transkriptionsfaktoren führen und die Genexpression beeinflussen (Bird 2002).

Post-translationale Veränderungen der N-terminalen Seitenketten der Kernhistone, die durch enzymatische Reaktionen hervorgerufen werden, sind weitere regulatorische Elemente der Genaktivität. Dazu zählen unter anderem die Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung und Ubiquitylierung einzelner Aminosäuren, die in ihrer Gesamtheit als Histon-Code bezeichnet werden (Biel *et al.* 2005). An der Chromatin-Modellierung sind insbesondere die Methylierung und Acetylierung der Histone beteiligt, die als solche erstmals 1964 beschrieben wurden (Allfrey *et al.* 1964).

Durch Histon-Deacetylasen (HDACs), die Teil eines Chromatin-Remodellierungs-Komplexes sind, werden einzelne Acetylgruppen der Histonseitenketten entfernt, wodurch sich die Chromatinstruktur verdichtet (Bird und Wolffe 1999). Liegt die DNA methyliert vor, wird zudem der Übertrag von Methylgruppen durch Histon-Methyltransferasen (HMTs) an Histon H3 auf den Lysinrest an Position 9 (H3K9me) begünstigt, die zusammen mit der Methylierung der DNA inhibitorisch auf die Transkription der beteiligten Gene wirkt (Jaenisch und Bird 2003).

Eine entgegengesetzte Wirkung zeigt die durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) vermittelte Übertragung einzelner Acetylgruppen auf Lysinreste der Histone H2A und H2B. Dabei verringern sich die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem positiv-geladenen Lysin und der negativ-geladenen DNA, wodurch es zu einer Auflockerung des Chromatins kommt und die Bindung der Transkriptionsmaschinerie ermöglicht wird (Lee *et al.* 1993).

1.2.3 Epigenetik in der Tumorbilogie

An der Neubildung humaner Tumore ist oft eine Dysregulation der Genexpression beteiligt, die nicht allein durch genetische Veränderungen hervorgerufen wird, sondern auch auf epigenetischen Abweichungen basiert (Esteller und Herman 2002; Jones und Baylin 2002; Choi und Lee 2013).

In Tumorzellen ist häufig eine genomweite Hypomethylierung zu beobachten (Feinberg und Vogelstein 1983), die zu einer reduzierten Genomstabilität führt (Jaenisch und Bird 2003). Zudem kann die Demethylierung zur Aktivierung von Onkogenen führen, die an der Tumorentwicklung beteiligt sind (Counts und Goodman 1995). Zur genomischen Instabilität trägt auch die Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide bei, da diese als solche selbst mutagen sind. Durch spontane hydrolytische Deaminierung methylierter Cytosine können Thyminen entstehen, wodurch Punktmutationen hervorgerufen werden können (Coulondre *et al.* 1978; Gonzalzo und Jones 1997).

Partiell auftretende Neumethylierungen, die vor allem die CpG-Inseln der Promotorregionen betreffen, können zu einem Verlust von Genen führen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind oder auch Tumorsuppressorgene inaktivieren (Jaenisch und Bird 2003). Voraussetzung für den Ausfall eines Tumorsuppressorgens ist nach der *two-hit*-Hypothese die Inaktivierung beider Allele eines Gens, die durch zwei

zeitlich aufeinander folgende Ereignisse hervorgerufen wird (Knudson 1971). Dabei können sowohl genetische Veränderungen wie Mutationen oder Chromosomendeletionen verantwortlich sein, die als zweites Ereignis zu einem Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*; LOH) führen, als auch epigenetische Mechanismen wie die Hypermethylierung der Promotorregion des entsprechenden Gens (Benavente und Dyer 2015). So spielen die komplexen Zusammenhänge aus genetischen und epigenetischen Faktoren eine entscheidende Rolle bei der Entstehung neuer Tumore.

1.3 TFF-Peptide

1.3.1 Struktur und Expression

TFF-Peptide oder *trefoil factor family peptides* sind kleine Proteine (6,5-12 kDa), die zur Familie der *growth factor-like peptides* gehören (Thim 1989; Kjellev 2009). Im humanen System wurden bisher drei verschiedene TFF-Peptide charakterisiert (Abbildung 1.4), deren aktuelle Nomenklatur 1997 auf der *Conférence Philippe Laudat* festgelegt wurde (Wright *et al.* 1997).

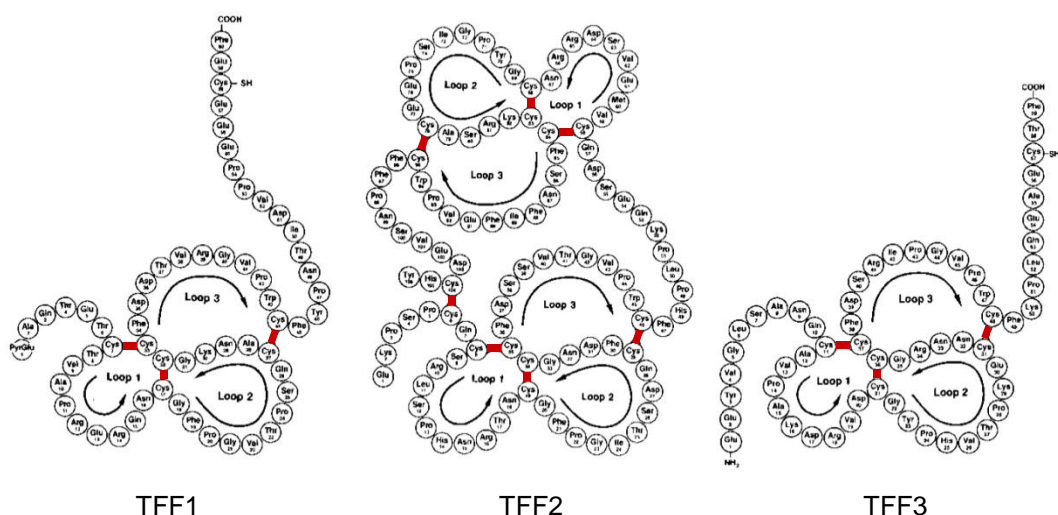


Abbildung 1.4: Struktur der TFF-Peptide

Die charakteristische Struktur der TFF-Peptide wird über die TFF-Domäne bestimmt, die durch insgesamt drei Disulfidbrückenbindungen zwischen zwei Cysteinresten ausgebildet wird (rot dargestellt). TFF1 und TFF3 verfügen über eine, TFF2 über zwei TFF-Domänen, die durch eine weitere Disulfidbrücke verbunden sind. Abbildung modifiziert nach (Thim 1997).

Die TFF-Domäne wird über eine hoch konservierte Aminosäuresequenz definiert, die durch Ausbildung von drei intramolekularen Disulfidbrückenbindungen zwischen zwei Cysteinresten ihre typische, Kleeblattartige-Form annimmt (Thim 1989; Thim und May 2005). TFF1 und TFF3 verfügen über eine einzelne TFF-Domäne, während TFF2 natürlicherweise als Dimer mit zwei homologen TFF-Domänen vorkommt, deren Orientierung durch eine weitere Disulfidbrücke stabilisiert wird (Thim 1997). Durch ein zusätzliches, siebtes Cystein am C-terminalen Ende können auch TFF1 und TFF3 intra- und intermolekulare Disulfidbrücken ausbilden und sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit anderen Proteinen bilden (May *et al.* 2003; Thim und May 2005; Westley *et al.* 2005).

TFF1 und TFF3 bilden unterschiedliche Dimere aus. Während die beiden TFF-Domänen des TFF1-Homodimers sehr flexibel verbunden sind und mehrere Konformationen zulassen, ist die Konformation des TFF3-Homodimers fix und kompakt (Thim und May 2005; Kjellev 2009). Ob natürlicherweise die Monomer- oder Dimer-Form dominiert, ist nicht vollständig geklärt. Verschiedene Ansätze weisen jedoch darauf hin, dass zur vollen Funktionsausübung von TFF1 und TFF3 Dimere benötigt werden, was mit der Interaktion mit dem bislang noch nicht identifizierten TFF-Rezeptor in Zusammenhang stehen könnte (Prest *et al.* 2002; Hoffmann 2005).

TFF-Peptide kommen als natürlicher Bestandteil von mukösen Gelen vor und werden typischerweise von Zellen der Schleimhaut des Gastrointestinal- oder Respirationstrakts, der Uterusschleimhaut, der Konjunktiva sowie in den Speicheldrüsen synthetisiert und sezerniert (Hoffmann *et al.* 2001; Hoffmann 2005). Die Verteilung der einzelnen TFF-Peptide ist jedoch divergent. TFF1 wird von Becherzellen der Konjunktiva sezerniert und kommt in der Schleimhaut des Magens und Abschnitten des Duodenums vor (Hoffmann und Jagla 2002; Paulsen *et al.* 2005; Kjellev 2009). Die Synthese und Sekretion von TFF2 erfolgt im humanen Organismus vorwiegend in der Magenschleimhaut und durch Brunner-Drüsen in Bereichen des Duodenums (Hoffmann und Jagla 2002). Im Gegensatz zu TFF1 und TFF2 ist eine Expression von TFF3 in nahezu allen mukösen Geweben nachweisbar. Die Synthese und Freisetzung erfolgt primär durch Becherzellen des Respirationstrakts, des Dünndarms und der Konjunktiva. Außerdem wurde TFF3 im Speichel und der Uterusschleimhaut nachgewiesen (Podolsky *et al.* 1993; Hoffmann und Jagla 2002; Kjellev 2009). Zusammen mit TFF1 konnte TFF3 auch in der Kornea nachgewiesen werden (Steven *et al.* 2004; Paulsen *et al.* 2008).

Neben der vorwiegenden Expression im Schleimhautepithel kommen TFF-Peptide zudem in verschiedenen Bereichen des zentralen Nervensystems vor. In Nagetieren konnte die Expression von TFF1 bereits im Cerebellum, Hippocampus sowie im Frontal- und Temporalcortex nachgewiesen werden (Hirota *et al.* 1995; Hinz *et al.* 2004). TFF2 wird primär in der murinen Neurohypophyse exprimiert, konnte jedoch auch in geringerer Ausprägung im Cerebellum und Hippocampus detektiert werden, in denen TFF3 im Gegensatz dazu verstärkt vorkommt (Hinz *et al.* 2004). TFF3 ist im humanen System in den meisten adulten und sich entwickelnden Gehirnregionen immunzytochemisch nachweisbar und wird primär in Neuronen und Oligodendrozyten exprimiert (Bernstein *et al.* 2015). Ferner wurde TFF3 als typischer Neurotransmitter identifiziert, der von magnozellulären Neuronen des *Nucleus supraopticus* und *Nucleus paraventricularis* im Hypothalamus synthetisiert wird. Die Freisetzung in den Blutkreislauf erfolgt über die Neurohypophyse, in der TFF3 zusammen mit Oxitocin kolokalisiert (Probst *et al.* 1996; Griepentrog *et al.* 2000; Jagla *et al.* 2000). TFF-Peptide spielen möglicherweise auch eine Rolle in der Gehirnentwicklung von Nagern, da sich die Stärke der Expression von TFF1 im Hippocampus und die von TFF3 im Cerebellum während der Entwicklung deutlich verändert (Hirota *et al.* 1995; Hinz *et al.* 2004).

In vorherigen Analysen unserer Arbeitsgruppe an der sich entwickelnden murinen Retina, als weiterer Bereich des Nervensystems, konnte erstmals die Expression von TFF2 nachgewiesen werden, während TFF1 und TFF3 nicht exprimiert werden (Paunel-Görgülü *et al.* 2011).

1.3.2 Biologische Bedeutung

TFF-Peptide sind vornehmlich an der Bildung und Aufrechterhaltung der mukösen Barriere beteiligt und spielen eine bedeutende Rolle in der Wundheilung (Göke *et al.* 2001; Hoffmann 2005; Schulze *et al.* 2014). Wesentlich in diesem Zusammenhang ist die Komplexbildung mit Muzinen, die bedingt durch die jeweilige TFF-Struktur und Anzahl an potenziellen Bindestellen anders ausfällt und unterschiedlichen Einfluss auf die Eigenschaften des Mukus hat (Kjelle 2009). Während TFF2 große Komplexe formt und dadurch eher zähflüssigen Mukus bildet, sind die kleinen Komplexe, die durch TFF1 und TFF3 geformt werden, an der Ausbildung von Mukus mit geringer Viskosität verantwortlich (Thim *et al.* 2002). Dies ist auch eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Expression der einzelnen TFF-Peptide. In den Schleimhäuten

der Atemwege, des Auges und der Uterusschleimhaut schützt Mukus mit geringer Viskosität vor Bakterien und anderen Mikropartikeln. Die stabilen Gelkomplexe mit hoher Viskosität, die durch Interaktion mit TFF2 entstehen, schützen hingegen den Magen vor chemischen und mechanischen Reizen (Thim *et al.* 2002; Storesund *et al.* 2008).

TFF-Peptide sind primär an der Regeneration verletzter Gewebe beteiligt und werden als Akut-Phase-Proteine vermehrt nach lokalen Verletzungen der Schleimhaut oder im Zuge inflammatorischer Umstände während der Immunantwort synthetisiert (Hoffmann *et al.* 2001; Baus-Loncar und Giraud 2005). Die Restitution des Gewebes ist ein früher Reparaturprozess, der durch die Reduktion von Zell-Zell-Kontakten und Migration benachbarter Zellen in den verletzten Bereich vorangetrieben wird. Durch Ausbildung von *tight junctions* und dem Wiederaufbau der Barriere wird die morphologische und funktionelle Restitution abgeschlossen (Hoffmann 2005).

Alle drei TFF-Peptide können benachbarte Zellen aktivieren und die frühe Migration zum Ort der Verletzung induzieren (Emami *et al.* 2001; Baus-Loncar und Giraud 2005; Hoffmann 2005). Als Signalpeptide sind sie zudem an der Regulation von Zelltod und Proliferation beteiligt (Kjelle 2009). Ihre Funktion üben die TFF-Peptide primär durch indirekte Aktivierung des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) aus. Dieser aktiviert daraufhin weitere Signalkaskaden wie den Phosphoinositid-3-Kinase – Proteinkinase B / Akt (PI3K-PKB/Akt) Signalweg und verschiedene Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), zu denen die Extrazellulär-regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2), die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und die Proteinkinase p38 gehören (Baus-Loncar und Giraud 2005; Storesund *et al.* 2009).

Zur Förderung der Wundheilung haben TFF-Peptide primär eine pro-proliferative und anti-apoptotische Wirkung auf benachbarte Zellen. Die Regulation von Proliferation, Wachstum und auch Migration wird durch Beteiligung der indirekt phosphorylierten Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2, JNK und p38 ermöglicht (Storesund *et al.* 2009). Sowohl TFF2 als auch TFF3 üben ihre proliferativen Effekte vorwiegend durch die aktivierte Proteinkinase ERK1/2 aus (Peng *et al.* 2003; Orime *et al.* 2013). In humanen Kolonkarzinomzelllinien konnte jedoch nach TFF3-Überexpression eine Reduktion der Proliferation nachgewiesen werden (Uchino *et al.* 2000) und auch für

TFF1 wurden anti-proliferative Effekte auf Zellen des Gastrointestinaltrakts beschrieben (Bossenmeyer-Pourie *et al.* 2002).

Der protektive Schutz der TFF-Peptide vor Zelltod erfolgt hauptsächlich über den PI3K-PKB/Akt Signalweg (Hoffmann 2005; Storesund *et al.* 2009). Zudem verhindert TFF1 die Apoptose von Zellen des Gastrointestinaltrakts und der Konjunktiva durch Reduktion der Caspase 3-, 8- und 9-Aktivität (Bossenmeyer-Pourie *et al.* 2002; Buron *et al.* 2008). Eine anti-apoptotische Wirkung von TFF3 wurde beispielsweise in Kolonepithelzellen nachgewiesen (Taupin *et al.* 2000). In verschiedenen Zellen wurde neben einem protektiven, anti-apoptotischen Effekt bereits auch eine pro-apoptotische Wirkung von TFF3 beschrieben (Efstathiou *et al.* 1998; Rösler *et al.* 2010) und vorherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten einen pro-apoptotischen Effekt von TFF2 in der sich entwickelnden murinen Retina detektieren (Paunel-Görgülü *et al.* 2011).

1.3.3 Pathologischer Kontext

TFF-Peptide haben eine protektive und regenerative Funktion bei der Wundheilung, die durch eine ausbalancierte Regulation von Zelltod, Proliferation und gezielter Zellmigration realisiert wird (Emami *et al.* 2001). Diese Mechanismen sind jedoch auch in der Tumorbiologie von essentieller Bedeutung. So kann TFF3 Veränderungen in der Expression verschiedener Gene induzieren, die funktionellen Einfluss auf Zelltod, Proliferation, Wachstum sowie Migration haben (Storesund *et al.* 2009) und TFF1 kann Signalwege aktivieren, die sich auf die Zellinvasion und Angiogenese auswirken (Emami *et al.* 2001). Migration, Invasion und Angiogenese sind entscheidende Faktoren, die eine Ausbildung von Metastasen begünstigen (Perry *et al.* 2008).

In verschiedenen Tumormanifestationen wurde eine im Vergleich zum gesunden Gewebe veränderte TFF-Expression beschrieben. Dazu gehören Magentumore (Leung *et al.* 2002), Kolonkarzinome (Uchino *et al.* 2000), Leberkarzinome (Khoury *et al.* 2005; Okada *et al.* 2005), Prostatakarzinome (Bonkhoff *et al.* 1995; Faith *et al.* 2004), Bauchspeicheldrüsenkrebs (Terris *et al.* 2002), Brustkrebs (May und Westley 1997; Poulson *et al.* 1997) sowie Lungenkrebs (Qu *et al.* 2012). Verändert sich das TFF-Expressionsmuster kann sich das physiologische Gleichgewicht verschieben.

Die drei humanen *TFF*-Gene sind nacheinander innerhalb einer Sequenz von 54,5 kb auf dem langen Arm von Chromosom 21 (21q22.3) lokalisiert (Tomasetto *et al.* 1992; Chinery *et al.* 1996). Durch verschiedene Mechanismen wird die Expression der *TFF*-Gene reguliert, die unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, Regulationsproteine sowie epigenetische Faktoren miteinbeziehen (Emami *et al.* 2004). In der Promotorregion aller drei Gene befinden sich mehrere CpG-Dinukleotide (Vestergaard *et al.* 2010), die jedoch keinen klassisch definierten CpG-Inseln entsprechen, da die Anzahl und Dichte entsprechend gering ist (Gardiner-Garden und Frommer 1987). Damit zählen die Promotoren der *TFF*-Gene zu der CpG-armen Variante, bei der bereits geringfügige Abweichungen in der Methylierung Auswirkungen auf die Expression haben kann (Bird 2002).

In vielen Tumoren ist das ursprüngliche Methylierungsmuster verändert. Es ist bereits bekannt, dass auch an der Regulation der *TFF*-Genexpression epigenetische Mechanismen beteiligt sind (Feng *et al.* 2014). Aktuelle Studien zeigen, dass die verminderte *TFF1*-Expression in humanen Magenkarzinomzellen mit einer erhöhten Methylierung der entsprechenden Promotorregion korreliert (Tanaka *et al.* 2013; Feng *et al.* 2014). Ferner ist *TFF1* eines der identifizierten Gene, welches in primären Retinoblastomen durch epigenetische Modifikation hochreguliert ist und eine veränderte Methylierung sowie Histon-Modifikation aufweist (Zhang *et al.* 2012; Theriault *et al.* 2014). Der Einfluss der DNA-Methylierung auf die Expression der drei *TFF*-Gene in unterschiedlichen Retinoblastomzelllinien ist bislang unerforscht. In Analysen unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass *TFF1* in der gesunden humanen Retina nur geringfügig exprimiert wird, aber in verschiedenen Retinoblastomzelllinien hochreguliert ist (Weise und Dünker 2013).

Die Bedeutung der *TFF*-Peptide in Zusammenhang mit verschiedenen Krebserkrankungen ist mitunter sehr variabel und sowohl mit positiven als auch negativen Aspekten assoziiert. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass *TFF3*, welches auch unter normalen Bedingungen im Brustepithel exprimiert wird, bei einer Verschiebung der Expression sowohl mit einer benignen Form als auch mit einem höchst invasiven Phänotyp von Brustkrebs in Zusammenhang steht (Ahmed *et al.* 2012). Auch in Bezug auf Kolonkarzinome ist die Funktion von *TFF3* kontrovers und fördert auf der einen Seite die Ausbildung eines aggressiven Phänotyps (Yio *et al.* 2005), inhibiert bei Überexpression jedoch das Wachstum der Tumorzellen (Uchino *et al.* 2000). Die Eigenschaften der *TFF*-Peptide als solche sind dabei nicht

verändert. Ausschlaggebend sind die Umgebung und die Zellen, die stimuliert werden, wodurch die TFF-Peptide sowohl positive als auch negative Auswirkungen haben können (May 2012). Die Regulation der *TFF*-Expressionslevel in Retinoblastomzellen und die Effekte von TFF-Peptiden auf die Zellviabilität sowie das Proliferations- und Apoptoseverhalten dieser Tumorzellen sind bislang noch nicht eingehend untersucht worden.

1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die Regulation der *TFF*-Genexpression sowie die funktionelle Bedeutung von TFF3 im Retinoblastom untersucht werden. Für die Analysen wurden verschiedene humane Retinoblastomzelllinien aus uni- und bilateralen Tumoren herangezogen und sofern möglich mit gesunder humaner Retina verglichen. Zur Aufklärung möglicher Regulationsmechanismen der *TFF*-Expression im Retinoblastom wurden folgende Fragen adressiert:

- Wie ist das Expressionsmuster der drei *TFF*-Gene im pathologischen Kontext verschiedener Retinoblastomzelllinien und unterscheidet sich dieses von dem gesunder Gewebeproben?
- Besteht eine Korrelation zwischen der endogenen *TFF*-Expression in Retinoblastomzelllinien und dem Methylierungsgrad der entsprechenden *TFF*-Promotorregion?
- Inwiefern wird die *TFF*-Expression durch die Methylierung der Promotorregion beeinflusst und wie wirkt sich die Gabe epigenetischer Reagenzien auf die *TFF*-Expression aus?

Eine veränderte Genexpression, wie sie unter anderem in Tumorzellen vorkommt, kann das Zellverhalten maßgeblich beeinflussen. Ist die Balance zwischen Zelltod und Wachstum betroffen, kann dies gravierende Folgen für die Zellen haben. In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte daher die Funktion von TFF3 in der Kontrolle von Apoptose und Zellproliferation im Retinoblastom untersucht werden, wofür die etablierte Retinoblastomzelllinie Y-79 verwendet wurde. Es wurde folgenden Fragestellungen nachgegangen:

-
- Welchen Einfluss hat exogen appliziertes rekombinantes TFF3 auf das Apoptose- und Proliferationsverhalten von Y-79 Retinoblastomzellen?
 - Lassen sich die durch rekombinantes TFF3 erzielten Effekte durch transiente TFF3-Überexpression in Y-79 Retinoblastomzellen verifizieren?
 - Verändert sich das Verhalten von Y-79 Retinoblastomzellen durch stabile, lentivirale TFF3-Überexpression und sind langfristige Effekte beobachtbar?

2 Material

2.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurde mit den acht humanen Retinoblastomzelllinien RBL-13, RBL-15, RBL-30, RB 247 C3, RB 355, RB 383, WERI-Rb1 und Y-79 (Reid *et al.* 1974; McFall *et al.* 1977; Griegel *et al.* 1990; Madreperla *et al.* 1991) gearbeitet, die freundlicherweise von Dr. H. Stephan, aus der Klinik für Kinderheilkunde III des Universitätsklinikums Essen, zur Verfügung gestellt wurden. Außerdem wurde die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293T (DuBridge *et al.* 1987) verwendet.

| Zelllinie | Ursprung | Etablierung |
|-----------|----------------------------|-------------------------------|
| HEK293T | embryonale Nierenzellen | DuBridge <i>et al.</i> 1987 |
| RBL-13 | unilaterales Retinoblastom | Griegel <i>et al.</i> 1990 |
| RBL-15 | bilaterales Retinoblastom | Griegel <i>et al.</i> 1990 |
| RBL-30 | unilaterales Retinoblastom | Griegel <i>et al.</i> 1990 |
| RB 247 C3 | bilaterales Retinoblastom | Griegel <i>et al.</i> 1990 |
| RB 355 | unilaterales Retinoblastom | Madreperla <i>et al.</i> 1991 |
| RB 383 | unilaterales Retinoblastom | Griegel <i>et al.</i> 1990 |
| WERI-Rb1 | unilaterales Retinoblastom | McFall <i>et al.</i> 1977 |
| Y-79 | unilaterales Retinoblastom | Reid <i>et al.</i> 1974 |

2.2 Gewebeproben

Tiefgefrorene, humane Gewebeproben wurden zur Nukleinsäureisolation mit sterilen Mörsern und Trockeneiskühlung zu feinem Pulver zermahlen. Es wurde darauf geachtet, dass die Proben bei der Präparation nicht auftauten.

| Gewebeprobe | Beschreibung / Verwendung | Bezug |
|------------------------------|--|--|
| Duodenum | Eine Probe nach Gastroskopie → TFF Expressionsanalysen (RNA) | R. Doliva, Essen |
| Duodenum | Pool aus vier Proben nach Gastroskopie → TFF Promotoranalysen (gDNA) | Dr. E. Cario, Essen |
| Magen | Eine Probe nach Gastroskopie → TFF Expressionsanalysen (RNA) | Dr. E. Cario, Essen |
| Retinaperipherie ohne Makula | Pool aus vier Proben <i>post mortem</i> → TFF Promotoranalysen (gDNA) | Dr. S. Thanos, Münster |
| RNA total Retinapool | Pool aus sechs Proben → TFF Expressionsanalysen | Clontech, USA (636579, Lot 1005010) |

2.3 Chemikalien und Reagenzien

| Chemikalie / Reagenz | Hersteller |
|---|--|
| Acrylamid/Bis-Lösung, 30% | Bio-Rad Laboratories, München |
| Agarose | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Merck Millipore, Darmstadt |
| Ampicillin Natriumsalz | Gibco, Life Technologies, Darmstadt |
| <i>Aqua ad injectabilia</i> | B. Braun, Melsungen |
| 5-Aza-2'-desoxycytidin (5-Aza-dC), ≥97% | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Borsäure, ≥99,8% | Carl Roth, Karlsruhe |
| Bovines Serum Albumin (BSA), ≥98% | Carl Roth, Karlsruhe |
| 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU), ≥99,9% | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Caspase Inhibitor III (Boc-D-Fmk) | Calbiochem EMD Biosciences, USA |
| 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybri-Max™ | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 2 Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | Merck Millipore, Darmstadt |
| Dinatriumtetraborat (Na ₂ B ₄ O ₇) | Merck Millipore, Darmstadt |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT) | Carl Roth, Karlsruhe |
| dNTP Set 100 mM (4 x 25 mM) | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), with 4,5 g/l Glucose, stable Glutamine, Sodium Pyruvate and 3,7 g/l NaHCO ₃ | PAN-Biotech, Aidenbach |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Nutrient Mixture F-12 Ham | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Salt Solution (DPBS) without Ca and Mg | PAN-Biotech, Aidenbach |
| Essigsäure, 100% | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethanol, ≥99,8% | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Fetales bovines Serumalbumin (FBS) | PAN-Biotech, Aidenbach |
| FuGENE® HD Transfektionsreagenz | Promega, USA |
| GelRed™ Nukleinsäure Farbstoff | Biotium, USA |
| GeneRuler 1 kb DNA-Ladder | Fermentas, Thermo Scientific, USA |
| Glycerin | Carl Roth, Karlsruhe |
| Glycin | Carl Roth, Karlsruhe |
| GoTaq® G2 Hot Start Polymerase | Promega, USA |
| Hexadimethrinbromid (Polybrene), ≥94% | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Immersionsöl für die Mikroskopie Typ A | Nikon, Düsseldorf |
| Immunfluoreszenz-Eindeckmedium | Dako, Dänemark |

| | |
|---|--|
| Insulin, human | PromoCell, Heidelberg |
| Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium (IMDM) | Gibco, Life Technologies, Darmstadt |
| jetPRIME® Transfektionsreagenz | PolyplusTransfection, Frankreich |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Merck, Darmstadt |
| Kanamycin | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| LB-Agar Pulver (Lennox L Agar) | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt |
| LB-Broth Base (Lennox L Broth Base) | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt |
| L-Glutamin | Gibco, Life Technologies, Darmstadt |
| Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt |
| Magermilchpulver | Carl Roth, Karlsruhe |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Merck Millipore, Darmstadt |
| 2-Mercaptoethanol, 99% | Carl Roth, Karlsruhe |
| Methanol, ≥99,9% | Carl Roth, Karlsruhe |
| 1-Methoxy-5-methylphenaziniummethylsulfat | AppliChem, Darmstadt |
| Natriumazid (NaN ₃) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumdeoxycholat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Natriumdodecylsulfat (SDS), ≥99,5% | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumfluorid (NaF) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) | Merck Millipore, Darmstadt |
| Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄) | AppliChem, Darmstadt |
| Nonidet P-40 | Calbiochem EMD Biosciences, USA |
| Normales Ziegenserum (NGS) | Dako, Dänemark |
| Nuklease-freies Wasser | Ambion, Life Technologies, Darmstadt |
| Orange-G | Carl Roth, Karlsruhe |
| PageRuler Prestained Protein Ladder | Fermentas, Thermo Scientific, USA |
| Paraformaldehyd (PFA) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Penicillin-Streptomycin | Gibco, Life Technologies, Darmstadt |
| PfuUltra™ High Fidelity DNA-Polymerase | Agilent Technologies, USA |
| β-Phenyl-γ-aminobuttersäure (PBA), 99% | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Poly-D-Lysin | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Polyethylenimin (PEI), verzweigt | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Ponceau S | Merck Millipore, Darmstadt |
| 2-Propanol, ≥99,8% | Carl Roth, Karlsruhe |
| Propidiumjodid, ≥94,0% | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Protease Inhibitor Cocktail Tabletten | Roche Applied Science, Mannheim |

| | |
|--|--|
| Proteinase K | Qiagen, Hilden |
| RNase A | Qiagen, Hilden |
| RNase AWAY® | Carl Roth, Karlsruhe |
| T4 DNA-Ligase | Fermentas, Thermo Scientific, USA |
| Taq DNA-Polymerase | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt |
| TaqMan® Gene Expression Master Mix | Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt |
| TE-Puffer | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt |
| Terralin® liquid | Schülke & Mayr, Norderstedt |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Bio-Rad Laboratories, München |
| TFF3, human rekombinant | BioVision, USA |
| TFF3, human rekombinant (bioaktiv) | PeperoTech, USA |
| TrackIt™ 100 bp DNA-Ladder | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt |
| Tris Hydrochlorid (Tris-HCl) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tris, ≥99,3% | Carl Roth, Karlsruhe |
| Triton™ X-100 | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Trypanblau Farbstoff, 0,4% | Gibco, Life Technologies, Darmstadt |
| Trypsin/EDTA Lösung, 0,25% | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Tween® 20 | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Western Lightning® Plus-ECL Substrat Kit | Perkin Elmer, USA |
| WST-1 | GenScript, USA |

2.4 Kommerzielle Kits

| Name des Kits | Hersteller |
|---|--|
| BCA™ Protein Assay Reagent Kit | Pierce, Thermo Scientific, USA |
| DNeasy Blood & Tissue Kit | Qiagen, Hilden |
| EZ DNA Methylation-Gold™ Kit | Zymo Research, Freiburg |
| GeneJET Plasmid Miniprep Kit | Fermentas, Thermo Scientific, USA |
| Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit | GE Healthcare Life Sciences, Freiburg |
| NucleoSpin® RNA II Kit | Macherey-Nagel, Düren |
| EndoFree Plasmid Maxi Kit | Qiagen, Hilden |
| Proteome Profiler Human Phospho-Kinase-Array Kit | R&D Systems, USA |
| QuantiTect Reverse Transcription Kit | Qiagen, Hilden |
| TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt |

2.5 Antikörper

2.5.1 Primärantikörper

| Antikörper | Beschreibung und Verdünnung | Hersteller |
|---------------------------|---|---------------------|
| anti-β-Aktin | Kaninchen, polyklonal (WB 1:1.000) | Cell Signaling, USA |
| anti-TFF3 Klon EPR3974 | Kaninchen, monoklonal (WB: 1:2.000; IF: 1:400) | OriGene, USA |
| anti-BrdU | Ratte, monoklonal (IF:1:1.000) | Abcam, UK |

2.5.2 Sekundärantikörper

| Antikörper | Beschreibung und Verdünnung | Hersteller |
|----------------------|---|--|
| Ziege-anti-Kaninchen | HRP-konjugiert (WB: 1:10.000) | Dako, Dänemark |
| Ziege-anti-Ratte | Alexa Fluor [®] 488-konjugiert (IF 1:1.000) | Molecular Probes, Life Technologies, Darmstadt |
| Ziege-anti-Ratte | Alexa Fluor [®] 594-konjugiert (IF 1:1.000) | Molecular Probes, Life Technologies, Darmstadt |
| Ziege-anti-Kaninchen | Alexa Fluor [®] 488-konjugiert (IF 1:1.000) | Molecular Probes, Life Technologies, Darmstadt |

2.5.3 Puffer zur Antikörperverdünnung

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--|---|
| Primärantikörperverdünnungspuffer (WB) | TBS-T 0,025% BSA 0,02% NaN ₃ |
| Sekundärantikörperverdünnungspuffer (WB) | TBS-T 2% Magermilchpulver |
| Primärantikörperverdünnungspuffer (IF) | PBS 4% BSA 1% NGS 0,1% Triton [™] X-100 |
| Sekundärantikörperverdünnungspuffer (IF) | PBS 1% BSA |

2.6 Oligonukleotidprimer

Die Oligonukleotidsynthese erfolgte durch Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt.

| Oligonukleotid | Sequenz (5' → 3') | Verwendung |
|--|---|---|
| TFF1 _{for} TFF1 _{rev} | GGTCGCCTTTGGAGCAGAG GCAGCCCTTATTTGCACAC | RT-PCR zur TFF1- Expression (194bp) |
| TFF2 _{for} TFF2 _{rev} | CACCGAATTCTGCAGCTGAGCTAGACATGG AACCCCTCGAGAACACCCGGTGAGCCAGATG | RT-PCR zur TFF2- Expression (448bp) |
| TFF3 _{for} TFF3 _{rev} | GTGGTCATGGCTGCCAGAG AGCTGGAGGTGCCTCAGAAG | RT-PCR zur TFF3- Expression(242bp) |
| GAPDH _{for} GAPDH _{rev} | CATCACCATCTTCCAGGAGC ATGACCTTGCCCACAGCCTT | RT-PCR zur GAPDH- Expression (444bp) |
| TFF1 _{for} bisulfit TFF1 _{rev} bisulfit | GGAATGGGTTTTATGAGTTTTTTTT CATTACCTCCTCTCTACTCCAAAA | CT-konvertierte TFF1- Promotorregion (486bp) |
| TFF2 _{for} bisulfit TFF2 _{rev} bisulfit | GGTGTGATTTTGTGTGTGTTTAGTT AAAACCCTCTCCTTCACTTACAAAA | CT-konvertierte TFF2- Promotorregion (426bp) |
| TFF3 _{for} bisulfit TFF3 _{rev} bisulfit | AGGAAAGATAAGGAATTTTTGTGTTTT ACATACCTTTATCAAACCTCCAAAC | CT-konvertierte TFF3- Promotorregion (385bp) |
| TFF3 _{for} Umklonierung TFF3 _{rev} Umklonierung | ATATGAATTCGAGGCCTCCTGGACCATGAAG TCAGCTCGAGAGCTGGAGGTGCCTCAGAAG | TFF3-cDNA-Sequenz zur Umklonierung |
| M13 _{rev} | CAGGAAACAGCTATGAC | Sequenzierungen |

2.7 TaqMan[®] Gene Expression Assays

| Assay | Artikelnummer | Hersteller |
|-------|---------------|--|
| GAPDH | Hs99999905_m1 | Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt |
| TFF1 | Hs00907239_m1 | |
| TFF2 | Hs00193719_m1 | |
| TFF3 | Hs00902278_m1 | |

2.8 Restriktionsenzyme

| Restriktionsenzym | Schnittstelle | Hersteller |
|-----------------------------|--|---|
| Fast Digest <i>Bgl</i> II | 5' A ↓ G A T C T 3' 3' T C T A G ↑ A 5' | Fermentas, Thermo Scientific, USA |
| Fast Digest <i>Hind</i> III | 5' A ↓ A G C T T 3' 3' T T C G A ↑ A 5' | |
| Fast Digest <i>Eco</i> RI | 5' G ↓ A A T T C 3' 3' C T T A A ↑ G 5' | |
| Fast Digest <i>Xho</i> I | 5' C ↓ T C G A G 3' 3' G A G C T ↑ C 5' | |

2.9 Vektoren

2.9.1 Vektoren zur transienten Expression

| Vektor | Beschreibung und Verwendung | Bezug |
|----------------|---|------------------------|
| pCS2+_GFP | Expressionsvektor mit CMV-Promotor und GFP-Insert zur Kontrolle bei transienter Expression. | Dr. A. Weise, Essen |
| pCS2+_UBQ | Expressionsvektor mit Ubiquitin-C-Promotor ohne Insert als Negativkontrolle bei transienter Expression. | Dr. A. Weise, Essen |
| pCS2+_UBQ_TFF3 | Expressionsvektor mit Ubiquitin-C-Promotor und TFF3-Insert zur transienten TFF3-Überexpression. | Siehe Kapitel 3.1.11.1 |

2.9.2 Vektoren zur stabilen Expression

| Vektor | Beschreibung und Verwendung | Bezug |
|----------------------|---|-------------------------------------|
| pczVSV-G | Lentivirales Verpackungsplasmid zur Erzeugung viraler Partikel. | Dr. H. Hanenberg, Düsseldorf |
| pCD/NL-BH | Lentivirales Verpackungsplasmid zur Erzeugung viraler Partikel. | Dr. H. Hanenberg, Düsseldorf |
| pCL7EGwo | Expressionsvektor mit CMV-Promotor und GFP-Insert zur stabilen GFP-Expression. | Dr. H. Hanenberg, Düsseldorf |
| pPRIME-CMV-Neo-FF3 | Expressionsvektor mit CMV-Promotor und Luciferase-microRNA-Insert als Negativkontrolle bei stabiler Expression. | Dr. S. Elledge, USA (Addgene 11665) |
| pENTR4 | <i>Gateway</i> [®] <i>entry</i> Vektor zur Ligation mit TFF3 zur Umklonierung in pLenti CMV_Puro Dest. | Dr. E. Campeau, USA (Addgene 17424) |
| pLenti CMV_Puro Dest | Lentiviraler <i>Gateway</i> [®] <i>destination</i> Vektor zur Umklonierung von TFF3 aus pENTR4. | Dr. E. Campeau, USA (Addgene 17452) |
| pLenti CMV_TFF3 | Expressionsvektor mit CMV-Promotor und TFF3-Insert zur stabilen TFF3-Überexpression. | Siehe Kapitel 3.1.11.2 |

2.10 Zellkulturmedien

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--------------------|---|
| HEK293T-Vollmedium | DMEM supplementiert mit 10% FBS 4 mM L-Glutamin 100 u/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin |
| RB-Vollmedium | DMEM supplementiert mit 10% FBS 4 mM L-Glutamin 100 u/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10 µg/ml Insulin 50 µM 2-Mercaptoethanol |
| RB-Minimalmedium | DMEM supplementiert mit 4 mM L-Glutamin 100 u/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 50 µM 2-Mercaptoethanol |

2.11 Bakterienkulturmedien

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--------------------------|--|
| LB-Medium flüssig pH 7,5 | 20 g LB Broth Base ad 1.000 ml ddH ₂ O |
| LB-Medium fest pH 7,5 | 32 g LB Agar ad 1.000 ml ddH ₂ O |

2.12 Basis-Puffer

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--------------|--|
| PBS pH 7,2 | 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ |
| TBS pH 7,6 | 150 mM NaCl 20 mM Tris-HCl |
| TBS-T pH 7,6 | TBS 0,1% Tween [®] 20 |

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Puffer in doppelt destilliertem Wasser angesetzt. Weitere in dieser Arbeit genutzte Puffer sind in den entsprechenden Abschnitten in Kapitel 3 angegeben.

2.13 Geräte

| Gerät | Hersteller |
|--|--|
| Analysenwaage Mettler PM 2000 | Mettler-Toledo, Giessen |
| Analysenwaage Precisa 40SM 200A | Göntgen Wägetechnik, Bottrop |
| CO ₂ -Inkubator HERA cell 150 | Heraeus, Thermo Scientific, USA |
| CO ₂ -Inkubator Micro Galaxy | Nunc, Thermo Scientific, USA |
| Dampfsterilisator Varioklav | HP Medizintechnik, Oberschleißheim |
| Digitale Kameraanlage | Nikon, Düsseldorf |
| Eismaschine AF 80 | Scotsman, Italien |
| Elektrophoresekammer MS Choice | Kisker, Steinfurt |
| Fluoreszenzlampe | Nikon, Düsseldorf |
| Fluoreszenzmikroskop Eclipse E600 | Nikon, Düsseldorf |
| Fluoreszenzmikroskop Leica CTR 6500 | Leica, Wetzlar |
| Handzähler | Tamaco, Taiwan |
| Heizblock Accubloc™ Mini 110338 | Labnet, USA |
| Heizblock Thermomixer 5436 | Eppendorf, Hamburg |
| Inversmikroskop Labovert FS | Leitz, Wetzlar |
| Inversmikroskop Motic AE 20 Serie | Motic, Wetzlar |
| Kippschüttler 3013 | GFL, Burgwedel |
| Kühl-Gefrierkombination (4 °C und -20 °C) | Liebherr, Ochsenhausen |
| LAS-3000 Mini Image Reader | Fujifilm, Düsseldorf |
| Magnetrührer mit Heizplatte RCT basic | IKA Labortechnik, Staufen |
| Membranvakuumpumpe Typ N022AN.18 | KNF Neuberger, Freiburg |
| Messzylinder | Brand, Wertheim |
| Mikrowelle MW 800 | Lotus, Indien |
| Neubauer-Zählkammer | Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen |
| Pipetten Discovery Pro | HTL Abimed GmbH, Langenfeld |
| Pipettierhilfe Pipetus® und Pipetus® Junior | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt |
| Reaktionsgefäßständer | Brand, Wertheim |
| Realtime PCR System 7300 | Applied Biosystems, Thermo Scientific, USA |
| Ripette | Eppendorf, Hamburg |
| Rollenmischer SRT6 | Stuart, UK |
| Rotator SB2 | Stuart, UK |
| Rundschüttler Certomat® R | Sartorius, Göttingen |
| SDS-PAGE Kammer Mini Protean II™ | Bio-Rad Laboratories, München |
| Semidry-Blot-Apparatur Trans-Blot®SD Transfer Cell | Bio-Rad Laboratories, München |
| Sicherheitswerkbank Heraeus HB 2448S | Bio-Flow Technik, Meckenheim |

| | |
|--|---------------------------------|
| Sicherheitswerkbank Klasse II NU-440-400E | Nuaire, UK |
| Spannungsgerät PowerPac™ basic und HC | Bio-Rad Laboratories, München |
| Spektralphotometer Epoch Reader | BioTek, Bad Friedrichshall |
| Standard pH-Meter WTW Serie | Inolab, Weilheim |
| Sterilbank Bench Captair®bio | Bio-Flow Technik, Meckenheim |
| Thermozykler C1000™ | Bio-Rad Laboratories, München |
| Thermozykler Mastercycler | Eppendorf, Hamburg |
| Tiefkühlschrank (-20 °C) | Liebherr, Ochsenhausen |
| Tiefkühlschrank (-80 °C) | Oehmen Labortechnik, Essen |
| Tischzentrifuge 5415 D und 5415 R | Eppendorf, Hamburg |
| Tischzentrifuge Mini Modell C1301 | Labnet, USA |
| UV-Dokumentationsgerät | Intas UV-Systeme, Göttingen |
| UV-Licht Tisch | Syngene, UK |
| Vortex MS2 und VF2 | IKA Labortechnik, Staufen |
| Wasserbad | GFL, Burgwedel |
| Wippschüttler KS125 basic | IKA Labortechnik, Staufen |
| Zentrifuge 5430 R | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifuge Megafuge 11 R mit Aerosolschutz | Heraeus, Thermo Scientific, USA |
| Zentrifuge Megafuge 1.0 | Heraeus Sepatech, Osterode |

2.14 Software

| Software (Version) | Hersteller und Verwendung |
|--|---|
| Clone Manager Professional (9.2) | Scientific & Educational Software, USA Sequenzbewertung, Oligonukleotid-Design |
| FluorChem 8800 (3.1.2) | Alpha Innotech Corporation, USA Densitometrische Auswertungen |
| Gen5 (1.10.8) | BioTek®, Bad Friedrichshall Spektralphotometrische Auswertungen |
| GraphPad Prism (4.0) | GraphPad Software, USA Erstellung von Graphen, Statistikauswertung |
| Leica Application Suite (3.4) | Leica, Wetzlar Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen |
| MatInspector (2.6) | Genomatix Software GmbH, München Auswertung möglicher Bindestellen von TF |
| NIS-Elements (3.0) | Laboratory Imaging, Tschechien Fluoreszenzaufnahmen |
| Sequence Detection Software (1.4.0.25) | Applied Biosystems, Thermo Scientific, USA Auswertung von Expressionsdaten |

2.15 Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|---|--|
| Deckgläser (12 mm Ø) | Menzel GmbH, Braunschweig |
| FACS-Röhrchen (5 ml) | BD, Heidelberg |
| Filterpapier Whatman® | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Frischhaltefolie Sarogold® Pro | Forasarogold, Schweiz |
| Glasperlen (2,85-3,45 mm Ø) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kryoröhrchen (2 ml, 4 ml) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Nitrozellulosetransfermembran Protran BA83 | GE Healthcare Life Sciences, Freiburg |
| Objektträger, 76 x 26 mm, mattrand | Engelbrecht, Edermünde |
| Parafilm „M“ Laboratory Film | American National Can, USA |
| Pasteurpipetten aus Glas | Brand, Wertheim |
| Pasteurpipetten aus Kunststoff | Neolab, Heidelberg |
| Petrischalen | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| pH Indikator Stäbchen (pH 0-14, pH 4-7) | Merck Millipore, Darmstadt |
| Pipetten Cellstar® (5 ml, 10 ml, 25 ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1000 µl) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Pipettenspitzen für PAGE Typ A (200 µl) | Bioplastics, Niederlande |
| Pipettenspitzen mikro (10 µl) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Pipettenspitzen, gestopft (10, 20, 200, 1000 µl) | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf |
| Polypropylen Röhrchen mit Belüftungsdeckel (10 ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Polypropylen Röhrchen mit Schraubdeckel (15 ml, 50 ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Reaktionsgefäße (0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml) | Eppendorf, Hamburg |
| Reaktionsgefäße mit Sicherheitsverschluss (1,5 ml) | Eppendorf, Hamburg |
| Reaktionsplatte MicroAmp™ (96-well) für Realtime RT-PCR | Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt |
| Ritips (1,25 ml) | Ritter Medical Care, Schwabmünchen |
| Rundfilter (110 mm Ø) | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Schutzfolien MicroAmp™ | Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt |
| Seritop Filtereinheit | Merck Millipore, Darmstadt |
| Skalpells steril Nr. 22 | Bayha Skalpelle, Tuttlingen |
| Spritzen (10 ml, 20 ml) | BD, Heidelberg |
| Sterilfilter Minisart (0,2 µm, 0,45 µm Porengröße) | Sartorius, Göttingen |
| Wägebapier | Machery-Nagel, Düren |

| | |
|---|--------------------------------|
| Wägeschalen | Carl Roth, Karlsruhe |
| Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²) | BD, Heidelberg |
| Zellkulturplatten (24- <i>well</i> , 96- <i>well</i>) | BD, Heidelberg |
| Zellkulturplatten (6- <i>well</i>) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellkulturschalen (10 cm Ø) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellschaber drehbar (13 mm) | Oehmen Labortechnik, Essen |
| Zellstofftücher Vala [®] Clean | Paul Hartmann, Heidenheim |

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolation von Nukleinsäuren

Die Isolation genomischer DNA (gDNA) erfolgte mit dem *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben über Silicamembrane aus 1×10^6 Zellen bzw. 25 mg Gewebepulver. Die Elution erfolgte mit 100 μ l des im Kit enthaltenen Niedrigsalzpuffers.

Zur RNA-Präparation wurden ausschließlich sterile, RNase-freie, gestopfte Spitzen benutzt und alle Arbeitsmaterialien mit *RNase AWAY*[®] (Carl Roth) desinfiziert. Die Isolation erfolgte mit dem *NucleoSpin*[®] *RNA II Kit* (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers. Durch Zusatz von 1% 2-Mercaptoethanol zum Lysepuffer wurde die RNase-Aktivität in der Probe inhibiert. Die RNA wurde mit 40 μ l RNase-freiem Wasser von der Silicamembran eluiert. Eingesetzt wurden $1,2 \times 10^6$ Zellen bzw. 30 mg Gewebepulver.

Zur qualitativen Analyse der isolierten Nukleinsäuren wurde die jeweilige Konzentration bestimmt (Kapitel 3.1.2) und 200 ng DNA bzw. 1 μ g RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 3.1.3).

3.1.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsmessung der Nukleinsäuren erfolgte spektralphotometrisch mittels *Epoch Reader* (BioTek[®]). Bei Werten außerhalb des linearen Messbereichs (oberhalb von 1,0 μ g/ μ l) wurden die Proben mit dem jeweiligen Elutionsmittel weiter verdünnt und erneut vermessen. Um eine ausreichende Reinheit der Nukleinsäuren zu gewährleisten, wurde auf ein Absorptionsverhältnis der OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ von $\geq 1,8$ geachtet.

3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese beruht auf der Wanderung der negativ geladenen Nukleinsäuren zur positiv geladenen Anode in einem elektrischen Feld, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von dem Molekulargewicht und der Konformation der

Fragmente, der Gelkonzentration und der angelegten elektrischen Feldstärke abhängig ist. In dieser Arbeit wurden 1% und 2% auspolymerisierte TAE-Agarosegele genutzt, die 1:20.000 mit dem Nukleinsäure-interkalierenden Agens *GelRed™* (Biotinum) versetzt wurden. Alle Proben wurden mit 6x-Orange-G-Gelladepuffer (Tabelle 3.1) versetzt, sodass eine finale Konzentration von 1x vorlag.

Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei 80-100 V für 30-90 min in TAE-Puffer (Tabelle 3.1). Zur Größenkontrolle wurde ein DNA-Marker mitgeführt (*TrackIt™ 100 bp DNA-Ladder*, Invitrogen bzw. *GeneRuler 1 kb DNA-Ladder*, Fermentas). Abschließend wurden die aufgetrennten Fragmente im Gel durch UV-Licht-Bestrahlung sichtbar gemacht und zur Auswertung und Dokumentation fotografiert.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Puffer für die Agarosegelelektrophorese

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|----------------------------------|--|
| TAE-Puffer pH 8,3 - 8,5 | 40 mM Tris 0,1% Essigsäure 1 mM EDTA |
| 6x-Orange-G-Gelladepuffer pH 7,6 | 10 mM Tris-HCl 60% Glycerin 60 mM EDTA 0,15% Orange-G |

3.1.4 Reverse Transkription

Mit Hilfe des viralen Enzyms *Reverse Transkriptase* (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wird einzelsträngige RNA in komplementäre, doppelsträngige DNA (cDNA) umgeschrieben. Verwendet wurde diese Methode zur Vorbereitung für alle Transkript- bzw. Genexpressionsanalysen. Zur reversen Transkription wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Quiagen) nach Angaben des Herstellers mit je 1 µg RNA pro Ansatz verwendet. Es wurden stets Negativkontrollen ohne *Reverse Transkriptase* (RT) als Test auf DNA-Verunreinigung oder ohne RNA zum Test auf Pufferkontamination mitgeführt. Die erhaltene cDNA wurde durch Zugabe von Nuklease-freiem Wasser (Ambion) auf eine finale Konzentration von 0,01 µg/µl eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.1.5 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) dient der Neusynthese bestimmter Nukleinsäureabschnitte basierend auf der Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen und zwei spezifischer Oligonukleotidprimer, welche den Sequenzabschnitt flankieren. Eine zyklische Wiederholung von DNA-Denaturierung, Oligonukleotid-Hybridisierung und Elongation, gekennzeichnet durch ein festgelegtes Temperaturprofil, führt schließlich zur exponentiellen Vervielfältigung der gewünschten Sequenz.

Zur Analyse der endogenen *TFF*-Expression wurde eine besondere Form der PCR verwendet, welche cDNA als Vorlage nutzt. Dabei werden die Schritte der reversen Transkription (Kapitel 3.1.4) und der anknüpfenden Amplifikation als RT-PCR zusammengefasst. Zur semi-quantitativen Analyse wurde das ubiquitär in allen humanen Zellen vorkommende Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenz verwendet. In der nachfolgenden Tabelle ist der allgemeine RT-PCR-Ansatz aufgeführt.

Tabelle 3.2: Komponenten des RT-PCR-Ansatzes

| Komponente | Finales Volumen | Finale Konzentration |
|--------------------------------------|-----------------|----------------------|
| Taq Puffer 10x | 5 µl | 1x |
| MgCl ₂ (50 mM) | 2 µl | 2 mM |
| dNTP Mix (10 mM) | 1 µl | 0,2 mM |
| Primer _{for/rev} (je 10 µM) | 2,5 µl | 0,5 µM |
| Taq DNA-Polymerase (5 u/µl) | 0,5 µl | 2,5 u |
| cDNA | 2,5 µl | |
| Nuklease-freies Wasser | ad 50 µl | |

Durch Zusatz von 2,5 µl DMSO wurde die Denaturierung der DNA in den Ansätzen zur *TFF*-Sequenzvervielfältigung gefördert.

Zur Amplifikation der *TFF*-Sequenzen wurde eine *Touchdown*-PCR eingesetzt. Bei dieser Variante wird in den ersten 15 Zyklen eine erhöhte Hybridisierungstemperatur gewählt, die sich alle fünf Zyklen langsam der Oligonukleotid-spezifischen Hybridisierungstemperatur annähert. Amplifikate, die in diesen ersten Zyklen entstehen, sind durch die geringe aber spezifische Bindung der Primer ebenfalls sehr spezifisch. Für 20 weitere Zyklen wird die korrekte Temperatur eingestellt, um die Häufigkeit der Primerbindung zu erhöhen. Durch diese Art der PCR wird sowohl die

Menge als auch Spezifität des PCR-Produkts gesteigert. Zur quantitativen Auswertung wurden die Ansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 3.1.3).

Tabelle 3.3: Temperaturprogramm der RT-PCR zur endogenen *TFF*-Expression

| Schritt | Dauer | Temperatur |
|------------------------|--|---------------|
| Initiale Denaturierung | 5 min | 95 °C |
| Denaturierung | 30 sec | 95 °C |
| Hybridisierung | 15 sec | 61 °C - 58 °C |
| Elongation | 30 sec | 72 °C |
| Finale Elongation | 10 min | 72 °C |
| Zyklusanzahl | je 5 Zyklen bei 61 °C, 60 °C & 59 °C + 20 Zyklen bei 58 °C | |

Tabelle 3.4: Temperaturprogramm der RT-PCR zur endogenen *GAPDH*-Expression

| Schritt | Dauer | Temperatur |
|------------------------|-----------|------------|
| Initiale Denaturierung | 5 min | 95 °C |
| Denaturierung | 30 sec | 95 °C |
| Hybridisierung | 15 sec | 59 °C |
| Elongation | 30 sec | 72 °C |
| Finale Elongation | 5 min | 72 °C |
| Zyklusanzahl | 25 Zyklen | |

3.1.6 Quantitative *Realtime* RT-PCR

Die quantitative *Realtime* RT-PCR ist wie die PCR (Kapitel 3.1.5) eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, welche zusätzlich die Quantifizierung des gebildeten Amplifikats ermöglicht. Zur Analyse der Genexpression nach reverser Transkription (Kapitel 3.1.4) wurden in dieser Arbeit *TaqMan*[®] *Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) verwendet. Diese beinhalten sequenzspezifische Oligonukleotide und ein zusätzliches Detektionsoligonukleotid, welches zwischen den flankierenden Oligonukleotiden mit der DNA hybridisiert. Es ist kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem nichtfluoreszierenden Quencher am 3'-Ende markiert. Das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht wird mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) auf den Quencher übertragen, sodass keine Fluoreszenz messbar ist. Durch Nutzung einer DNA-Polymerase mit 5'-3' Exonukleaseaktivität wird der Fluoreszenzfarbstoff während der Elongation freigesetzt und das dabei entstehende Fluoreszenzsignal ist proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt (Lottspeich und Engels 2006a).

Verwendet wurde das 7300 *Realtime* PCR System (Applied Biosystems) mit den in Kapitel 2.7 gelisteten *TaqMan*[®] *Gene Expression Assays*. Alle Reaktionen wurden mit dem *TaqMan*[®] *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) und je 50 ng cDNA in einem Volumen von 20 µl in Duplikaten angesetzt. Verwendet wurde das in Tabelle 3.5 aufgeführte Temperaturprogramm.

Tabelle 3.5: Temperaturprogramm des 7300 *Realtime* PCR Systems

| Schritt | Dauer | Temperatur |
|------------------------|-----------|------------|
| Initiale Heizphase | 2 min | 50 °C |
| Initiale Denaturierung | 10 min | 95 °C |
| Denaturierung | 15 sec | 95 °C |
| Hybridisierung | 1 min | 60 °C |
| Zyklusanzahl | 40 Zyklen | |

Die Quantifizierung der Zielgenexpression erfolgte relativ zu der Expression eines internen Referenzgens mit konstanter Expression mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Dabei wird der sogenannte C_T -Wert (*threshold cycle*) herangezogen. Dieser gibt Auskunft über die Zyklusanzahl bei der erstmals ein eindeutiges Fluoreszenzsignal über die Hintergrundfluoreszenz hinaus detektierbar ist und zeigt gleichzeitig den Übergang in die exponentielle Phase an. Zur Auswertung wird zunächst von dem detektierten C_T -Wert des Zielgens der zugehörige C_T -Wert des Referenzgens abgezogen (1). Ausgehend von diesem Wert (ΔC_T) erfolgt anschließend die Subtraktion einer als Kalibrator festgelegten Kontrollprobe von der eigentlichen Probe (2).

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen} \quad (1)$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Probe} - \Delta C_T \text{ Kalibrator} \quad (2)$$

Der relative Expressionswert (*relative quantification*; RQ) ist gegeben durch

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}. \quad (3)$$

Die Auswertung der Expressionsdaten erfolgte mit der systemeigenen *Sequence Detection Software* Version 1.4.0.25 (Applied Biosystems).

3.1.7 Restriktion

Die Restriktion wurde in dieser Arbeit zur unspezifischen Fragmentierung genomischer DNA zur Vorbereitung für die Bisulfitkonvertierung (Kapitel 3.1.8) genutzt und um gezielt Schnittstellen zur Plasmidgeneration zu erzeugen (Kapitel 3.1.11). Verwendet wurden *Fast Digest* Restriktionsendonukleasen der Firma Fermentas, von denen pro Ansatz jeweils 5 *fast digest units* in entsprechendem Puffersystem eingesetzt wurden. Die enzymatische Reaktion erfolgte über einen Zeitraum von 30 min bei 37 °C. Das Enzym wurde direkt im Anschluss durch einen Inkubationsschritt von 10 min bei 72 °C hitzeinaktiviert. Zur Kontrolle wurde der Ansatz gelelektrophoretisch analysiert (Kapitel 3.1.3).

3.1.8 Bisulfitkonvertierung

Die Bisulfitkonvertierung ist eine effiziente Methode zur Analyse der DNA-Methylierung (Frommer *et al.* 1992) und wurde in dieser Arbeit zur Analyse der *TFF*-Promotormethylierung verwendet. Bisulfit (HSO_3^-) katalysiert die hydrolytische Deaminierung unmethylierter Cytosine zu Uracil, wobei im ersten Schritt das C6-Atom des Cytosins sulfoniert und im zweiten Schritt die Aminogruppe am C4-Atom hydrolysiert wird (Abbildung 3.1). Methylierte Cytosine (^5mC) sind geschützt und von dieser Umbildung nicht betroffen, wodurch eine methylierungsabhängige Modifikation der DNA ermöglicht wird.

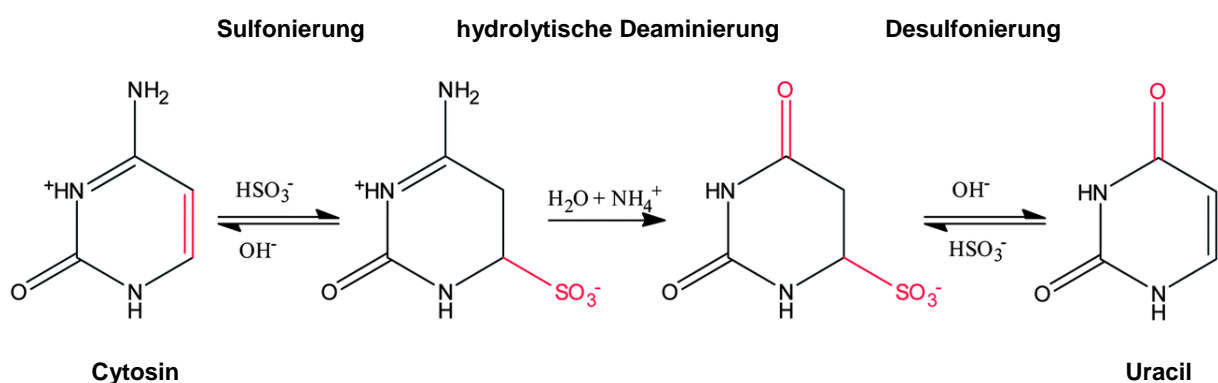


Abbildung 3.1: Ablauf der Bisulfitkonvertierung

Durch Bisulfit (HSO_3^-) konvertieren unmethylierte Cytosine durch hydrolytische Deaminierung zu Uracil. Abbildung modifiziert nach (Saheb *et al.* 2014).

In einer nachfolgenden PCR-Reaktion mit spezifischen Oligonukleotiden wird die bisulfitbehandelte DNA amplifiziert (Kapitel 3.1.9). Dabei werden alle konvertierten Uracile durch Thymin ersetzt, wodurch eine eindeutige Unterscheidung beider Cytosin-Formen in einer Sequenzanalyse ermöglicht wird (Lottspeich und Engels 2006b).

In dieser Arbeit wurde die Bisulfitkonvertierung mit dem *EZ DNA Methylation-Gold™ Kit* (Zymo Research) durchgeführt. Eingesetzt wurde genomische DNA, die zuvor mit Restriktionsenzymen fragmentiert wurde (Kapitel 3.1.7). Je nach zu analysierendem Genabschnitt wurden dafür die Restriktionsenzyme *EcoRI* (für *TFF1*), *HindIII* (für *TFF2*) oder *BglI* (für *TFF3*) eingesetzt, die nicht in der entsprechenden *TFF*-Sequenz schneiden. Diese Vorbehandlung sollte die nachfolgende Denaturierung der DNA erleichtern, da nur einzelsträngig-vorliegende DNA konvertiert werden kann.

Pro Ansatz wurden je 500 ng der geschnittenen und nach Herstellerangaben mit dem *Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Life Sciences) aufgereinigten DNA in gesamt 20 µl sterilem Wasser (*Aqua ad injectabilia*, B. Braun) durch Zugabe von 130 µl frisch angesetzttem CT-Konvertierungsreagenz behandelt. In einem Thermozykler wurde das vom Hersteller angegebene Temperaturprofil eingestellt, welches die DNA zunächst für 10 min bei 98 °C denaturiert und für 2,5 h bei 64 °C konvertiert. Die Aufreinigung der CT-konvertierten DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Die DNA wurde direkt in der entsprechenden PCR-Reaktion eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

3.1.9 Amplifikation der Promotorregion

Die jeweiligen DNA-Sequenzen der Promotorregion von *TFF1*, *TFF2* und *TFF3* wurden mittels PCR aus der Bisulfit-konvertierten DNA amplifiziert. Verwendet wurden spezielle Primer, die ausschließlich an die konvertierte DNA binden. Die entsprechenden Sequenzen wurden aus der Publikation der Gruppe um Vestergaard übernommen (Vestergaard *et al.* 2010) und sind mit den anderen Oligonukleotidprimern in Kapitel 2.6 gelistet. Der PCR-Ansatz (Tabelle 3.6) und das PCR-Protokoll (Tabelle 3.7) sind im Folgenden angegeben.

Tabelle 3.6: Komponenten des PCR-Ansatzes zur Amplifikation der Promotorregion

| Komponente | Finales Volumen | Finale Konzentration |
|---|-----------------|----------------------|
| GoTaq® Flexi Puffer 5x | 10 µl | 1x |
| MgCl ₂ (25 mM) | 4 µl | 2 mM |
| dNTP Mix (10 mM) | 1 µl | 0,2 mM |
| Primer _{for/rev} (je 10 µM) | 2,5 µl | 0,5 µM |
| GoTaq® G2 Hot Start Polymerase (5 u/µl) | 0,25 µl | 1,25 u |
| CT-konvertierte gDNA | 5 µl | |
| Nuklease-freies Wasser | ad 50 µl | |

Tabelle 3.7: Temperaturprogramm der PCR zur Amplifikation der Promotorregion

| Schritt | Dauer | Temperatur |
|------------------------|-----------|----------------|
| Initiale Denaturierung | 5 min | 95 °C |
| Denaturierung | 1 min | 95 °C |
| Hybridisierung | 2 min | 53 °C / 54 °C* |
| Elongation | 1 min | 72 °C |
| Finale Elongation | 10 min | 72 °C |
| Zyklusanzahl | 50 Zyklen | |

* Auswahl von 54 °C für TFF1 sowie TFF2 und von 53 °C für TFF3.

Der PCR-Ansatz wurde vollständig auf ein 2%-TAE-Agarosegel aufgetragen und das PCR-Produkt im Anschluss aus dem Gel eluiert und nach Herstellerangaben mit dem *Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Life Sciences) aufgereinigt. Anschließend wurde das PCR-Produkt in den pCR™4-TOPO® Vektor des *TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing* (Invitrogen) ligiert (Kapitel 3.1.10).

3.1.10 TOPO® TA Klonierung

Zur Analyse der Bisulfit-konvertierten *TFF*-Promotorregionen wurde die Technik der TOPO® TA Klonierung angewandt. Die Methode basiert auf der Ligation von zwei DNA-Fragmenten in Anwesenheit einer **Topoisomerase** durch Hybridisierung der komplementären Basenpaare **Thymin** und **Adenin** (Shuman 1994). In dieser Arbeit wurde das *TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing* (Invitrogen) mit dem linearisierten pCR™4-TOPO® Vektor verwendet. Durch Amplifikation der Promotorregion mittels

Taq-Polymerase verfügten die Sequenzen über einen einzelnen Adenin-Überhang am 3'-Ende und konnten so mit dem Thyminrest des Vektors hybridisieren.

Zur Ligation wurden jeweils 4 µl des PCR-Produkts mit 1 µl der mitgelieferten Salzlösung und 1 µl des pCR™4-TOPO® Vektors gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde in einem anschließenden Schritt zur Bakterientransformation (Kapitel 3.1.13) verwendet.

3.1.11 Plasmid-Konstrukte zur TFF3-Überexpression

Zur funktionellen Analyse von TFF3 wurden verschiedene Plasmid-Konstrukte hergestellt, die zur transienten (Kapitel 3.3.8) oder stabilen, lentiviralen (Kapitel 3.3.9) TFF3-Überexpression in Y-79 Retinoblastomzellen verwendet wurden. Die Herstellung dieser Konstrukte ist im Folgenden geschildert. Eine detaillierte Auflistung aller genutzten Plasmide ist in Kapitel 2.9 zu finden.

3.1.11.1 *pCS2+_UBQ_TFF3* zur transienten TFF3-Überexpression

Zur Konstruktion eines Expressionssplasmids zur transienten TFF3-Überexpression wurde die humane *TFF3*-cDNA-Sequenz aus dem in der Arbeitsgruppe bestehenden Plasmid *pLVX-IRES-Neo_TFF3* mittels PCR amplifiziert und über spezifische Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor *pCS2+_UBQ* umklontiert. Das *pCS2+_UBQ* Plasmid ist ein leerer Expressionsvektor zur transienten Expression und beinhaltet den humanen Ubiquitin-C-Promotor, der durch eine hohe transgene Expressionsrate ausgezeichnet ist (Schorpp *et al.* 1996). Das Plasmid wurde in unserer Arbeitsgruppe konstruiert und freundlicherweise von Dr. A. Weise zur Verfügung gestellt.

Die proteinkodierende *TFF3*-Sequenz des *pLVX-IRES-Neo_TFF3* Plasmids wurde ursprünglich aus einer humanen Magenprobe amplifiziert und umschließt alle drei vorhandenen Exons mit Start- und regulärem Stop-Codon.

Zur Amplifikation der *TFF3*-Sequenz wurden zwei Oligonukleotidprimer (Kapitel 2.6) mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme (*EcoRI* und *XhoI*) genutzt, die in der *multiple cloning site* (MCS) des Zielplasmids *pCS2+_UBQ* liegen. Um die Fehlerrate bei der Amplifikation gering zu halten, wurde die *PfuUltra*™ HF DNA-Polymerase mit *proof-reading* Funktion verwendet (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Komponenten des PCR-Ansatzes zur Amplifikation der *TFF3*-Sequenz

| Komponente | Finales Volumen | Finale Konzentration |
|--|-----------------|----------------------|
| PfuUltra™ HF Puffer 10x | 5 µl | 1x |
| dNTP Mix (10 mM) | 1 µl | 0,2 mM |
| Primer _{for/rev} (je 10 µM) | 2,5 µl | 0,5 µM |
| PfuUltra™ HF DNA Polymerase (2,5 u/µl) | 0,5 µl | 1,25 u |
| Plasmid-DNA | 2 µl | 5,5 ng |
| Nuklease-freies Wasser | ad 50 µl | |

Tabelle 3.9: Temperaturprogramm der PCR zur Amplifikation der *TFF3*-Sequenz

| Schritt | Dauer | Temperatur |
|------------------------|-----------|------------|
| Initiale Denaturierung | 5 min | 95 °C |
| Denaturierung | 30 sec | 95 °C |
| Hybridisierung | 15 sec | 58 °C |
| Elongation | 30 sec | 72 °C |
| Finale Elongation | 5 min | 72 °C |
| Zyklusanzahl | 35 Zyklen | |

Das PCR Produkt wurde mittels *Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Life Sciences) nach Herstellerangaben aufgereinigt und vollständig zur Restriktion mit *EcoRI* und *XhoI* verwendet (Kapitel 3.1.7). Parallel wurde 1 µg des *pCS2+_UBQ* Expressionsvektors mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert. Zur Kontrolle wurden beide Ansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die aus dem Gel eluierten DNA-Fragmente wurden mit dem *Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Life Sciences) nach Herstellerangaben aufgereinigt, wie unter 3.1.12 beschrieben ligiert und zur Bakterientransformation (Kapitel 3.1.13) verwendet.

3.1.11.2 *pLenti CMV_TFF3* zur lentiviralen TFF3-Überexpression

Zur Konstruktion eines Expressionssplasmids zur lentiviralen TFF3-Überexpression wurde die humane *TFF3*-cDNA-Sequenz mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus dem in der Arbeitsgruppe bestehenden *pLVX-IRES-Neo_TFF3* Plasmid mit *EcoRI* und *XhoI* herausgeschnitten. Dazu wurde 1 µg Plasmid-DNA enzymatisch geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel eluiert.

Die *TFF3*-Sequenz wurde anschließend in den *Gateway*[®] *entry* Vektor *pENTR4* (Campeau *et al.* 2009) ligiert (Kapitel 3.1.12), der zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert wurde. Auf diesen Schritt folgte die *in vitro* Rekombination mit dem Zielplasmid *pLenti CMV_Puro Dest* (Campeau *et al.* 2009) mittels *Gateway*[®] Klonierung. Beide Plasmide beinhalten Rekombinationsstellen, die als L- und R-Sequenzen bezeichnet werden. Im *Gateway*[®] *entry* Vektor *pENTR4* wird die ligierte *TFF3*-Sequenz von den Rekombinationsstellen attL1 und attL2 flankiert, während das Zielplasmid *pLenti CMV_Puro Dest* die Rekombinationsschnittstellen attR1 und attR2 aufweist. Die Rekombination erfolgt in einer sogenannten LR-Reaktion, bei der es zu einem Austausch der flankierten Sequenzen kommt (Wink 2004). Das ursprünglich im Zielplasmid kodierte *ccdB*-Gen, welches zu einer Inhibition des Bakterienwachstums führt, befindet sich nach der Rekombination in dem *Gateway*[®] *entry* Vektor *pENTR4* und verhindert die Ausbildung dieser Rekombinanten (Bernard und Couturier 1992; Miki *et al.* 1992).

Gemäß Herstellerangaben wurden in einem Ansatz je 150 ng des *pENTR4_TFF3* und *pLenti CMV_Puro Dest* 1:1 vermischt und auf ein Gesamtvolumen von 8 µl mit TE-Puffer (Invitrogen) aufgefüllt. Zu diesem Plasmidansatz wurden 2 µl des *Gateway*[®] LR Clonase™ II Enzym Mix (Invitrogen) pipettiert und durch kurzes Vortexen gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 25 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl Proteinase K-Lösung und einer 10 min Inkubation bei 37 °C gestoppt. Die Bakterientransformation erfolgte abweichend von den Herstellerangaben in *One Shot*[®] *TOP10 E.coli* wie unter 3.1.13 beschrieben.

3.1.12 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels T4 DNA-Ligase (Fermentas) für 60 min bei Raumtemperatur und anschließender Übernachtinkubation bei 4 °C in 20 µl Ansätzen (Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10: Komponenten des Ligationsansatzes

| Komponente | Finales Volumen | Finale Konzentration |
|---------------------------------|-----------------|----------------------|
| T4 DNA-Ligase-Puffer 10x | 2 µl | 1x |
| T4 DNA-Ligase (1 u/µl) | 1 µl | 1 u |
| Vektor-DNA / Plasmid-DNA | | 25 ng / 3x bzw. 5x |
| Nuklease-freies Wasser | ad 20 µl | |

Zur Ligation wurden 25 ng Vektor-DNA verwendet. Das Teilchenverhältnis von Insert zu Vektor wurde jeweils angepasst. Die einzusetzende Masse an Insert-DNA wurde mittels folgender Formel bestimmt:

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} = \frac{\text{Masse}_{\text{Vektor}} \cdot \text{Länge}_{\text{Insert}}}{\text{Länge}_{\text{Vektor}}} \cdot \text{Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}}$$

Für die Ligation von TFF3 in *pCS2+_UBQ* (Kapitel 3.1.11.1) wurde ein dreifacher Überschuss an Insert und für die Ligation von TFF3 in den *Gateway entry Vektor pENTR4* (Kapitel 3.1.11.2) ein fünffacher Überschuss an Insert gewählt. Die Transformation der Ligation erfolgte wie unter 3.1.13 beschrieben in chemisch kompetente *One Shot[®] TOP10 E.coli*.

3.1.13 Bakterientransformation

Die Transformation von je 2 µl Ligationsansatz erfolgte nach Angaben des Herstellers in chemisch kompetente *One Shot[®] TOP10 E.coli* des *TOPO[®] TA Cloning[®] Kits for Sequencing* (Invitrogen). Anschließend wurden die Bakterien mit Glasperlen auf Antibiotika-haltigen LB-Agar-Platten ausplattiert und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion wurde je nach Plasmidresistenz das Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) verwendet.

3.1.14 Starterkulturen

Einzelne Bakterienkolonien der Transformationsansätze (Kapitel 3.1.13) wurden zur Animpfung von je 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Zusatz des Selektivantibiotikums von der LB-Agar-Platte abgenommen. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C auf dem Schüttler mit 180 rpm wurden die Bakterien pelletiert und zur Plasmidisolierung (Kapitel 3.1.15) genutzt. Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA für Transfektionen wurden die 2 ml Übernachtskultur als Inokulum von 250 ml LB-Medium mit Antibiotikumzusatz verwendet, unter den oben genannten Bedingungen für 24 h inkubiert und zur Plasmidisolierung mittels *EndoFree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) eingesetzt.

3.1.15 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus jeweils 2 ml *E.coli* Übernachtskultur wurde mittels *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Plasmide, die zur Transfektion verwendet wurden, wurden zur Herstellung höherer Konzentrationen mittels *EndoFree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Der Hinweis auf „*EndoFree*“ weist auf eine Reduktion einer möglicherweise durch die Plasmid-DNA hervorgerufene Verunreinigung mit Endotoxinen hin und verbessert dadurch die Transfektionseffizienz.

3.1.16 Sequenzierung

Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurden extern von der Firma Microsynth AG mit der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger *et al.* 1977) durchgeführt. Dazu wurden je 1,2 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 15 µl mit sterilem Wasser (*Aqua ad injectabilia*, B. Braun) eingeschickt. Die Sequenzierung wurde mit dem Standardprimer M13_{rev} durchgeführt. Abschließende Sequenzauswertungen erfolgten mit der *Clone Manager 9.2 Software*.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Proteinisolation aus Zelllysaten

Zur Analyse der TFF3-Proteinexpression wurden Gesamtzelllysate hergestellt, wofür die Zellen in Radioimmunpräzipitationsassay (RIPA)-Lysepuffer (Spruck *et al.* 2006) aufgenommen wurden (Tabelle 3.11). Zur Herstellung von Lysaten für den *Proteome Profiler Human Phospho-Kinase-Array* (R&D Systems) wurden die Zellen in dem mitgelieferten Lysepuffer aufgenommen.

Zur Lyse von 1×10^6 Zellen wurden 100 µl des jeweiligen Lysepuffers verwendet, der nach einem Waschschrift mit kaltem PBS zu den Zellen gegeben wurde. Die Lyse erfolgte für 60 min bei 4 °C unter konstanter Kreisbewegung in einem Rotator. Verunreinigungen wie Zellreste wurden durch einen finalen Zentrifugationsschritt von 10 min bei 14.000 rpm bei 4 °C abgetrennt. Die Konzentration des im Überstand enthaltenen Proteins wurde mittels Bicinchonsäure-Assay (Kapitel 3.2.2) bestimmt. Die isolierten Proteine wurden bis zur Nutzung bei -80 °C eingefroren.

Tabelle 3.11: Zusammensetzung des RIPA-Puffers für die Zelllyse

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--------------------|--|
| RIPA-Puffer pH 8,0 | 150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl 1% Nonidet P-40 0,5% Natriumdeoxycholat 0,1% SDS |
| frisch zusetzen | 10 mM NaF 1 mM DTT 1 mM PMSF 0,1 mM Na ₃ VO ₄ 1x Protease Inhibitor Cocktail |

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchonsäure-Assay

Zur quantitativen Bestimmung des Gesamtproteingehalts aus Zelllysaten wurde der Bicinchonsäure-Assay (BCA) verwendet (Smith *et al.* 1985). Die Methode beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der Cu²⁺ durch Reaktion mit Proteinen zu Cu⁺ reduziert wird und mit zwei Molekülen BCA einen violetten, wasserlöslichen Farbkomplex bildet, dessen Farbintensität mit der Proteinkonzentration korreliert.

In dieser Arbeit wurde das *BCA™ Protein Assay Reagent Kit* (Pierce) in 96-well-Platten nach Herstellerangaben verwendet. Die einzelnen Proben wurden in Duplikaten in einer 1:9 Verdünnung mit dem entsprechenden Lysepuffer eingesetzt, der gleichzeitig als Referenz diente. Die Detektion erfolgte mittels Spektralphotometer (*Epoch Reader*, BioTek®) bei einer Wellenlänge von 562 nm.

3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von Proteinen aus Gesamtzelllysaten erfolgte mittels denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Bei dieser Methode werden die Proteine in einem Polyacrylamidgel nach Anlegung eines elektrischen Feldes in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) entsprechend ihres Molekulargewichts voneinander separiert. In dieser Arbeit wurde das Prinzip einer diskontinuierlichen SDS-PAGE genutzt, bei der sich die Gelmatrix des Polyacrylamidgels aus zwei sich abgrenzenden Bereichen zusammensetzt, die sich in ihrem eingestellten Vernetzungsgrad sowie dem pH-Wert ihres jeweiligen Puffers unterscheiden (Davis 1964). Zur Durchführung wurden selbstgegossene Sammel- und Trenngele mit einer Stärke von 1,5 mm genutzt (Tabelle 3.12).

Tabelle 3.12: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|-------------|---|
| Sammelgel | 5% Acrylamid/Bis-Lösung 125 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,1% SDS 0,1% APS 0,1% TEMED |
| Trenngel | 12% Acrylamid/Bis-Lösung 375 mM Tris-HCl, pH 8,8 0,1% SDS 0,1% APS 0,1% TEMED |

Das Polyacrylamidgel wurde in eine Elektrophoresekammer (SDS-PAGE Kammer *Mini Protean II™*, Bio-Rad Laboratories) eingesetzt, die dann mit SDS-Elektrophoresepuffer (Tabelle 3.13) befüllt wurde. Die gewünschte Proteinmenge von 50 µg wurde auf ein Gesamtvolumen von 30 µl mit RIPA-Lysepuffer aufgefüllt und die Proteine in den Proben durch Zusatz von 10 µl 4x-SDS-Probenpuffer nach Lämmli (Tabelle 3.13) für 10 min bei 95 °C hitzedenaturiert. Zur Separation und Detektion von sezerniertem TFF3 wurden je 30 µl Mediumüberstand nach Zentrifugation mit 10 µl 4x-SDS-Probenpuffer nach Lämmli versetzt und ebenfalls hitzedenaturiert. Zur Kontrolle wurden 10 ng rTFF3 (BioVision), ebenfalls in einem Gesamtvolumen von 40 µl, aufgetragen. Die Bestimmung der Proteingröße erfolgte anhand eines mitgeführten molekularen Größenstandards (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, Fermentas), von dem 10 µl aufgetragen wurden. Bei einer elektrischen Spannung von 160 V erfolgte die Proteinseparation für 60-80 min. Anschließend wurden die Polyacrylamidgele zur Analyse via Western-Blot (Kapitel 3.2.4) verwendet.

Tabelle 3.13: Zusammensetzung der Puffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--|--|
| SDS-Elektrophoresepuffer pH 8,8 | 25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 0,1% SDS |
| 4x-SDS-Probenpuffer nach Lämmli pH 6,8 | 250 mM Tris-HCl 8% SDS 40% Glycerin 0,04% Bromphenolblau 20% 2-Mercaptoethanol |

3.2.4 Western-Blot und Immundetektion

Beim Western-Blot (WB) werden die zuvor im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Trägermembran transferiert und behalten ihre vorherige Anordnung aufgrund hydrophober Wechselwirkungen mit der Membran bei (Towbin *et al.* 1979). Die immobilisierten Proteine können abschließend gezielt durch Bindung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

Um überschüssiges SDS zu entfernen, wurde das Polyacrylamidgel unmittelbar nach der Elektrophorese für 2 min in Towbin-Transferpuffer (Tabelle 3.14) äquilibriert. Ebenfalls wurden die für den Transfer verwendeten Nitrozellulosemembrane und Filterpapiere in Towbin-Transferpuffer getränkt. Für den Transfervorgang wurde eine Semidry-Blot-Apparatur (*Trans-Blot[®]SD Transfer Cell*, Bio-Rad Laboratories) benutzt. Der Proteintransfer erfolgte bei 150 mA über einen Zeitraum von 40 min.

Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Nitrozellulosemembran im Anschluss an den Blotvorgang für etwa 1 min in Ponceau S Lösung (Tabelle 3.14) inkubiert. Dabei wurden die Proteine durch den roten Farbstoff unspezifisch und reversibel angefärbt. Durch einmaliges Waschen mit TBS-T wurde der Farbstoff größtenteils wieder von der Membran entfernt.

Zur Reduktion unspezifischer Antikörperbindung auf der Membran wurden freie Bindestellen durch eine 60 min Inkubation in Block-Puffer (Tabelle 3.14) abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, abhängig von der Stärke der Bindungsaffinität, für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Die verwendeten Primärantikörper wurden 1:2.000 (anti-TFF3) bzw. 1:1.000 (anti- β -Aktin) in TBS-T mit 0,025% BSA und 0,02% NaN_3 angesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen der Membran für je 5 min mit TBS-T entfernt. Auf diesen Schritt folgte die Sekundärantikörper-Hybridisierung (1:10.000 in TBS-T mit 2% Magermilchpulver) für die Dauer von 1 h bei Raumtemperatur. Für eine optimale Verteilung der Antikörper erfolgte die Inkubation der Membran auf einem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Substratlösung, bestehend aus Luminol und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) des *Western Lightning[®] Plus-ECL Substrate Kits* (Perkin Elmer), in einem Verhältnis von 1:1 vermischt und gleichmäßig auf der Membran verteilt.

Die Emission der Chemilumineszenz, bedingt durch die katalytische Umsetzung des Luminols durch die Sekundärantikörper-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase, wurde über das Kamerasystem des *LAS-3000 Mini Image Reader* (Fujifilm) detektiert. Auf diese Weise nachgewiesene Banden wurden mit Hilfe der *FluorChem 8800 Software* (Alpha Incorporation) densitometrisch evaluiert.

Tabelle 3.14: Zusammensetzung der Puffer für die Western-Blot- und Immundetektion

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|------------------------------|---|
| Towbin-Transferpuffer pH 8,6 | 192 mM Glycin 25 mM Tris-HCl 20% Methanol |
| Ponceau S Lösung | 1% Essigsäure 0,5% Ponceau S |
| Block-Puffer (WB) | TBS-T 5% Magermilchpulver |

3.2.5 Proteom-Array

Zur Analyse möglicher in den TFF3-Signalweg involvierter Proteine wurde der *Proteome Profiler Human Phospho-Kinase-Array* (R&D Systems) durchgeführt. Dieser detektiert die relativen Phosphorylierungslevel 43 verschiedener Kinasen sowie die Expression zwei zugehöriger Proteinsubstrate und kann bei Vergleich unterschiedlicher Proben Informationen über eine mögliche Aktivierung einzelner Moleküle geben. Durch verschiedene Antigen-spezifische Antikörper, die auf der Nitrozellulosemembran des Array aufgetragen sind, werden die jeweiligen Proteine selektiv gebunden. In einem folgenden Inkubationsschritt mit einer Mischung aus biotinylierten phosphorylierungs-spezifischen Sekundärantikörpern werden ausschließlich phosphorylierte Proteine markiert, deren Nachweis nach Zugabe und Bindung des Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Substrats Streptavidin an das Biotin der Sekundärantikörper durch Umsetzung eines Chemilumineszenz-Reagenzes erfolgt.

Zur Analyse wurden jeweils 400 µg Protein aus Zelllysaten eingesetzt, deren Herstellung unter 3.2.1 beschrieben ist. Die Durchführung des Arrays erfolgte nach Herstellerangaben und unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien. Zur Quantifizierung wurde die *FluorChem 8800 Software* (Alpha Incorporation) verwendet.

3.2.6 TFF3-Immunfluoreszenzfärbung an fixierten Zellen

Für die Immunfluoreszenzfärbung (IF) zur intrazellulären Lokalisation von TFF3 wurden die Zellen wie unter 3.3.2 beschrieben auf Deckgläschen ausgesät und fixiert. Danach wurden die Zellen zunächst für 5 min mit kaltem 100%-Methanol auf Eis permeabilisiert und anschließend dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Freie Bindestellen wurden durch Zugabe von Block-Puffer (Tabelle 3.15) für 60 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Inkubation mit dem TFF3-Primärantikörper (1:400 in PBS mit 4% BSA, 1% NGS und 0,1% Triton™ X-100) erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Die ungebundenen Antikörper wurden im Anschluss durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt, gefolgt von einer 60 min Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (1:1.000 in PBS mit 1% BSA) bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS und doppelt destilliertem Wasser wurden die Zellen in Immunfluoreszenz-Eindeckmedium (DAKO) mit DAPI (2 µg/ml) auf Objektträgern eingedeckt. Zur Kontrolle auf unspezifische Antikörperbindungen wurde eine Probe mitgeführt, bei der der Erstantikörper durch PBS ersetzt wurde.

Tabelle 3.15: Zusammensetzung des Block-Puffers für die Immunfluoreszenz

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|-------------------|---|
| Block-Puffer (IF) | PBS 4% BSA 5% NGS 0,3% Triton™ X-100 |

3.3 Zellkulturtechnik

3.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter Einhaltung steriler Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte unter konstanten Bedingungen in CO₂-Inkubatoren in wasserdampfgesättigter Umgebung bei einem Kohlenstoffdioxid Gehalt von 5% (HEK293T) bzw. 10% (Retinoblastomzellen) und einer Temperatur von 37 °C. Die Retinoblastomzellen wurden als Suspensionskultur in RB-Vollmedium in Zellkulturflaschen gezüchtet, während die embryonalen Nierenzellen als adhärente Zellen in HEK293T-Vollmedium in Zellkulturschalen kultiviert wurden.

3.3.2 Adhärenz und Fixierung auf Deckgläschen

Für verschiedene Versuchsansätze mussten die Retinoblastomzellen ein adhärentes Verhalten aufweisen. Zur Verbesserung der Anhaftung wurde die entsprechende Oberfläche (Deckgläschen oder Zellkulturplatten) für einen Zeitraum von mindestens 30 min bei Raumtemperatur mit einer Poly-D-Lysin-Lösung (10 µg/ml in PBS) beschichtet. Nach Entfernung der Lösung folgte ein Waschschrift mit PBS.

Für alle immunzytochemischen Analysen wurden je 1×10^5 Zellen in 100 µl ihres Mediums für min. 2 h auf Poly-D-Lysin-beschichteten Deckgläschen ausgesät. Die Fixierung der Zellen erfolgte abschließend mit einer 4%-Paraformaldehydlösung für 1 h bei 4 °C, gefolgt von einem Waschschrift mit PBS.

3.3.3 Subkultivierung

Ab einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde ein Teil der Zellsuspension entfernt und das entnommene Volumen durch Zugabe von frischem, vorgewärmtem RB-Vollmedium ersetzt. Je nach Zelldichte und Inkubationszeitraum wurden die Zellen 1:4 bis 1:20 verdünnt. Um abgestorbene und fragmentierte Zellen zu entfernen, wurden die Zellen alle zwei bis drei Wochen durch einen Zentrifugationsschritt für 5 min bei 800 x g pelletiert, nach Dekantieren des Überstands in frischem RB-Vollmedium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche ausgesät.

Die adhärent wachsenden Zellen wurden zum Passagieren nach einem Waschschrift mit vorgewärmtem PBS durch Zusatz von 2 ml einer 0,25%-Trypsin/EDTA-Lösung für 2 min bei 37 °C enzymatisch von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst. Im Anschluss wurden die Zellen in gleichem Volumen an Zellkulturmedium aufgenommen und durch einen Zentrifugationsschritt von 5 min bei 800 x g pelletiert. Ein Teil der Zellen wurde in frischem HEK293T-Vollmedium aufgenommen und in eine neue Zellkulturschale ausgesät.

3.3.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Erhaltung wurden die Zellen kryokonserviert. Dafür wurden diese in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro Milliliter in DMEM mit insgesamt 20% FBS und einem Zusatz von 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen, in

Kryoröhrchen überführt und für 24 h bei -20 °C eingefroren. Für die langfristige Aufbewahrung wurden die Zellen bei -80 °C gelagert.

Zum Auftauen wurde die Zellsuspension in einem 37 °C warmen Wasserbad angetaut und in 10 ml warmem Vollmedium aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 min bei 800 x g zentrifugiert, in neuem, vorgewärmtem Vollmedium aufgenommen und zunächst in einem Gesamtvolumen von 10 ml kultiviert. Am Folgetag wurde das Medium vollständig gewechselt, um Reste des DMSOs und tote, fragmentierte Zellen zu entfernen.

3.3.5 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer nach Trypanblaufärbung. Die ungefärbten, lebenden Zellen der vier äußeren Großquadrate wurden am Durchlichtmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter wurde mittels folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Gesamtzellzahl}}{4} \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.3.6 Behandlung mit epigenetischen Reagenzien

Zur Analyse des Einflusses der Promotormethylierung auf die *TFF*-mRNA-Expression wurden die Retinoblastomzelllinien mit zwei verschiedenen epigenetischen Reagenzien behandelt. Zum einen mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2'-desoxycytidin (5-Aza-dC) zur Verhinderung der DNA-Methylierung und zum anderen mit 4-Phenyl-γ-aminobuttersäure (PBA) zur Hemmung der Histon-Deacetylase. Zudem wurden die Zellen simultan mit beiden Inhibitoren inkubiert.

Um konstante Bedingungen zu ermöglichen, wurden die Zellen 72 h vor Versuchsbeginn auf eine Konzentration von $0,25 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter RB-Vollmedium eingestellt. Für die Versuche wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen (RBL-15, RB 247 C3, RB 383, Weri-Rb1 und Y-79) bzw. 2×10^6 Zellen (RBL-13, RBL-30, RB 355) in Triplikaten in 6-well-Platten ausgesät und in 3 ml RB-Vollmedium bei 37 °C kultiviert. Damit die in Suspension wachsenden Zellen adhärieren, wurden die 6-well-Platten mit Poly-D-Lysin beschichtet (Kapitel 3.3.2).

Der Versuch umfasste drei verschiedene Ansätze, die in Abbildung 3.2 verdeutlicht werden. Der Kultivierungszeitraum betrug jeweils insgesamt sieben Tage, an denen täglich das Medium durch gleiches Volumen an frischem RB-Vollmedium ausgetauscht und je nach Ansatz erneut mit entsprechendem Reagenz komplementiert wurde. Die Behandlung mit 5-Aza-dC ($1\ \mu\text{M}$ final) erfolgte für insgesamt 48 h, gefolgt von einfachen Medienwechseln ohne Zusatz des Inhibitors (Abbildung 3.2 (A)). Die Behandlung mit PBA ($1\ \text{mM}$ final) erfolgte kontinuierlich über den gesamten Kultivierungszeitraum (Abbildung 3.2 (B)). Für die Doppelstudie ergab sich aus den vorherigen Ansätzen in den ersten 48 h eine Behandlung mit 5-Aza-dC und PBA simultan, gefolgt von weiteren fünf Tagen, an denen ausschließlich mit PBA nachbehandelt wurde (Abbildung 3.2 (C)).

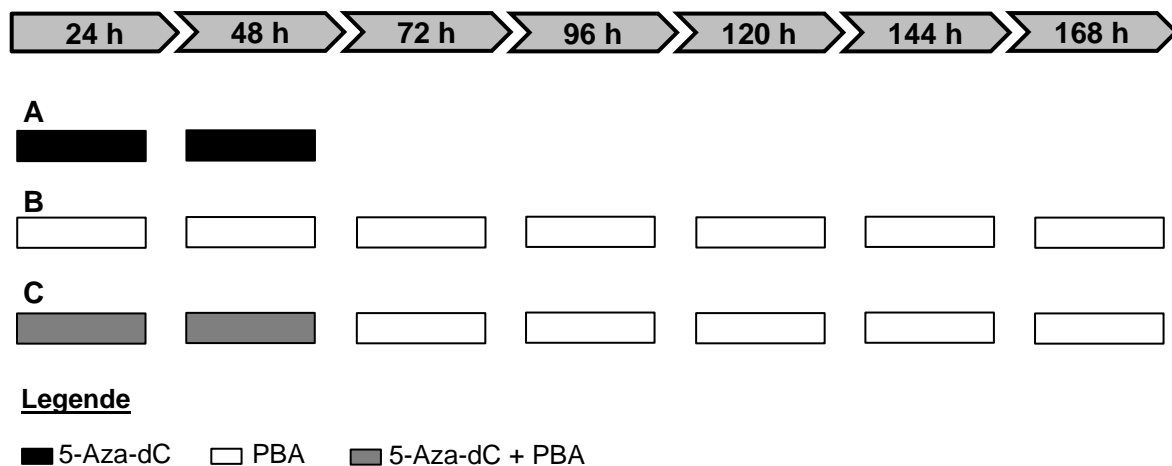


Abbildung 3.2: Stimulationsschema zur Behandlung mit epigenetischen Reagenzien

Über einen Kultivierungszeitraum von insgesamt sieben Tagen (168 h) wurden die Zellen in verschiedenen Ansätzen mit $1\ \mu\text{M}$ 5-Aza-dC (A), $1\ \text{mM}$ PBA (B) oder einer Kombination beider Reagenzien (C) behandelt. Alle 24 h wurde das Medium vollständig durch frisches Medium ausgetauscht und je nach Ansatz erneut mit dem Reagenz versetzt.

Die Konzentrationen wurden in Anlehnung an Publikationen der Forschergruppe um Vestergaard (Vestergaard *et al.* 2010) gewählt. Sowohl 5-Aza-dC als auch PBA wurden als 1.000x Stammlösung in DMSO angesetzt. Die PBA-Lösung wurde für jeden Versuch frisch angesetzt. Parallel mitgeführte Kontrollzellen wurden hinsichtlich der unterschiedlichen Bedingungen entsprechende Volumina an DMSO zugesetzt.

Nach Ablauf der Kultivierungszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1 ml warmem PBS gespült. Die Zellen wurden sowohl zur Isolation von RNA zur Analyse der Genexpression mittels quantitativer *Realtime* RT-PCR (Kapitel 3.1.6), als auch zur Präparation von genomischer DNA zur Untersuchung der Promotormethylierung nach Bisulfitkonvertierung (Kapitel 3.1.8) genutzt. Der Versuch wurde in Triplikaten angesetzt und insgesamt zweimal wiederholt.

3.3.7 Behandlung mit rekombinantem TFF3

Zur Analyse des Einflusses von exogenem TFF3 auf Y-79 Retinoblastomzellen wurden diese mit humanem rekombinanten TFF3 (13,2 kDa Homodimer; PeproTech) stimuliert. Es wurden Konzentrationen von 0,5 µg/ml - 10 µg/ml eingesetzt. Verwendet wurde ausschließlich biologisch aktives TFF3, dessen Aktivität durch seine Chemoattraktivität bei humanen MCF-7 Zellen durch den Hersteller getestet wurde. Das rekombinante TFF3 (rTFF3) wurde mit sterilem Wasser (*Aqua ad injectabilia*, B. Braun) als Stammlösung mit 1 µg/µl angesetzt.

Um konstante Versuchsbedingungen zu schaffen, wurden die Zellen 72 h vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter in RB-Minimalmedium aufgenommen. Für die Versuche selbst wurden die Zellen je nach Ansatz in 100 µl (96-*well* Format) oder nach Adhäsion auf Deckgläschen in 500 µl (24-*well* Format) RB-Minimalmedium mit 5% FBS aufgenommen und über einen Zeitraum von 24 h bis zu 72 h unter den Standardbedingungen (10% CO₂, 37 °C) im CO₂-Inkubator mit rTFF3 stimuliert. Kontrollzellen wurden mit gleichem Volumen an Lösungsmittel behandelt und parallel mitgeführt. Effekte von rTFF3 wurden sowohl mittels WST-1-Zellviabilitätsassay (Kapitel 3.4.1), als auch in Bezug auf Apoptose (Kapitel 3.4.2) und Zellproliferation (Kapitel 3.4.3) untersucht.

Zur Analyse der in den TFF3-Signalweg involvierten Moleküle mittels *Human Phospho-Kinase Array-Kit* (R&D Systems) (Kapitel 3.2.5) wurden jeweils 10×10^6 Zellen in 2 ml RB-Minimalmedium in 6-*well*-Platten ausgesät und für 15 min mit 5 µg/ml rTFF3 stimuliert.

3.3.8 Transiente Transfektion

Ziel einer transienten Transfektion ist die vorübergehende Expression eines bestimmten Gens, wozu fremde DNA mittels Plasmidtransfer in eine Zielzelle eingeschleust aber nicht in deren Genom integriert wird. In dieser Arbeit wurde diese Methode genutzt, um Y-79 Retinoblastomzellen mit transienter TFF3-Überexpression zu erzeugen.

Um für jeden Versuch gleiche Voraussetzungen zu schaffen, wurden die Zellen 72 h vor der Transfektion in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter in RB-Vollmedium ausgesät. Zur Transfektion wurden je $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung einer 6-*well*-Platte in 2 ml RB-Minimalmedium mit 5% FBS ohne Antibiotika ausgesät und für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Zur Transfektion wurde das *FuGENE*[®] *HD* Transfektionsreagenz (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. In einem Gesamtvolumen von 200 µl DMEM ohne Zusätze wurden pro Transfektion 4 µg Plasmid-DNA in einem Verhältnis von 1:4 (w/v) mit dem Transfektionsreagenz vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde das gesamte Volumen an Transfektionskomplexen zu den Zellen pipettiert, sodass eine finale Plasmid-Konzentration von 2 µg/ml vorlag.

Zur transienten Überexpression von TFF3 wurde der Expressionsvektor *pCS2+_UBQ_TFF3*, welcher TFF3 unter dem Ubiquitin-C-Promotor exprimiert, verwendet (Kapitel 3.1.11.1). Als Negativkontrolle diente der leere Expressionsvektor *pCS2+_UBQ*. Die Transfektionseffizienz wurde in jedem Versuch durch einen parallel mitgeführten Transfektionsansatz mit dem GFP-exprimierenden Plasmid *pCS2+_GFP* mittels Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert. Zusätzlich wurde die TFF3-Expression auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen. Zur funktionellen Analyse wurden die transient TFF3-exprimierenden Y-79 Retinoblastomzellen im Zelltodassay (Kapitel 3.4.2) und Proliferationsassay (Kapitel 3.4.3) eingesetzt. Die Zellen wurden zudem für die Immunfluoreszenzfärbung (IF) zur intrazellulären Lokalisation von TFF3 (Kapitel 3.2.6) verwendet.

3.3.9 Lentivirale Transduktion

Anders als bei der transienten Transfektion kann durch lentivirale Transduktion eine dauerhafte Expression eines gewünschten Gens ermöglicht werden. In einem ersten Schritt werden Wirtszellen gleichzeitig mit viralen Verpackungsplasmiden und einem

Expressionsplasmid mit der Zielsequenz des zu exprimierenden Gens transfiziert, um virale Partikel zu produzieren. Diese werden dann in einem darauf folgenden Schritt zu den Zielzellen gegeben und durch Transduktion integriert die fremd-DNA in das Genom der Zielzellen. Diese Methode wurde zur stabilen GFP- sowie TFF3-Expression in Y-79 Retinoblastomzellen verwendet, um langfristige Auswirkungen von überexprimiertem TFF3 auf die Zellen zu analysieren.

Zur Erzeugung viraler Partikel wurden 6×10^6 HEK293T Zellen in 10 ml HEK293T-Vollmedium in Zellkulturschalen ausgesät und nach 24 h transfiziert. Zur Transfektion wurde eine 1 mg/ml Polyethylenimin (PEI)-Stammlösung in doppelt destilliertem Wasser angesetzt, von der 45 μ l mit 955 μ l DMEM vermischt wurden (Transfektionslösung). Pro Transfektionsansatz wurde ein Plasmid-DNA-Mix bestehend aus je 6 μ g der lentiviralen Verpackungsplasmide *pczVSV-G* und *pCD/NL-BH* (Hartmann *et al.* 2010) sowie 6 μ g des Expressionsplasmids mit der gewünschten Zielsequenz hergestellt. Die insgesamt 18 μ g Plasmid-DNA eines Ansatzes wurden in 1.000 μ l Gesamtvolumen DMEM ohne Zusätze aufgenommen, in einem Verhältnis von 1:1 mit der Transfektionslösung vermischt und für 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das kationische Polymer PEI bildet dabei Komplexe mit den negativ geladenen Nukleinsäuren, schützt diese vor Abbau und ermöglicht die Passage durch die Zellmembran im nächsten Schritt (Boussif *et al.* 1995). Nach Ablauf der Inkubation wurde das Vollmedium der HEK293T Zellen durch 4 ml frisches DMEM mit 15% FBS ersetzt und mit 2 ml der PEI/DNA-Lösung komplementiert. Nach 24 h wurde das Medium durch 10 ml Iscove's modified Dulbecco's Medium (IMDM) mit 10% FBS und 1% Penicillin-Streptomycin ersetzt. Die Mediumüberstände mit den viralen Partikeln (Virusüberstand) wurden 48 h nach der Transfektion durch Sterilfilter (0,45 μ m Porengröße) gefiltert und bis zur Transduktion bei -80°C kryokonserviert.

In diesem Ansatz wurde neben dem Expressionsplasmid *pCL7EGwo* zur stabilen GFP-Markierung auch der zur TFF3-Überexpression erstellte *pLenti CMV_TFF3* Vektor (Kapitel 3.1.11.2) sowie der als Negativkontrolle dienende Expressionsvektor *pPRIME-CMV-Neo-FF3* (Stegmeier *et al.* 2005), der für eine Luciferase mikro RNA kodiert, zur Herstellung viraler Partikel verwendet.

Für die lentivirale Transduktion wurden die Y-79 Zellen in einer Konzentration von 6×10^5 Zellen pro Milliliter Virusüberstand zunächst für 24 h in RB-Vollmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und

in entsprechendem Volumen Virusüberstand mit 5 µg/ml Hexadimethrinbromid (Polybren, in 0,9% NaCl) resuspendiert. Nach 24 h wurde das doppelte Volumen RB-Vollmedium zugegeben und nach weiteren 48 h wurde das Medium komplett ausgetauscht.

Insgesamt sechs Tage nach der Transduktion wurde die Transduktionseffizienz und die erzielte TFF3-Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen durch Fluoreszenzmikroskopie (GFP-Markierung) bzw. quantitative *Realtime* RT-PCR (TFF3-Überexpression) bestimmt. Weiter wurde das Verhalten der Y-79 Retinoblastomzellen mit stabiler TFF3-Überexpression hinsichtlich Veränderungen in Viabilität (Kapitel 3.4.1), Apoptose (Kapitel 3.4.2) und Zellproliferation (Kapitel 3.4.3) analysiert. Zudem wurde die Wachstumsrate der Zellen bestimmt (Kapitel 3.4.4) und ein Soft-Agarose-Assay (Kapitel 3.4.5) durchgeführt.

3.3.10 Caspase-Inhibition

Zur Prüfung auf Caspase-abhängige Apoptoseinduktion wurde die Caspase-Aktivität mit dem allgemeinen Caspase-Inhibitor Boc-D-Fmk (Calbiochem) inhibiert. Für diesen Ansatz wurden Y-79 Retinoblastomzellen mit stabiler TFF3-Überexpression (Kapitel 3.3.9) und entsprechende Kontrollzellen verwendet, die wie unter 3.3.2 beschrieben auf Poly-D-Lysin-beschichteten Deckgläschen ausgesät und für weitere 24 h mit Zusatz von 50 µM Boc-D-FMK (1.000x stock in DMSO) kultiviert wurden. Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte mittels DAPI-Färbung (Kapitel 3.4.2). Zur Kontrolle wurde parallel ein regulärer DAPI-Ansatz ohne Boc-D-Fmk mitgeführt.

3.4 Funktionelle *in vitro* Analysen

3.4.1 WST-1-Viabilitätsassay

Der WST-1-Viabilitätsassay ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Zellviabilität. Sie basiert auf der enzymatischen Aktivität zellulärer, mitochondrialer Dehydrogenasen intakter, viabler Zellen, welche die Spaltung des Tetrazoliums Salzes WST-1 in Formazan katalysieren (Roehm *et al.* 1991). Diese Reaktion resultiert in einem Farbumschlag, der photometrisch messbar ist. Die Menge gebildeten Formazans ist direkt proportional zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen in der Probe.

Der Assay wurde im 96-*well*-Format durchgeführt, wofür je 4×10^4 Zellen in 100 μl RB-Minimalmedium mit 5% FBS pro Vertiefung in Triplikaten ausgesät wurden. Nach Ablauf der Kultivierungszeit, die je nach Ansatz 48 h bis 72 h betrug, wurden je 10 μl der WST-1-Gebrauchslösung zugegeben, gemischt und die Zellen für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die WST-1-Gebrauchslösung setzt sich aus einem Teil 1-Methoxy-PMS-Stammlösung (2,0 mM in ddH₂O) und neun Teilen WST-1-Stammlösung (5,5 mM in PBS) zusammen. Die Quantifizierung erfolgte mittels Spektralphotometer (*Epoch Reader*, BioTek®) durch Messung der maximalen Absorption der Zellsuspension bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm.

3.4.2 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Zelltodassay

Zur fluoreszenzmikroskopischen Detektion von Apoptose wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. DAPI lagert sich an die DNA an und wird zur Sichtbarmachung des Chromatins genutzt. Apoptotische Zellen lassen sich durch eine kompakte Chromatinform, kondensierte Zellkerne oder durch bereits abgeschnürte Vesikel (*apoptotic bodies*) als solche identifizieren. Für die DAPI-Färbung wurden die entsprechenden Zellen wie unter 3.3.2 auf Deckgläschen ausgesät, fixiert und mit Immunfluoreszenz-Eindeckmedium (DAKO) mit 2 $\mu\text{g/ml}$ DAPI eingedeckt. Abbildung 3.3 zeigt ein Beispiel einer fluoreszenzmikroskopischen DAPI-Auswertung.

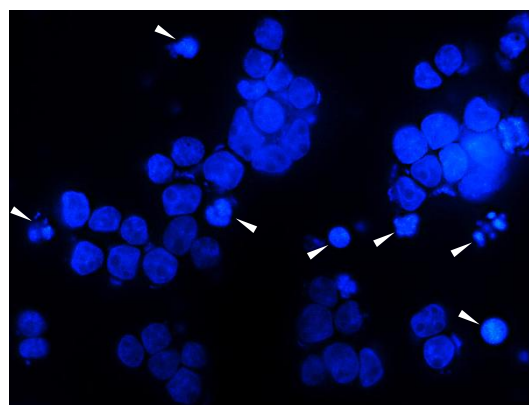


Abbildung 3.3: Beispiel eines 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Zelltodassays

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei einer 600x Vergrößerung. Die Pfeilspitzen markieren apoptotische Zellen mit kondensierten Zellkernen oder *apoptotic bodies*.

In jedem Experiment wurden mindestens drei bis sechs Deckgläschen ausgewertet und mindestens 1.000 Zellen pro Deckgläschen in 10 Gesichtsfeldern gezählt, um einen repräsentativen Anteil apoptotischer Zellen zu berechnen.

3.4.3 5-Bromo-2'-desoxyuridin-Zellproliferationsassay

Die Zellproliferation wurde mittels 5-Bromo-2'-desoxyuridin(BrdU)-Interkalierung bestimmt. Bei dieser Methode wird BrdU als Thymidin-Analogon während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA von proliferierenden Zellen eingebaut. Zur Detektion und Quantifizierung des interkalierten BrdUs wurde ein spezifischer Primärantikörper eingesetzt, der über einen fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper nachweisbar ist.

Bevor die Zellen wie unter 3.3.2 beschrieben auf Deckgläschen ausgesät und fixiert wurden, wurden diese für 4 h mit 10 μ M BrdU kultiviert. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen für 30 min mit 1% Triton™ X-100 in PBS inkubiert. Durch die anschließende Inkubation mit 2 M Salzsäure für 60 min bei 37 °C wurde die DNA denaturiert, damit diese nachfolgend für den BrdU-spezifischen Antikörper zugänglich ist. Zur Neutralisation der Salzsäure wurden die fixierten Zellen für 15 min in Borsäure/Natriumboratpuffer inkubiert (Tabelle 3.16).

Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, bevor freie Bindestellen für 60 min bei Raumtemperatur mit Block-Puffer (Tabelle 3.16) abgesättigt wurden. Die Inkubation des Primärantikörpers gegen BrdU (1:1.000 in PBS mit 4% BSA, 1% NGS und 0,1% Triton™ X-100) erfolgte über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer. Anschließend wurden überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und es erfolgte die Inkubation eines fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers (1:1.000 in PBS) für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Abschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit Immunfluoreszenz-Eindeckmedium (DAKO) auf Objektträgern eingedeckt. Zur Auswertung wurden BrdU-positive Zellen ausgezählt und wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben mindestens drei bis sechs Deckgläschen ausgewertet. In ist ein Beispiel einer fluoreszenzmikroskopischen BrdU-Auswertung dargestellt.

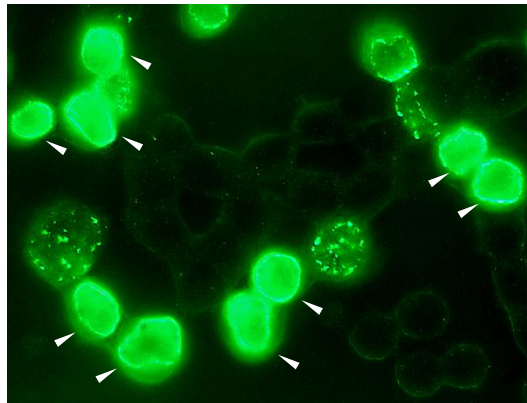


Abbildung 3.4: Beispiel eines 5-Bromo-2'-desoxyuridin-Zellproliferationsassays

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei einer 1.000x Vergrößerung. Die Pfeilspitzen markieren BrdU-positive, proliferierende Zellen.

Tabelle 3.16: Zusammensetzung des Borsäure/Natriumboratpuffers

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|------------------------------------|--|
| Borsäure/Natriumboratpuffer pH 8,9 | 50 ml 0,2 M Borsäure 42,5 ml 0,05 M Dinatriumtetraborat ad 200 ml ddH ₂ O |

3.4.4 Wachstumskinetik

Zur Ermittlung der Wachstumsrate wurden 3×10^5 Y-79 Retinoblastomzellen mit stabiler TFF3-Überexpression sowie die entsprechenden Kontrollzellen in je 500 μ l RB-Vollmedium pro Vertiefung einer 24-well-Platte in Triplikaten ausgesät. Die vitalen Zellen wurden nach Trypanblau-Färbung alle 24 h über einen Zeitraum von acht Tagen mittels Neubauer-Zählkammer gezählt (Kapitel 3.3.5).

3.4.5 Soft-Agarose-Assay

Der Soft-Agarose-Assay testet Zellen auf kontaktunabhängiges Wachstum und basiert auf der Tatsache, dass immortalisierte Zellen und Tumorzellen fähig sind, Zellkolonien in der Soft-Agarose auszubilden und weiter zu wachsen (Neugut und Weinstein 1979). Er wurde eingesetzt, um das kontaktunabhängige Wachstum von TFF3-überexprimierenden Y-79 Retinoblastomzellen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen zu analysieren.

Zur Vorbereitung wurde 2x-konzentriertes DMEM/F12-Medium angesetzt, steril filtriert und mit Zellkulturkomponenten supplementiert. Zur Herstellung der zwei verschiedenen konzentrierten Agaroseschichten wurde das angesetzte DMEM/F12 Medium mit Zusätzen 1:1 bei einer Temperatur von 37 °C mit autoklavierter 1%- oder 0,7%-Agarose vermischt. Als untere Agaroseschicht wurden zuerst pro Vertiefung einer 6-well-Platte 2 ml der 0,5%-Basis-Agarose zum Aushärten pipettiert. Anschließend wurden je 5×10^3 Zellen mit 2 ml 0,35%-Soft-Agarose vermischt und auf dem gehärteten Basis-Agar verteilt. Ausgehend von Einzelzellen erfolgte die Kultivierung über einen Zeitraum von drei Wochen unter Standard-Inkubationsbedingungen (37 °C, 10% CO₂). Zweimal pro Woche wurde frisches RB-Vollmedium aufgetropft, um die Zellen zu ernähren.

Die Koloniebildungseffizienz wurde nach Ablauf der Inkubationszeit durch manuelles Zählen von Einzelzellen und Zellaggregaten in fünf Gesichtsfeldern mit einem 20x-Objektiv quantifiziert. Die Summe aller gezählten Zellen (einzeln und in Aggregaten) wurde ermittelt und mit der Anzahl gebildeter Zellaggregate korreliert. Es wurden jeweils Triplikate ausgesät und ausgewertet. Neben der Anzahl wurde auch die Größe gebildeter Kolonien dokumentiert.

Tabelle 3.17: Zusammensetzung der Medien und Agaroseschichten des Soft-Agarose-Assays

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|---|--|
| 2x-DMEM/F12-Medium, steril filtriert | 1 g DMEM/F12 Pulver 0,4 g NaHCO ₃ ad 50 ml ddH ₂ O |
| 2x-DMEM/F12-Medium mit Zusätzen, steril filtriert | 19,5 ml 2x-DMEM/F12-Medium 5 ml FBS 0,5 ml Penicillin-Streptomycin 50 µl Insulin 50 µl 2-Mercaptoethanol |
| Basis-Agarose, 0,5% | 2x-fertiges DMEM/F12-Medium 1%-Agarose in ddH ₂ O |
| Soft-Agarose, 0,35% | 2x-fertiges DMEM/F12-Medium 0,7%-Agarose in ddH ₂ O |

3.5 Statistik

Statistische Analysen erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, USA). Die Auswertung der Daten erfolgte über einen zweiseitig angelegten gepaarten (quantitative *Realtime* RT-PCRs, WST-1-Viabilitätsassays und Soft-Agarose-Assays) oder ungepaarten (DAPI- und BrdU-Färbungen) Studentischen t-Test. Die Auswertung von mehr als zwei Daten-Sets (Caspase-Inhibition) erfolgte mittels *One-Way-ANOVA* und Newman-Keuls Test. Die statistisch signifikante Fehlerwahrscheinlichkeit wurde mit $p \leq 0,05$ definiert. Die statistische Evaluierung der Wachstumskurven erfolgte mittels Permutations-Test (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/compareCurves/> Stand: März 2015).

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist entsprechend der Zielsetzung in zwei Abschnitte untergliedert. Der erste Teil befasst sich mit der Regulation der *TFF*-Genexpression in verschiedenen Retinoblastomzelllinien. Die Behandlung der Zellen mit zwei unterschiedlichen epigenetischen Reagenzien sollte erste Hinweise geben, ob die *TFF*-Expression im Retinoblastom epigenetisch reguliert wird. Im zweiten Abschnitt wird die funktionelle Bedeutung von TFF3 in der Retinoblastomzelllinie Y-79 behandelt. Durch verschiedene *in vitro* Analysen sollten die Eigenschaften von TFF3 charakterisiert werden.

4.1 Regulation der *TFF*-Genexpression in Retinoblastomzelllinien

4.1.1 Endogene *TFF*-Expression

Vor Aufklärung der Regulationsmechanismen der endogenen *TFF*-Expression in Retinoblastomzellen wurde zunächst das Expressionsprofil aller drei *TFF*-Gene in humaner Retina und acht verschiedenen Retinoblastomzelllinien erstellt. Die Analyse erfolgte sowohl mittels RT-PCR als auch quantitativer *Realtime* RT-PCR. Zum Nachweis der Spezifität der verwendeten *TFF*-RT-PCR-Oligonukleotidprimer wurde humanes Duodenum eingesetzt, da vorangegangene Studien anderer Arbeitsgruppen Duodenum als eine geeignete Positivkontrolle für den Nachweis aller drei *TFF*-Gene etabliert haben (Podolsky *et al.* 1993; Paulsen *et al.* 2005).

Die Expression aller drei *TFF*-Gene war im humanen Duodenum mit den eingesetzten RT-PCR-Oligonukleotidprimern mit der erwarteten Amplifikatgröße nachweisbar (Abbildung 4.1). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde für alle weiteren Analysen in diesem Teil humanes Duodenum als Positivkontrolle verwendet.

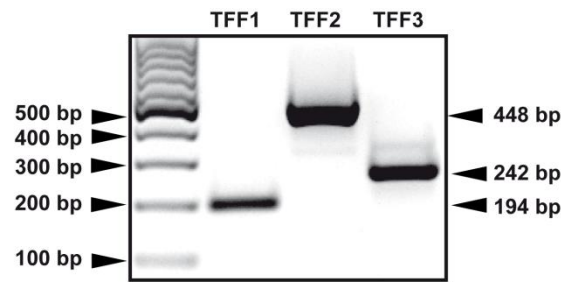


Abbildung 4.1: Nachweis der TFF-RT-PCR-Oligonukleotidprimer-Spezifität an Duodenum

Die Größen der zu erwarteten TFF-Amplifikate sind auf der rechten Seite wiedergegeben. Als Größenstandard diente ein 100 bp Molekularmarker. Kontaminationen und unspezifische Bindungen wurden durch eine Negativkontrolle (Nuklease-freies Wasser) ausgeschlossen. Abbildung entnommen aus (Philippeit *et al.* 2014).

Bei der quantitativen Analyse mittels *Realtime* RT-PCR wurde das ubiquitär in allen humanen Zellen vorkommende Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als *housekeeping*-Gen verwendet. Die Auswertung der endogenen *TFF*-Expression in humaner Retina, acht Retinoblastomzelllinien und humanem Duodenum ist in Abbildung 4.2 zusammengefasst.

Es war eine eindeutige Varianz in der Expressionsstärke der drei *TFF*-Gene in der humanen Retina zu erkennen. Dabei war die Expression von *TFF1* sehr niedrig, während *TFF3* deutlich exprimiert wurde. Im direkten Vergleich mit den verschiedenen Retinoblastomzelllinien fiel auf, dass die Stärke der *TFF*-Expression in diesen genau gegensätzlich zur Expression in der Retinaprobe war. So war die Expression von *TFF1* im Vergleich zu der humanen Retina in fast allen Retinoblastomzelllinien (außer RB 355 und Y-79) deutlich, in RBL-13, RB 383 und WERI-Rb-1 sogar signifikant erhöht. Der Nachweis der *TFF1*-Expression in den verschiedenen Retinoblastomzelllinien wurde bereits durch Western-Blot-Analysen in einer vorherigen Publikation unserer Arbeitsgruppe bestätigt (Weise und Dünker 2013). Im Gegensatz zur deutlichen *TFF1*-Expression war die mRNA-Expression von *TFF3* in den Retinoblastomzelllinien im Vergleich zur humanen Retina signifikant geringer. *TFF2* war weder in der humanen Retina noch in den analysierten Retinoblastomzelllinien nachweisbar.

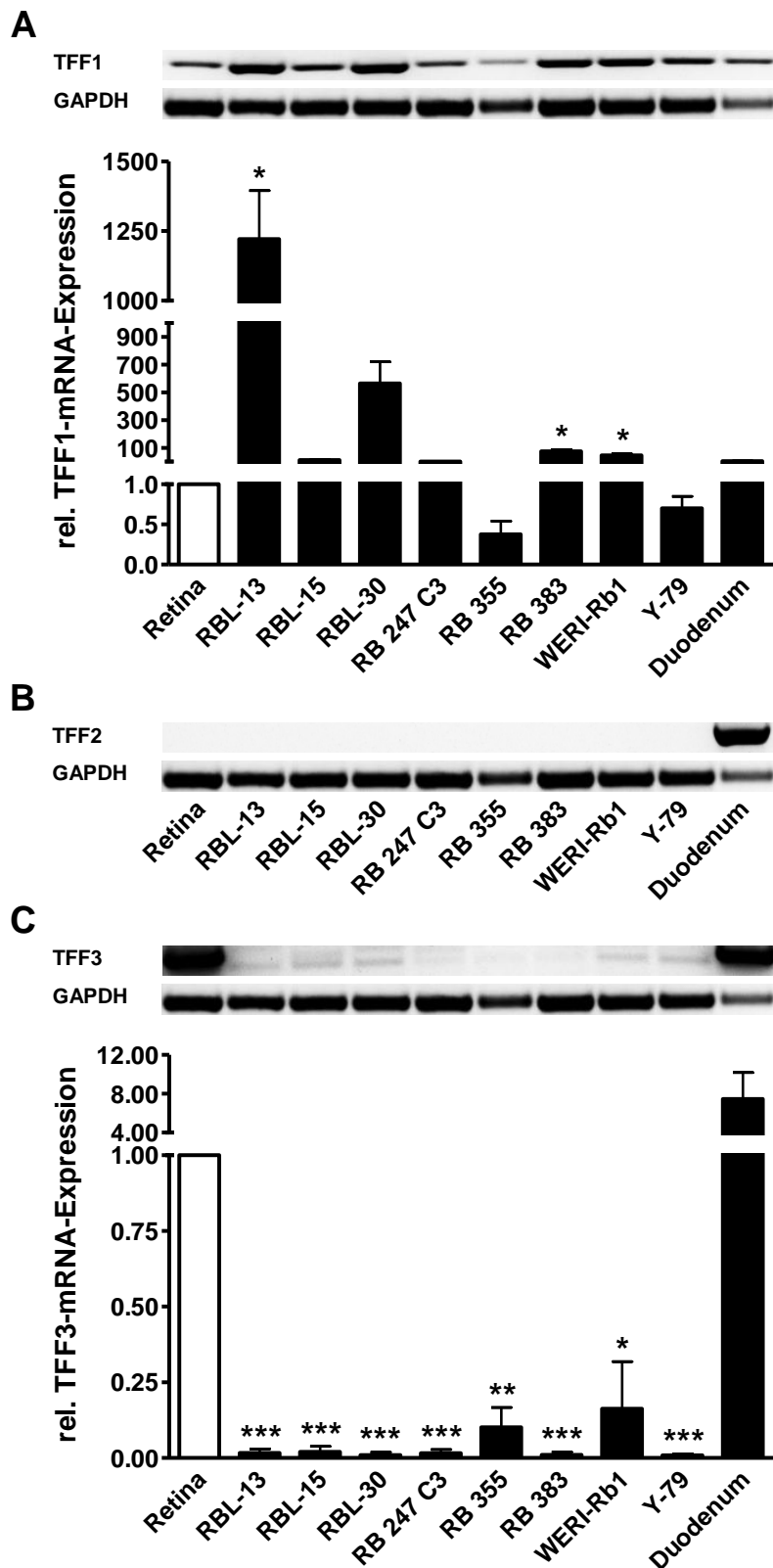


Abbildung 4.2: Endogene *TFF*-Expression in Retina, Retinoblastomzelllinien und Duodenum

Darstellung der endogenen *TFF1*- (A), *TFF2*- (B) und *TFF3*- (C) Expression nach Analyse mittels RT-PCR und quantitativer *Realtime* RT-PCR. Zur Prüfung der cDNA-Integrität (RT-PCR) und als interne Kontrolle (quantitative *Realtime* RT-PCR) wurde die Expression von *GAPDH* herangezogen. Humane Retina diente als Referenz und wurde gleich 1 gesetzt. Repräsentative Darstellung einzelner 2%-Agarosegele. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM drei unabhängiger RNA Analysen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,005$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur humanen Retina. Abbildung modifiziert nach (Philippeit *et al.* 2014).

4.1.2 Promotoranalysen

Veränderungen der Genexpression, wie für den Vergleich zwischen der humanen Retina und pathologisch veränderten Retinoblastomzellen im vorherigen Abschnitt beschrieben, können durch ein verändertes Methylierungsmuster der genspezifischen Promotorregion hervorgerufen werden. Es ist bereits bekannt, dass alle drei bekannten *TFF*-Gene in ihrer Promotorregion mehrere CpG-Dinukleotide aufweisen und aktuelle Studien geben erste Hinweise, dass epigenetische Mechanismen an der Regulation der *TFF*-Genexpression beteiligt sind (Vestergaard *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2012; Feng *et al.* 2014).

Um zu prüfen, ob den unterschiedlichen *TFF*-Expressionsmustern in den Retinoblastomzelllinien auch epigenetische Mechanismen zugrunde liegen, wurde die Methylierung der Promotorregion aller drei *TFF*-Gene analysiert. Um eine nachweisbare, methylierungsspezifische Modifikation der genomischen DNA zu erzeugen, wurde die in Kapitel 3.1.8 beschriebene Methode der Bisulfitkonvertierung verwendet.

Zur Identifikation methylierter Cytosinreste wurde die Bisulfit-behandelte Promotorregion der DNA von fünf individuellen Bakterienklonen sequenziert und mit der Sequenz der nativen Promotorregion verglichen. Zur Validierung der Ergebnisse wurde zudem die Cytosin-Konvertierungsrate bestimmt. Dazu wurden alle Cytosine, die in keinem CpG-Kontext auftauchten, gezählt und mit der Gesamtzahl an Cytosinen der analysierten Promotorregion in Relation gesetzt.

In Anlehnung an Studien der Gruppe von Vestergaard (Vestergaard *et al.* 2010), welche bereits die *TFF*-Promotormethylierung in Prostatakarzinomzelllinien analysiert hat, wurden insgesamt 13 CpG-Dinukleotide in der *TFF1*-Promotorregion, 16 CpG-Dinukleotide in der *TFF2*-Promotorregion und 8 CpG-Dinukleotide in der *TFF3*-Promotorregion bezüglich ihres Methylierungsstatus untersucht. Eine schematische Darstellung der Promotorregion aller drei *TFF*-Gene mit allen analysierten CpG-Dinukleotiden ist in Abbildung 4.3 wiedergegeben.

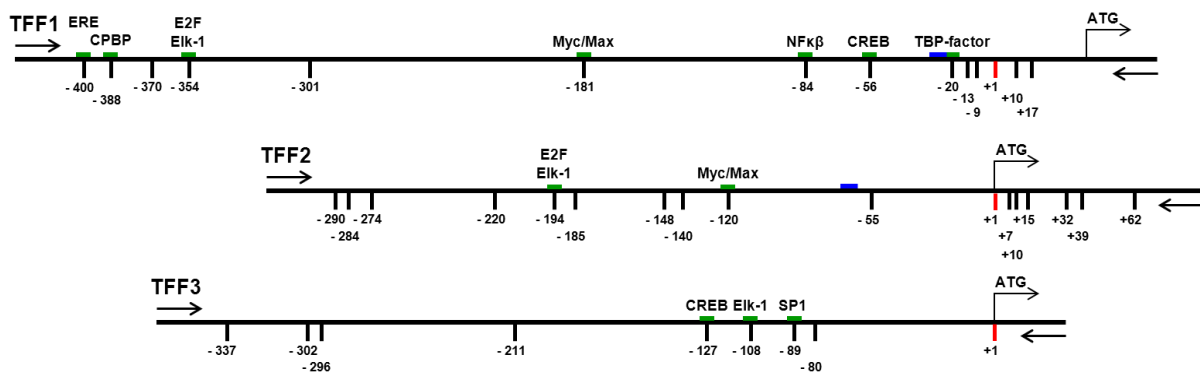


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der *TFF*-Promotorregionen

Maßstabsgetreue Darstellung der *TFF1*-, *TFF2*- und *TFF3*-Promotorregion modifiziert nach (Vestergaard *et al.* 2010). Die flankierenden Pfeile (\rightarrow , \leftarrow) geben die Bindungsstellen der eingesetzten Oligonukleotide wieder. Alle analysierten mit dem jeweiligen Promotor-assoziierten CpG-Dinukleotide sind durch vertikale Balken (I) dargestellt. Angegeben sind die Nukleotidpositionen relativ zur Translationsstartstelle (ATG, +1) und im Fall von *TFF1* entsprechend der Angabe in Jeltsch *et al.* (Jeltsch *et al.* 1987). Blaue Horizontalbalken (-) oberhalb der Sequenz repräsentieren die TATAA Box (Beck *et al.* 1999). Potenzielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, in grün dargestellt, wurden mittels *MatInspector 2.6 Software* (Cartharius *et al.* 2005) ermittelt. Abbildung entnommen aus (Philippeit *et al.* 2014).

Neben den acht verschiedenen Retinoblastomzelllinien wurde als Referenz die Promotorregion eines humanen Retinapools (vier Proben verschiedener Spender) und als Positivkontrolle ein humaner Duodenumpool (ebenfalls vier verschiedene Proben) hinsichtlich ihres Methylierungszustandes analysiert.

Die ermittelte Cytosin-Konvertierungsrate der einzelnen Proben lag in einem Bereich zwischen 96% und 100%. Der Methylierungsstatus der Promotor-assoziierten CpG-Dinukleotide (Abbildung 4.4) und die Gesamtmethylierung der Promotorregion (Tabelle 4.1) deuten auf eine Korrelation von *TFF*-Promotormethylierung und endogener *TFF*-Genexpression hin. In der *TFF1*-Promotorregion der humanen Retina mit geringer endogener *TFF1*-Expression waren fast alle analysierten CpGs methyliert (60-100%). Auch bei den Retinoblastomzelllinien RB 355 und Y-79, die endogen nur wenig *TFF1* exprimieren (Abbildung 4.2), waren die zugehörigen Promotorregionen von hoher Methylierung der einzelnen CpG-Dinukleotide gekennzeichnet. Im Vergleich dazu waren in denjenigen Retinoblastomzelllinien mit hoher oder mäßiger endogener *TFF1*-Expression (Abbildung 4.2) alle CpGs vollständig (RBL-13, RBL-30) oder zumindest deutlich demethyliert bis zu einer Gesamtmethylierung $\leq 23\%$ (RBL-15, RB 383 und WERI-Rb1). Die Retinoblastomzelllinie RB 247 C4 stellte mit deutlicher *TFF1*-Expression und einem Methylierungsstatus ähnlich dem von RB 355 oder Y-79 eine Ausnahme dar.

Das Methylierungsmuster der *TFF2*-Promotorregion variierte nur geringfügig zwischen der humanen Retina und den analysierten Retinoblastomzelllinien. Insgesamt wiesen alle Retinoblastomzelllinien einen hohen Methylierungslevel aller 16 analysierten CpGs auf. Dies korreliert wiederum mit der fehlenden endogenen *TFF2*-Expression (Abbildung 4.2). Obwohl die Retinoblastomzelllinien RBL-15 und RB 355 eine insgesamt niedrigere Promotormethylierung von 81% bzw. 65% aufwiesen und so eine Ähnlichkeit mit dem Methylierungsstatus der Promotorregion des humanen Duodenums mit deutlicher endogener *TFF2*-Expression besitzen, war keine *TFF2*-mRNA nachweisbar.

In der *TFF3*-Promotorregion der humanen Retina waren mit Ausnahme des CpGs an Position -127 alle CpGs vollständig methyliert. In der als Referenz genutzten humanen Duodenumprobe mit hoher endogener *TFF3*-Expression wiesen alle CpGs eine Demethylierung von mindestens 20% auf, sodass sich eine Gesamtpromotormethylierung von 58% ergab. Im Gegensatz dazu zeigten alle Retinoblastomzelllinien mit geringer endogener *TFF3*-Expression, bis auf RBL-30, RB 355 und RB 383, eine erhöhte Methylierung.

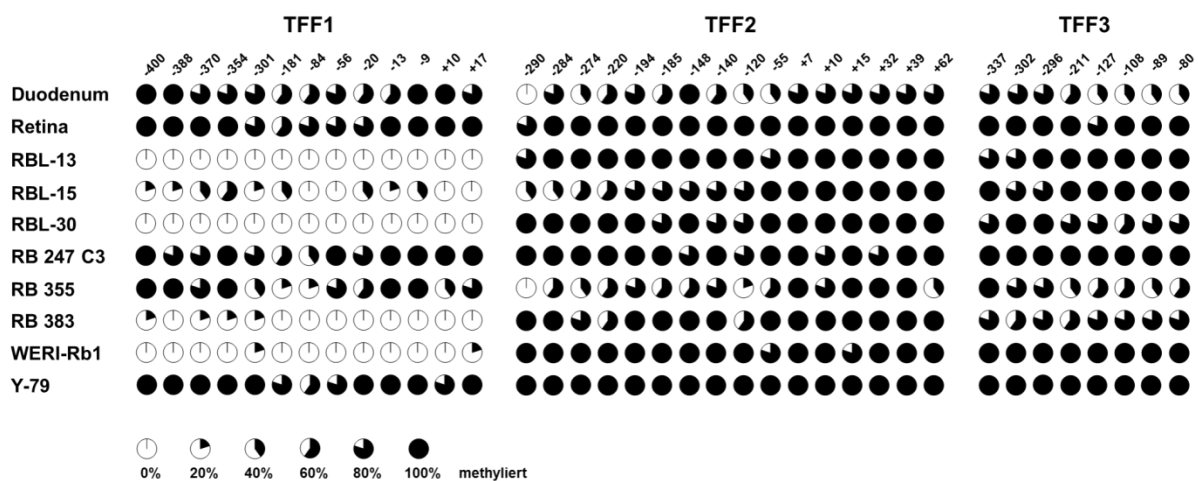


Abbildung 4.4: Nativer Methylierungsstatus der *TFF*-Promotor-assoziierten CpG-Dinukleotide

Darstellung der Methylierungsmittelwerte einzelner CpG-Dinukleotide der drei *TFF*-Promotorregionen in Duodenum, Retina und acht Retinoblastomzelllinien nach Bisulfitkonvertierung und Sequenzanalyse. Jeder Kreis repräsentiert analog zu Abbildung 4.3 ein analysiertes CpG-Dinukleotid der jeweiligen Promotorregion. Der Mittelwert basiert auf der Sequenzanalyse fünf individueller Bakterienklone. Abbildung modifiziert nach (Philippeit *et al.* 2014).

Tabelle 4.1: Gesamtmethylierung der nativen *TFF1*-, *TFF2*- und *TFF3*-Promotorregion

Über alle analysierten CpG-Dinukleotide gemittelte Gesamtmethylierung der drei *TFF*-Promotorregionen in Duodenum, Retina und acht Retinoblastomzelllinien. Tabelle modifiziert nach (Philippeit *et al.* 2014).

| Probe | Methylierung der TFF-Promotorregionen [%] | | |
|-----------|---|------|------|
| | TFF1 | TFF2 | TFF3 |
| Duodenum | 80 | 65 | 58 |
| Retina | 91 | 99 | 98 |
| RBL-13 | 0 | 98 | 95 |
| RBL-15 | 23 | 81 | 95 |
| RBL-30 | 0 | 96 | 83 |
| RB 247 C3 | 86 | 95 | 100 |
| RB 355 | 71 | 65 | 65 |
| RB 383 | 6 | 94 | 75 |
| WERI-Rb1 | 3 | 98 | 100 |
| Y-79 | 92 | 100 | 100 |

Für Promotoren ohne klassische CpG-Inseln können schon geringfügige Unterschiede in der Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide deutliche Auswirkungen auf die Genexpression haben (Gardiner-Garden und Frommer 1987; Bird 2002). Um die Relevanz einzelner CpG-Dinukleotide besser beurteilen zu können, wurde gezielt nach Unterschieden ihres Methylierungsgrades in Promotorregionen von Proben mit niedriger und hoher *TFF*-Expression gesucht.

Sowohl für *TFF1* als auch *TFF3* scheint ein direkter Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad einzelner CpG-Dinukleotide in der jeweiligen Promotorregion und der korrespondierenden *TFF*-Expressionsstärke zu bestehen. Bei dem CpG-Dinukleotid an Position -354 in der *TFF1*-Promotorregion korreliert eine Methylierung größer als 60% mit einer erniedrigten *TFF1*-Expression in humanem Duodenum, humaner Retina sowie den Retinoblastomzelllinien RB 247 C3, RB 355 und Y-79. Eine mögliche Korrelation zur *TFF1*-Expression besteht zudem zwischen dem Methylierungsstatus der CpG-Dinukleotide an Position -181 und -84. Bei Retinoblastomzelllinien mit deutlicher endogener *TFF1*-Expression, wie bei RBL-13 und RBL-30, sind diese Bereiche vollständig demethyliert, während eine Methylierung von 20% bereits zu einer deutlichen Reduktion der *TFF1*-Expression führt.

In der *TFF3*-Promotorregion besteht ein potenzieller Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus des CpG-Dinukleotids an Position -127 und den *TFF3*-Expressionsleveln. Diese Position ist in der Promotorregion der humanen Retinaprobe das einzige demethylierte CpG-Dinukleotid und eines der deutlich demethylierten CpG-Dinukleotide der humanen Duodenumprobe. Beide Gewebeproben zeigten im Gegensatz zu den verschiedenen Retinoblastomzelllinien eine starke endogene *TFF3*-Expression.

Ein wichtiger Faktor bei der methylierungsbedingten Reduktion der Genexpression ist mitunter die verminderte Bindung von Transkriptionsfaktoren (TF) in der Promotorregion. In Abbildung 4.3 und Tabelle 4.2 sind alle Transkriptionsfaktoren angegeben, die potenziell in den *TFF*-Promotorregionen binden können und eines der analysierten CpG-Dinukleotide in ihrer Erkennungssequenz beinhalten. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der *MatInspector 2.6 Software* (Cartharius et al. 2005).

Auch die CpG-Dinukleotide mit potenzieller Korrelation zur *TFF*-Expression liegen innerhalb möglicher Bindestellen verschiedener Transkriptionsfaktoren. In der *TFF1*-Promotorregion sind dies die CpG-Dinukleotide, die in den Bindestellen für das *E26-transformation-specific-like-gene-1* (Elk-1) und *E2F-myc activator / cell cycle regulator* an Position -354, sowie der Erkennungssequenz des *E-box binding factors* Myc/Max bzw. *nuclear factor kappa beta* (NF- κ B) an Positionen -181 und -84 liegen. Das CpG-Dinukleotid an Position -127 in der *TFF3*-Promotorregion, welches ebenfalls Einfluss auf die Expression zu haben scheint, überlappt zudem mit der Bindestelle des *cAMP-responsive element binding protein* (CREB).

Tabelle 4.2: Transkriptionsfaktoren der TFF-Promotorregionen

Angabe der Transkriptionsfaktoren mit ihrer Erkennungssequenz in der jeweiligen TFF-Promotorregion. Das in der Erkennungssequenz liegende CpG-Dinukleotid ist in grüner Farbe gekennzeichnet und die Position ist in der Spalte ganz rechts angegeben. Die Hauptbindestelle der TF ist fett gedruckt. Die Bindestellen wurden virtuell mit der *MatInspector 2.6 Software* (Cartharius *et al.* 2005) ermittelt.

| Transkriptionsfaktor | Erkennungssequenz (5' → 3') | CpG |
|---|---|------|
| TFF1-Promotorregion | | |
| ERE <i>estrogen response element</i> | CTGCA AGGT CA CGGT GGCCACCC | -400 |
| CPBP <i>core promoter-binding protein</i> | GGTCACGGTGG CCACCC CGTGAG | -388 |
| Elk-1 <i>E26-transformation-specific-like gene 1</i> | AGATGGCC CGAAA AAAGGCTTG | -354 |
| E2F* <i>E2F-myc activator / cell cycle regulator</i> | AGATGGCC CGAAA AAGG | -354 |
| Myc/Max* <i>E-box binding factor</i> | TCACCAC CATGTCG | -181 |
| NF-κβ* <i>nuclear factor kappa beta</i> | CAG AGGA TCCC CGGG | -84 |
| CREB* <i>cAMP-responsive element binding protein</i> | CAAATGTTAT CTAAC CGCTCTT | -56 |
| TBP-factor <i>TATA binding protein factor</i> | CCCTA TAAA ATCCGGGG | -20 |
| TFF2-Promotorregion | | |
| E2F* <i>E2F-myc activator / cell cycle regulator</i> | CCCTG GCC CGGAAGCCT | -194 |
| Elk-1 <i>E26-transformation-specific-like gene 1</i> | CCTGGCC CGAA GCCTCGCCT | -194 |
| Myc/Max* <i>E-box binding factor</i> | GGGCCA CGGG GCA | -120 |
| TFF3-Promotorregion | | |
| CREB* <i>cAMP-responsive element binding protein</i> | GGCAAT TGAC ACACATCC CGCT | -127 |
| Elk-1 <i>E26-transformation-specific-like gene 1</i> | GAGGACCC CGAA CCAGAACTG | -108 |
| SP1* <i>stimulating protein 1; GC-box factors</i> | GGTA AGGG CGGATTCCA | -89 |

* = methylierungssensitiv

(Bednarik *et al.* 1991; Prendergast und Ziff 1991; Di Fiore *et al.* 1999; Mancini *et al.* 1999)

4.1.3 Einfluss von Methylierung und Acetylierung auf die *TFF*-Expression

Ausgehend von den Daten aus den Abschnitten 4.1.1 und 4.1.2 scheint die *TFF*-Genexpression mit der Methylierung der Promotor-assoziierten CpG-Dinukleotide zu korrelieren. Um auch funktionell zu prüfen, ob die *TFF*-Genexpression in den acht analysierten Retinoblastomzelllinien epigenetisch reguliert wird, wurde der direkte Einfluss der DNA-Methylierung analysiert.

Dazu wurden die Retinoblastomzellen, wie in Abschnitt 3.3.6 beschrieben, mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2'-desoxycytidin (5-Aza-dC) behandelt, um Neumethylierungen der DNA zu verhindern. Um zusätzlich zur DNA-Methylierung den Einfluss der Histon-Acetylierung zu untersuchen, wurden die Zellen in einem weiteren Ansatz mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor β -Phenyl- γ -aminobuttersäure (PBA) behandelt. Mögliche synergistische Effekte von DNA-Demethylierung und Histon-Acetylierung auf die *TFF*-Expression wurden zudem durch Behandlung der Zellen mit einer Kombination beider Inhibitoren untersucht. Die *TFF*-Genexpression nach Stimulation mit den epigenetischen Reagenzien wurde mittels *Realtime* RT-PCR quantifiziert (Abbildung 4.5). In Tabelle 4.3 sind die relativen *TFF*-Expressionswerte wiedergegeben.

Die Behandlung mit 5-Aza-dC führte zu einer geringen Steigerung der *TFF1*-Expressionslevel in allen analysierten Retinoblastomzelllinien mit Ausnahme von RB 355. In allen Retinoblastomzelllinien ohne oder mit geringer endogener *TFF3*-Expression führte die Stimulation mit 5-Aza-dC zu einer signifikanten Induktion der *TFF3*-Expression.

Die Stimulation mit PBA führte zu einer signifikanten Reduktion der *TFF1*-Expression in vier der analysierten Retinoblastomzelllinien (RBL-13, RBL-30, RB 355 und WERI-Rb1). In den anderen vier Retinoblastomzelllinien (RBL-15, RB 247 C3, RB 383 und Y-79) war die *TFF1*-Expression nahezu unverändert (Abbildung 4.5 (A)). Im Gegensatz dazu war ein signifikanter Anstieg der *TFF3*-mRNA-Expression in RBL-15, RB 247 C3, RB 383, WERI-Rb1 und Y-79 zu beobachten (Abbildung 4.5 (B)). Im Vergleich zum Effekt, der durch 5-Aza-dC hervorgerufen wurde, war der 2,6-fache Anstieg in der Retinoblastomzelllinie RBL-30 bis zu maximal 6,4-fach in der Retinoblastomzelllinie RB 383 eher gering (Tabelle 4.3).

Die Kombination beider Inhibitoren führte zu einer signifikanten Steigerung der *TFF1*-Expression in allen analysierten Retinoblastomzelllinien mit Ausnahme von RB 383 und WERI-Rb1 (Abbildung 4.5 (A)). Verglichen mit der signifikanten Induktion der

TFF3-Expression nach Behandlung mit 5-Aza-dC sind die *TFF3*-Expressionslevel in allen Retinoblastomzelllinien außer RBL-13 und RB 247 C3 nach Behandlung mit beiden Inhibitoren weiter angestiegen (Abbildung 4.5 (B)). Trotz deutlicher Steigerung der *TFF3*-mRNA-Level war die erhöhte Expression auf Proteinebene nicht nachweisbar (nicht gezeigte Daten).

Eine Induktion der *TFF2*-Expression war unter keiner der oben genannten Bedingungen nachweisbar (nicht gezeigte Daten).

Tabelle 4.3: Einfluss epigenetischer Reagenzien auf die *TFF*-Expression der RB-Zelllinien

Angabe der relativen *TFF1*- und *TFF3*-Expression analog zu Abbildung 4.5.

| Zelllinie | Relative <i>TFF1</i> -Expression | | |
|-----------|----------------------------------|----------|-------------|
| | PBA | 5-Aza-dC | Kombination |
| RBL-13 | 0,64 | 1,09 | 1,84 |
| RBL-15 | 1,01 | 1,61 | 1,68 |
| RBL-30 | 0,51 | 2,15 | 2,43 |
| RB 247 C3 | 1,32 | 2,50 | 4,15 |
| RB 355 | 0,26 | 8,47 | 3,55 |
| RB 383 | 1,30 | 1,28 | 1,14 |
| WERI-Rb1 | 0,38 | 1,05 | 0,94 |
| Y-79 | 1,29 | 1,45 | 2,87 |

| Zelllinie | Relative <i>TFF3</i> -Expression | | |
|-----------|----------------------------------|----------|-------------|
| | PBA | 5-Aza-dC | Kombination |
| RBL-13 | 2,92 | 193,47 | 753,83 |
| RBL-15 | 4,08 | 125,78 | 2072,13 |
| RBL-30 | 2,60 | 134,87 | 243,23 |
| RB 247 C3 | 4,71 | 133,76 | 89,39 |
| RB 355 | 3,06 | 16,11 | 25,11 |
| RB 383 | 6,40 | 7,73 | 92,79 |
| WERI-Rb1 | 4,01 | 35,13 | 168,10 |
| Y-79 | 5,13 | 35,22 | 87,51 |

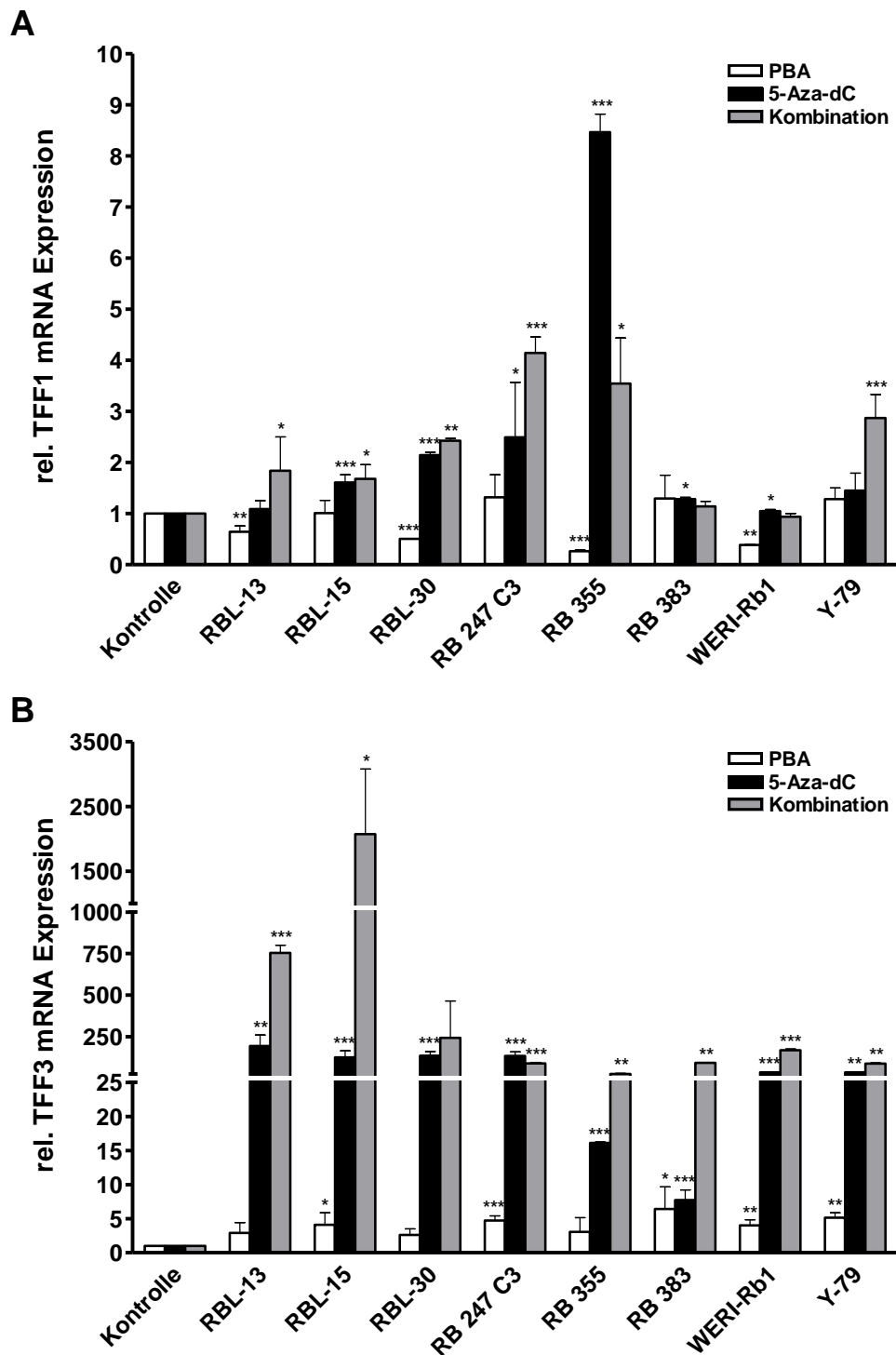


Abbildung 4.5: Einfluss epigenetischer Reagenzien auf die *TFF*-Expression der RB-Zelllinien

Darstellung der relativen *TFF1*- (A) und *TFF3*- (B) Expression nach Stimulation der Retinoblastomzellen mit PBA, 5-Aza-dC oder einer Kombination beider Inhibitoren nach Analyse mittels quantitativer *Realtime* RT-PCR. Parallel mit DMSO behandelte Retinoblastomzellen wurden zur Normierung der Expression einer jeden Zelllinie für jeden der drei Ansätze herangezogen und auf 1 gesetzt (Kontrolle). Als interne Kontrolle wurde die Expression von *GAPDH* herangezogen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM zwei unabhängiger in Triplikaten angesetzter Experimente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,005$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Abbildung modifiziert nach (Philippeit *et al.* 2014).

4.1.4 Einfluss epigenetischer Reagenzien auf den Methylierungsstatus

Das Ergebnis der *TFF*-Expressionsauswertung nach Behandlung der Zellen mit den epigenetischen Reagenzien 5-Aza-dC und PBA aus Abschnitt 4.1.3 deutet auf eine epigenetische Regulation der *TFF1*- und *TFF3*-Expression, während die Expression von *TFF2* mit den verwendeten Reagenzien nicht induzierbar war. Deshalb sollte im Folgenden geprüft werden, welche Auswirkung die Behandlung mit PBA, 5-Aza-dC oder beiden Inhibitoren auf die DNA-Methylierung hat und ob sich Unterschiede zwischen den verschiedenen *TFF*-Promotorregionen zeigen.

Für diese Analysen wurde die etablierte Retinoblastomzelllinie Y-79 verwendet und wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben mit den Reagenzien behandelt. Zur Ermittlung des Methylierungsstatus wurde die genomische DNA der einzelnen Proben isoliert und wie zuvor beschrieben mit Bisulfit behandelt, um eine Differenzierung methylierter und unmethylierter Cytosine zu ermöglichen. Auch hier wurde der Mittelwert aus fünf einzelnen Sequenzierungen bestimmt. Die Auswertung der Promotoranalysen sind in Abbildung 4.6 und Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Die Behandlung der Zellen mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor PBA führte zu einer minimalen Veränderung im Methylierungsmuster der *TFF1*-Promotorregion verglichen mit den mit DMSO stimulierten Kontrollzellen. Eine deutliche Reduktion der Methylierung der *TFF1*-Promotorregion von insgesamt 32% lag nach Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-dC vor. Durch die kombinierte Behandlung der Zellen mit beiden Inhibitoren war die Methylierung, im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollzellen, um insgesamt 70% reduziert.

Ähnliche Effekte waren auch für die Methylierung der *TFF3*-Promotorregion zu beobachten. Die hervorgerufene Demethylierung von 5% nach Behandlung mit PBA und 25% nach Behandlung mit 5-Aza-dC stieg mit der kombinierten Gabe beider Inhibitoren auf 74% und spiegelt so die Steigerung der *TFF3*-Expression aus Abbildung 4.5 wider.

Anders als in der *TFF1*- und *TFF3*-Promotorregion, hatte PBA, im Vergleich mit der entsprechenden Kontrolle, keinen Effekt auf die Methylierung der *TFF2*-Promotorregion. Die Stimulation mit 5-Aza-dC führte zu einer Demethylierung von 33% und hatte somit ein ähnliches Ausmaß wie bei *TFF1* und *TFF3*. Durch die Doppelstimulation wurde dieser Effekt jedoch nicht weiter gesteigert, was vermutlich auf dem fehlenden Einfluss von PBA basiert.

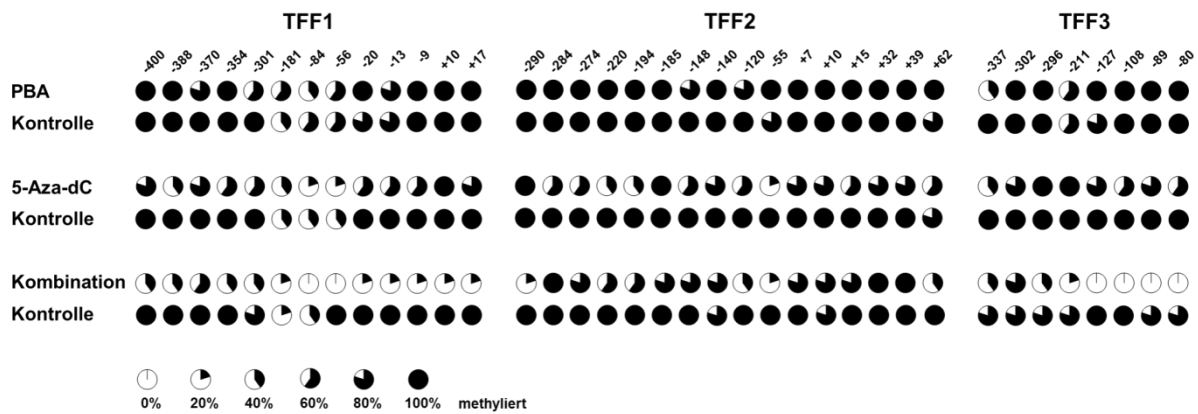


Abbildung 4.6: Einfluss epigenetischer Reagenzien auf den Methylierungsstatus der *TFF1*-, *TFF2*- und *TFF3*-Promotor-assoziierten CpG-Dinukleotide in Y-79 RB-Zellen

Darstellung der Methylierungsmittelwerte einzelner CpG-Dinukleotide der drei *TFF*-Promotorregionen in der Retinoblastomzelllinie Y-79 nach Stimulation mit PBA, 5-Aza-dC oder einer Kombination beider Inhibitoren. Jeder Kreis repräsentiert analog zu Abbildung 4.3 ein analysiertes CpG-Dinukleotid der jeweiligen Promotorregion. Der Mittelwert basiert auf der Sequenzanalyse fünf individueller Bakterienklone. Abbildung modifiziert nach (Philippeit *et al.* 2014).

Tabelle 4.4: Einfluss epigenetischer Reagenzien auf die Methylierung der *TFF1*-, *TFF2*- und *TFF3*-Promotorregion in Y-79 RB-Zellen

Reduktion der *TFF*-Promotormethylierung in Y-79 Retinoblastomzellen nach Stimulation mit PBA, 5-Aza-dC oder beiden Inhibitoren im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollzellen. Tabelle modifiziert nach (Philippeit *et al.* 2014).

| Behandlung | Reduktion der TFF-Promotormethylierung [%] | | |
|-------------|--|------|------|
| | TFF1 | TFF2 | TFF3 |
| PBA | 4 | 0 | 5 |
| 5-Aza-dC | 32 | 33 | 25 |
| Kombination | 70 | 29 | 74 |

Für einige der in Abschnitt 4.1.2 genannten CpG-Dinukleotide, deren Methylierung zusammen mit der *TFF*-Expression variiert, war nach Behandlung mit den epigenetischen Reagenzien eine weitere Reduktion des Methylierungsgrades in den *TFF*-Promotorregionen der Retinoblastomzelllinie Y-79 beobachtbar.

In der *TFF1*-Promotorregion betrifft dies insbesondere die CpG-Dinukleotide an Position -354 und -84 mit Überlappung der Bindestellen von Elk-1 und E2F bzw. NF- κ B. Im Vergleich zu den Kontrollen mit jeweils 100% Methylierung weist das CpG-Dinukleotid an Position -354 eine um 40% - 60% reduzierte Methylierung nach Behandlung mit 5-Aza-dC bzw. der kombinierten Behandlung auf (Abbildung 4.6)

und auch für das CpG an Position -84 ist die Methylierung, im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle, um 20% bzw. 40% geringer.

Die CpG-Dinukleotide, deren Position innerhalb der Bindestelle von CREB liegen, sind nach Behandlung mit beiden Inhibitoren sowohl in der *TFF1*-Promotorregion (Position -56) als auch in der *TFF3*-Promotorregion (Position -127) zu 100% demethyliert. Eine vollständige Demethylierung nach kombinierter Behandlung weisen auch die drei CpG-Dinukleotide an den Positionen -108, -89 und -80 in der *TFF3*-Promotorregion auf. Die Behandlung mit 5-Aza-dC alleine führt vergleichsweise nur zu einer 20% - 40% Reduktion der Methylierung, während PBA keinen Einfluss auf die Methylierung hatte. Diese vier CpG-Dinukleotide nahe des ATG waren auch in der *TFF3*-Promotorregion des humanen Duodenums mit starker endogener Expression jeweils nur zu 40% methyliert.

4.2 Rolle von TFF3 in Y-79 Retinoblastomzellen

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Bedeutung und biologischen Funktion von TFF3 in Retinoblastomzellen. Die Reduktion der *TFF3*-Expression in den analysierten Tumorzellen im Vergleich zur humanen Retina (Kapitel 4.1) kann das Verhalten dieser Zellen verändern. Um zu prüfen, ob und welche Effekte TFF3 auf die Tumorzellen ausübt, wurde die etablierte Retinoblastomzelllinie Y-79 mit humanem rekombinanten TFF3 (rTFF3) behandelt und in funktionellen Studien eingesetzt. Zusätzlich wurden durch Transfektion Y-79 Retinoblastomzellen mit transienter und stabiler TFF3-Überexpression generiert und charakterisiert.

4.2.1 Einfluss von rTFF3 auf die Zellviabilität

Zur ersten Abschätzung möglicher durch TFF3 hervorgerufene Effekte auf Y-79 Zellen, wurden diese, wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben, mit steigenden Konzentrationen von rTFF3 behandelt und in WST-1-Viabilitätsassays eingesetzt. Die Stimulation erfolgte über einen Zeitraum von 72 h mit einem Nachstimulationsschritt nach 48 h. Der Zusatz von rTFF3 zum Kultivierungsmedium führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität (Abbildung 4.7).

Die Auswertung zeigte eine konzentrationsabhängige Wirkung, die bereits bei 1 µg/ml rTFF3 zu einer Reduktion der Viabilität um 9% führte. Eine signifikante Reduktion der Viabilität um 20% war durch Stimulation mit 5 µg/ml rTFF3 zu beobachten. Höhere Konzentrationen hatten keinen weiteren Einfluss auf die Viabilität. Die Auswertung des WST-1-Viabilitätsassays gab erste Hinweise darauf, dass TFF3 möglicherweise an der Regulation der Zellproliferation oder Apoptose in Y-79 Retinoblastomzellen beteiligt ist.

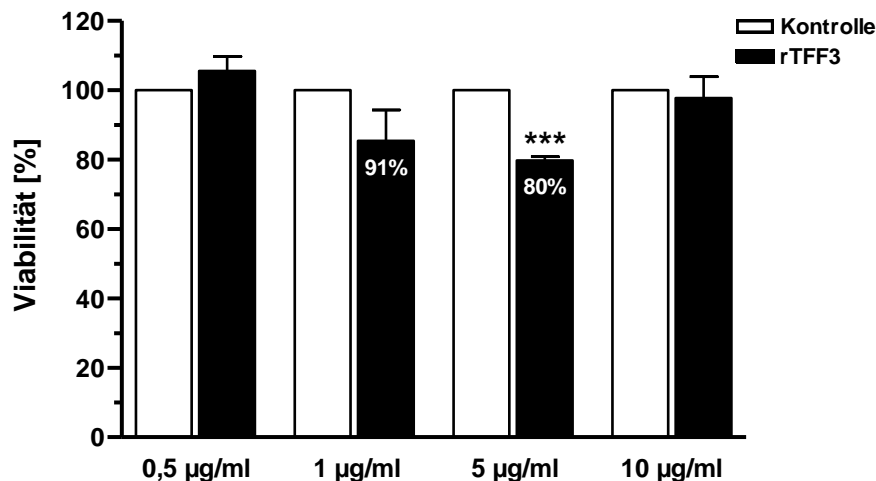


Abbildung 4.7: Einfluss von rTFF3 auf die Viabilität von Y-79 RB-Zellen

Y-79 Retinoblastomzellen wurden über einen Zeitraum von 72 h mit einmaliger Nachstimulation nach 48 h mit steigenden Konzentrationen an humanem rTFF3 (0,5 µg/ml-10 µg/ml) behandelt. Zur jeweiligen Kontrolle wurden Y-79 Retinoblastomzellen gleiche Volumina an sterilem Wasser zugesetzt. Die Viabilität wurde 2 h nach Zusatz der WST-1-Gebrauchslösung spektralphotometrisch ermittelt und nach Normierung auf die jeweiligen Kontrollen in Prozent angegeben. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM vier unabhängiger in Triplikaten angesetzter Experimente. *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

4.2.2 Einfluss von rTFF3 auf Apoptose- und Proliferationsverhalten

Um zu klären, ob die durch rTFF3 hervorgerufene Reduktion der Y-79 Zellviabilität durch erhöhte Apoptose, verringerte Zellproliferation oder beide Prozesse verursacht wird, wurden die Retinoblastomzellen gezielt in einzelnen Ansätzen untersucht. Zur Ermittlung der Apoptoserate wurden die Zellen im 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Zelltodassay eingesetzt (Kapitel 3.4.2) und die Zellproliferation wurde durch 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) Interkalierung bestimmt (Kapitel 3.4.3). Ausgehend von dem Ergebnis des Viabilitätsassays wurde eine Konzentration von 5 µg/ml rTFF3 gewählt.

Die Behandlung der Y-79 Retinoblastomzellen mit 5 µg/ml rTFF3 führte nach 24 h Stimulation zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate (Abbildung 4.8 (A)). Dieser Effekt war nach 48 h nicht mehr vorhanden (nicht gezeigte Daten), konnte jedoch durch eine Stimulationsdauer von insgesamt 72 h mit einem Nachstimulationsschritt nach 48 h, entsprechend dem Ansatz zur Viabilität, wieder beobachtet werden (Abbildung 4.8 (B)).

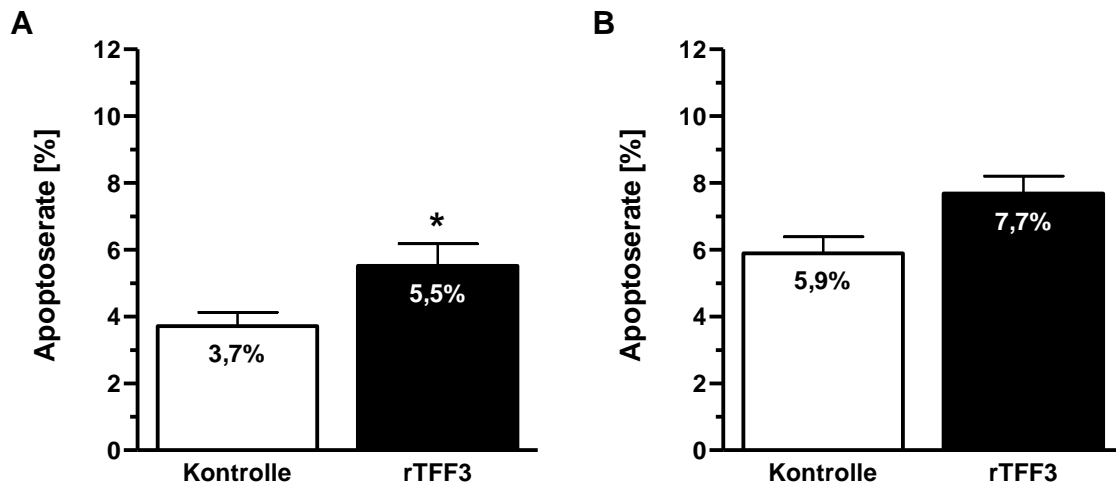


Abbildung 4.8: Einfluss von rTFF3 auf die Apoptoserate von Y-79 RB-Zellen

Y-79 Retinoblastomzellen wurden über einen Zeitraum von 24 h (A) und 72 h mit einmaliger Nachstimulation nach 48 h (B) mit 5 µg/ml humanem rTFF3 stimuliert. Zur jeweiligen Kontrolle wurden Y-79 Retinoblastomzellen gleiche Volumina an sterilem Wasser zugesetzt. Zur Berechnung der Apoptoserate wurde der Anteil apoptotischer Zellen fluoreszenzmikroskopisch nach DAPI-Färbung bestimmt und mit der Gesamtzellzahl korreliert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM vier (A) bzw. zwei (B) unabhängiger Experimente. * $p < 0,05$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

Zur Untersuchung möglicher TFF3-bedingter Effekte auf die Zellproliferation wurden Y-79 Retinoblastomzellen, die eine niedrige Zellteilungsrate aufweisen (Weise und Dünker 2013), für insgesamt 72 h mit 5 µg/ml rTFF3 stimuliert. Die Auswertung ergab keinen Unterschied bezüglich der Proliferationsrate beider Proben (Abbildung 4.9).

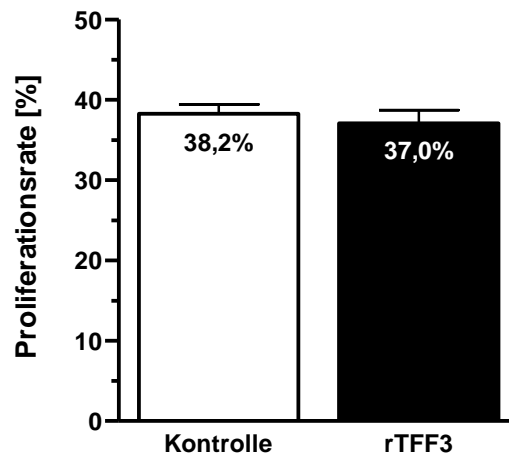


Abbildung 4.9: Einfluss von rTFF3 auf die Proliferation von Y-79 RB-Zellen

Y-79 Retinoblastomzellen wurden über einen Zeitraum von 72 h mit einmaliger Nachstimulation nach 48 h mit 5 µg/ml humanem rTFF3 stimuliert. Zur Kontrolle wurden Y-79 Retinoblastomzellen gleiches Volumen an sterilem Wasser zugesetzt. Zur Berechnung der Proliferationsrate wurde der Anteil proliferierender Zellen fluoreszenzmikroskopisch nach BrdU-Immunzytochemie bestimmt und mit der Gesamtzellzahl korreliert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM zwei unabhängiger Experimente.

4.2.3 Phosphokinase-Array

Um zu untersuchen, welche Signalmoleküle durch Stimulation mit rekombinantem TFF3 aktiviert oder deaktiviert werden und so das Zellverhalten mitbeeinflussen, wurde ein Proteom-Array verwendet, der speziell den Phosphorylierungsstatus verschiedener Proteinkinasen detektiert. Diese sind in Signalwege involviert, die an der Regulation von Wachstum, Proliferation oder Zelltod beteiligt sind.

Für den Array wurden Y-79 Retinoblastomzellen für 15 min mit 5 µg/ml rTFF3 stimuliert und zur Herstellung von Proteinlysaten eingesetzt. Nicht stimulierte Y-79 Retinoblastomzellen dienten als Referenz zur Auswertung. Die Visualisierung der Chemilumineszenz und die quantitative Auswertung des Array sind in Abbildung 4.10 bzw. Tabelle 4.5 dargestellt.

Die Entwicklung der beiden Phosphokinase-Array-Membranen weist insgesamt eine starke Ähnlichkeit des Phosphorylierungsmusters zwischen den mit rTFF3 stimulierten Zellen und den Kontrollzellen auf. Nach densitometrischer Auswertung der einzelnen Signale zeigten vier Proteine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Phosphorylierungslevel. Zu diesen gehören die zwei Untereinheiten der AMP-aktivierten Proteinkinase AMPKα1 und AMPKα2, die Extrazellulär-regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2) sowie die Proteinkinase p38, von denen die beiden letzteren zu den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) gehören und durch die Phosphorylierung

in einem aktivierten Zustand vorliegen. Reduzierte Phosphorylierungslevel zeigten sich bei dem *cAMP-responsive element binding protein* (CREB) und der WNK1-Kinase, die mit einer verminderten Funktion beider Proteine einhergeht. Deutlich exprimiert, aber ohne quantitative Unterschiede bezüglich der Expression bzw. des Grades an Phosphorylierung, waren das Hitzeschockprotein 60 (HSP60), c-Jun (Ser63) und p53 (Ser46, Ser392).

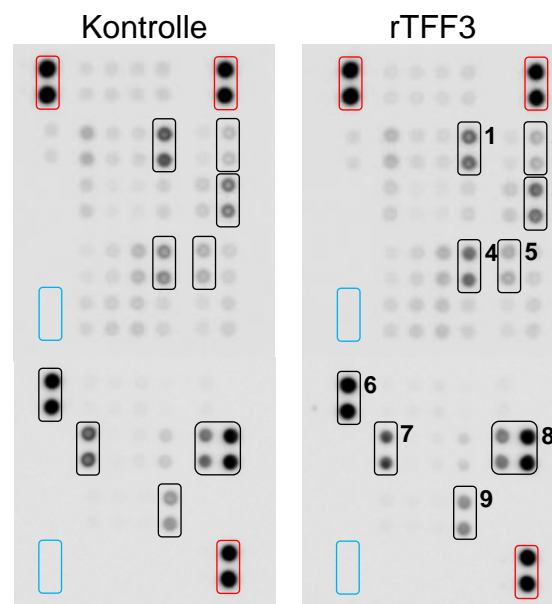


Abbildung 4.10: Phosphokinase-Array

Darstellung der Chemilumineszenz-Reaktion der Phosphokinase-Array-Membranen. Die roten Markierungen zeigen die internen Referenzen, die blauen Markierungen die Negativkontrollen (PBS). Die schwarzen Markierungen kennzeichnen Proteine mit deutlicher Expression bzw. im Vergleich zur Kontrolle verändertem Phosphorylierungsgrad: CREB(1), p38 α (2), ERK1/2(3), AMPK α 2(4), AMPK α 1(5), HSP60(6), WNK1(7), p53(8) und c-Jun(9).

Tabelle 4.5: Quantifizierung des Phosphokinase-Array

Quantifizierung der Proteinphosphorylierung in Bezug auf die Kontrollprobe unter Angabe der entsprechenden Phosphorylierungsstelle an Threonin (Thr), Tyrosin (Tyr) oder Serin (Ser). Das Vorzeichen gibt an, ob das Protein im Vergleich zur Kontrolle stärker (+) oder schwächer (-) phosphoryliert vorliegt. Für HSP60, c-Jun und p53 lagen keine Unterschiede vor.

| Protein | Phosphorylierungsstelle | Kontrollabweichung [%] |
|-----------------|---------------------------------|------------------------|
| p38 α | Thr180/Tyr182 | +27 |
| AMPK α 2 | Thr172 | +23 |
| ERK1/2 | Thr202/Tyr204, Thr185/Tyr187 | +12 |
| AMPK α 1 | Thr174 | +10 |
| CREB | Ser133 | -11 |
| WNK1 | Thr60 | -19 |

4.2.4 Etablierung einer transienten Transfektion

Zur transienten TFF3-Überexpression sollten Y-79 Retinoblastomzellen mit dem Expressionsplasmid *pCS2+_UBQ_TFF3* transfiziert werden. Um geeignete Transfektionsbedingungen zu schaffen, wurden zu Beginn verschiedene Ansätze ausprobiert, für die das GFP-kodierende Expressionsplasmid *pCS2+_GFP* genutzt wurde, um die Transfektionseffizienz visuell beurteilen zu können. Erste Transfektionen mit dem Transfektionsreagenz jetPRIME[®] (Polyplus Transfection) mit verschiedenen Plasmidmengen (1 µg und 2 µg) und unterschiedlich eingestellten Verhältnissen zum Transfektionsreagenz (1:2, 1:3 und 1:4) an künstlich adhärent gemachten Y-79 Retinoblastomzellen (1×10^6 Zellen pro Ansatz) resultierten in einer sehr geringen Transfektionsrate. Auch eine variierende Transfektionsdauer von 4 h auf 6,5 h führte zu keiner für funktionelle Analysen ausreichenden Transfektionseffizienz. In weiteren Versuchen wurde zunächst das Transfektionsreagenz gewechselt. Im Gegensatz zu dem zuvor getesteten jetPRIME[®], welches laut Hersteller für adhärente Zellen optimiert ist, kann die Transfektion mit FuGENE[®] HD (Promega) auch an Suspensionszellen durchgeführt werden.

Es zeigte sich, dass die Transfektion der Y-79 Retinoblastomzellen in ihrer natürlichen Form als Suspensionszellen im Vergleich zu den adhärent gemachten Zellen deutlich besser funktioniert. In verschiedenen Ansätzen wurde dann das für diese Zellen ideale Verhältnis von 4 µg Plasmid-DNA mit 16 ml FuGENE[®] HD ermittelt (Kapitel 3.3.8).

Bereits 48 h nach Transfektion der Y-79 Retinoblastomzellen war eine deutliche GFP-Expression erkennbar, die nach 144 h noch nachweisbar war (Abbildung 4.11).

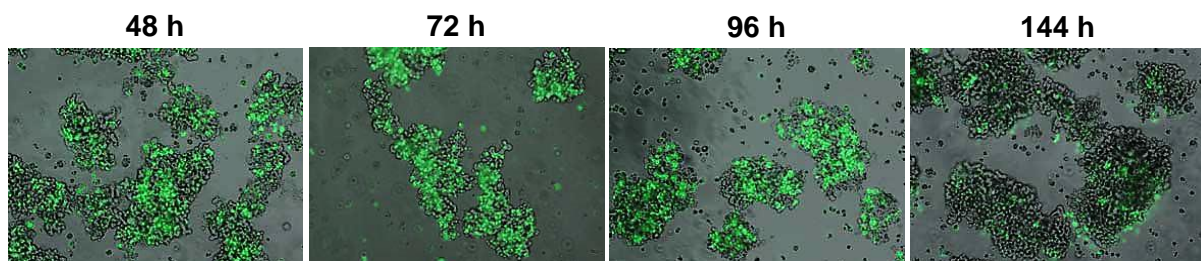


Abbildung 4.11: Transiente GFP-Expression in Y-79 RB-Zellen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Y-79 Retinoblastomzellen nach transienter Transfektion mit dem GFP-exprimierenden Plasmid *pCS2+_GFP* mit 100x Vergrößerung.

4.2.5 Nachweis transienter TFF3-Überexpression

Um die Dauer und Stärke der transienten TFF3-Überexpression zu testen, wurde die Expression über einen Zeitraum von sechs Tagen sowohl auf mRNA-Ebene mittels quantitativer *Realtime* RT-PCR als auch auf Proteinebene mittels Western-Blot analysiert. Zusätzlich wurde die intrazelluläre Lokalisierung des TFF3-Peptids mittels Immunfluoreszenzfärbung der Y-79 Retinoblastomzellen 48 h nach transienter Transfektion mit *pCS2+_UBQ_TFF3* untersucht.

Die relative *TFF3*-mRNA-Expression bezogen auf die Expression in den mit dem Leervektor *pCS2+_UBQ* transfizierten Kontrollzellen sowie der relative TFF3-Proteingehalt bezogen auf β -Aktin über einen Zeitraum von 144 h sind in Abbildung 4.12 und in Tabelle 4.6 wiedergegeben.

Bereits 24 h nach transienter Transfektion des *pCS2+_UBQ_TFF3* Plasmids wiesen die Y-79 Retinoblastomzellen eine 3.943x stärkere *TFF3*-Expression im Vergleich zu den mit dem Leervektor *pCS2+_UBQ* transfizierten Kontrollzellen auf (Abbildung 4.12 (A); Tabelle 4.6). Nach 48 h waren die *TFF3*-mRNA-Level maximal und nahmen dann kontinuierlich ab. Eine starke *TFF3*-Expression war jedoch auch noch nach 144 h detektierbar. Der TFF3-Proteingehalt in den Zelllysaten stieg zeitversetzt zur Expression der *TFF3*-mRNA an und war 72 h nach der Transfektion maximal. Auch hier nahm der TFF3-Gehalt im Verlauf wieder ab und korreliert mit den ansteigenden Konzentrationen an sezerniertem TFF3 im Medienüberstand (Abbildung 4.12 (B)).

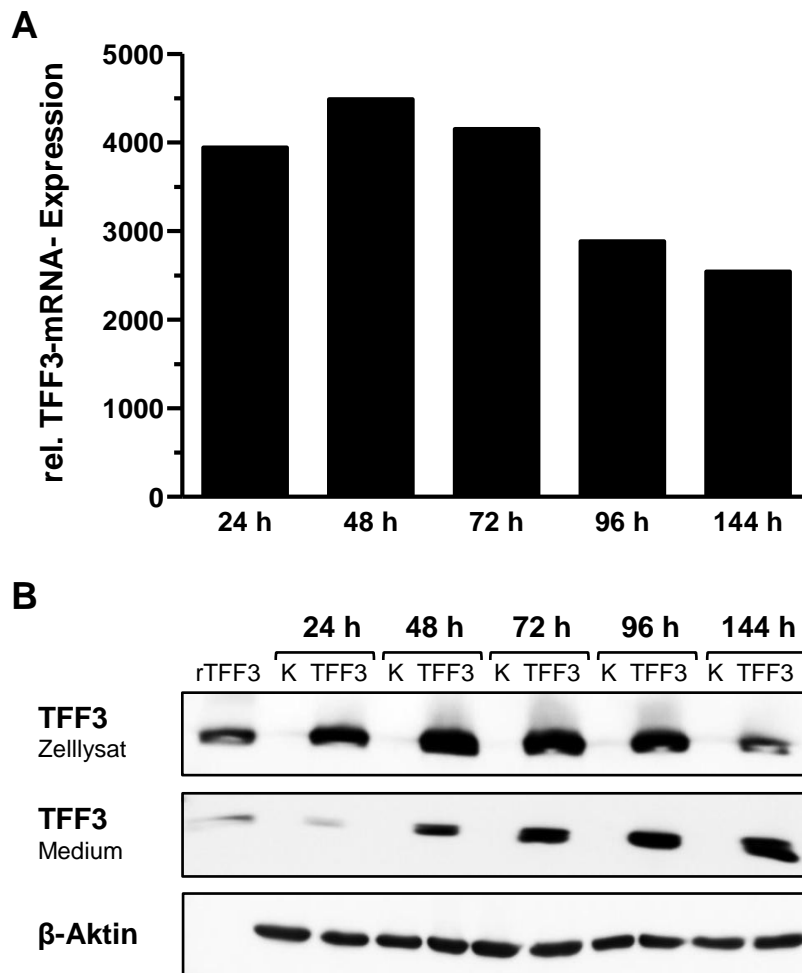


Abbildung 4.12: Zeitlicher Verlauf transientser TFF3-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene

Zur transienten TFF3-Überexpression wurden Y-79 Retinoblastomzellen mit dem Expressionsplasmid *pCS2+_UBQ_TFF3* transfiziert (TFF3). Parallel mit dem Leervektor *pCS2+_UBQ* transfizierte Y-79 Retinoblastomzellen dienen als Kontrolle (K). Der Nachweis der TFF3-Expression erfolgte mittels quantitativer *Realtime* RT-PCR (A) und Western-Blot Analyse (B) über einen Zeitraum von 144 h.

A Relative *TFF3*-Expression nach Normierung auf die Expression der jeweiligen Kontrollzellen. Als interne Kontrolle wurde die Expression von *GAPDH* herangezogen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert zwei unabhängiger Transfektionen.

B Nachweis von lokalem TFF3 aus Zelllysaten und sezerniertem TFF3 im Mediumüberstand. Als interne Kontrolle diente die Expression von β -Aktin. Als Referenz wurde 10 ng rekombinantes TFF3 eingesetzt. Repräsentative Darstellung einer Nitrozellulosemembran nach Immundetektion durch anti-TFF3-Antikörper.

Tabelle 4.6: Relative TFF3-Expression über einen Zeitraum von 144 h

Relative *TFF3*-mRNA-Expression und TFF3-Proteinlevel über einen Zeitraum von 144 h von zwei unabhängigen Expressionsanalysen bzw. densitometrischen Auswertungen.

| Expression | Zeitpunkt | | | | |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 144 h |
| mRNA | 3.943x | 4.487x | 4.151x | 2.884x | 2.542x |
| Protein | 1,92x | 2,78x | 3,01x | 2,83x | 1,58x |

Immunzytochemische Färbungen zeigten eine deutliche Anreicherung von TFF3 im Zytoplasma der Y-79 Retinoblastomzellen (Abbildung 4.13). Unspezifische Bindungen der Sekundärantikörper wurden durch Negativkontrollen ohne Primärantikörper ausgeschlossen.

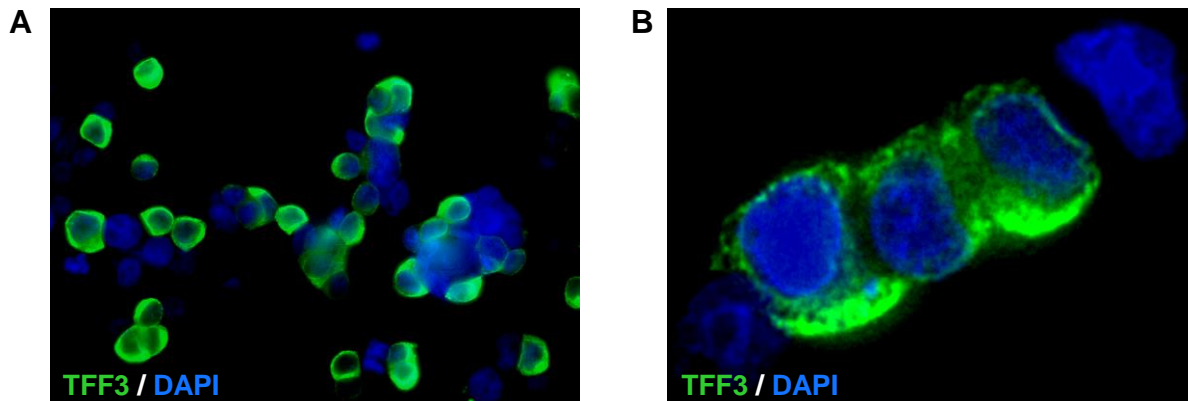


Abbildung 4.13: Lokalisation von TFF3 in Y-79 RB-Zellen mit transienter TFF3-Überexpression

Für den immunzytochemischen Nachweis von zellulärem TFF3 wurden Y-79 Retinoblastomzellen transient mit dem Expressionsplasmid *pCS2+_UBQ_TFF3* transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach transienter Transfektion für die Immundetektion eingesetzt. Aufnahme bei 600x Vergrößerung (A) und Ausschnittsvergrößerung (B).

4.2.6 Einfluss transienter TFF3-Überexpression auf Apoptose- und Proliferationsverhalten

Um die Auswirkung einer transienten TFF3-Überexpression auf das Verhalten von Y-79 Retinoblastomzellen zu untersuchen, wurden die Zellen analog zu den Studien mit rTFF3 einzeln in Apoptose- und Zellproliferationsassays eingesetzt. Durch parallel mit dem GFP-exprimierenden Plasmid *pCS2+_GFP* transfizierte Y-79 Retinoblastomzellen wurde die Transfektionseffizienz in jedem Versuch fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Es wurden ausschließlich Versuche ausgewertet, in denen die Transfektionsrate mindestens 80% betrug.

Eine transiente TFF3-Überexpression in Y-79 Retinoblastomzellen führte im Vergleich zu den Kontrollzellen zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate. Die Untersuchungen wurden 48 h (Abbildung 4.14 (A)) und 72 h (Abbildung 4.14 (B)) nach transienter Transfektion durchgeführt.

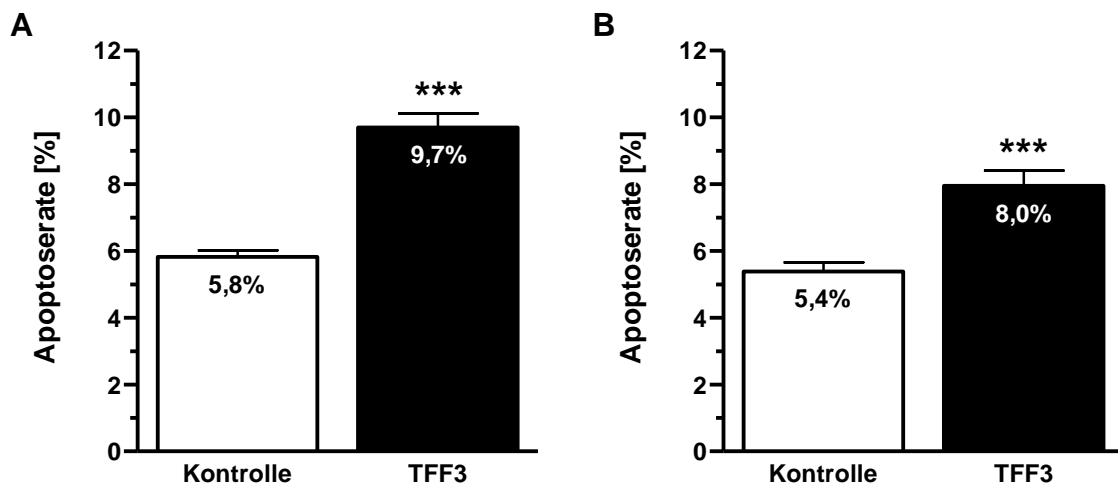


Abbildung 4.14: Einfluss transientser TFF3-Expression auf die Apoptoserate von Y-79 RB-Zellen

Vergleich der Apoptoserate 48 h (A) und 72 h (B) nach transientser Transfektion von Y-79 Retinoblastomzellen mit dem Expressionsplasmid *pCS2+UBQ_TFF3* (TFF3) bzw. dem Leervektor *pCS2+UBQ* (Kontrolle). Zur Berechnung der Apoptoserate wurde der Anteil apoptotischer Zellen fluoreszenzmikroskopisch nach DAPI-Färbung bestimmt und mit der Gesamtzellzahl korreliert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM jeweils drei unabhängiger Experimente. *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

Analog zu den Ergebnissen der Stimulation mit rekombinantem TFF3 war auch nach transientser TFF3-Überexpression kein Effekt auf die Zellproliferation mittels BrdU-Färbung nachweisbar (Abbildung 4.15).

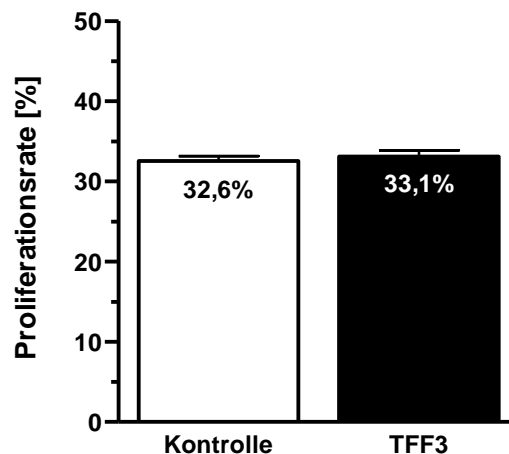


Abbildung 4.15: Einfluss transientser TFF3-Expression auf die Proliferationsrate von Y-79 RB-Zellen

Vergleich der Proliferationsrate 48 h nach transientser Transfektion von Y-79 Retinoblastomzellen mit dem Expressionsplasmid *pCS2+UBQ_TFF3* (TFF3) bzw. dem Leervektor *pCS2+UBQ* (Kontrolle). Zur Berechnung der Proliferationsrate wurde der Anteil proliferierender Zellen fluoreszenzmikroskopisch nach BrdU-Immunzytochemie bestimmt und mit der Gesamtzellzahl korreliert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM zweier unabhängiger Experimente.

4.2.7 Stabile TFF3-Überexpression

Um die Bedeutung von TFF3 in der Apoptose- und Proliferationskontrolle weiter zu untersuchen, wurde durch lentivirale Transduktion eine Y-79 Retinoblastomzelllinie mit stabiler TFF3-Überexpression generiert. Da diese Zellen prospektiv für weiterführende Versuche zur Analyse möglicher Migrations- und Invasivitätseffekte in einem *in ovo* Hühnchen-Chorioallantoismembran (CAM)-Modell genutzt werden und daher visualisierbar sein sollten (für Details siehe: (Busch *et al.* 2015)), wurden die Zellen zuvor mit GFP markiert. Die verwendeten viralen Partikel wurden in den humanen embryonalen Nierenzellen HEK293T produziert (Kapitel 3.3.9).

In jedem Versuch wurde die Stärke der TFF3-Überexpression sechs Tage nach viraler Transduktion mittels quantitativer *Realtime* RT-PCR bestimmt. Im Vergleich zu den mit dem Kontrollvektor *pPRIME-CMV-Neo-FF3* transduzierten Y-79 Retinoblastomzellen war die TFF3-Expression immer deutlich höher (384x - 2.226x).

4.2.8 Einfluss stabiler TFF3-Überexpression auf die Zellviabilität

Nach lentiviraler Transduktion mit *pLenti CMV_TFF3* bzw. *pPRIME-CMV-Neo-FF3* wurden die jeweiligen Zellen in WST-1-Viabilitätsassays eingesetzt. Durch die stabile TFF3-Expression war eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion der Zellviabilität nachweisbar (Abbildung 4.16).

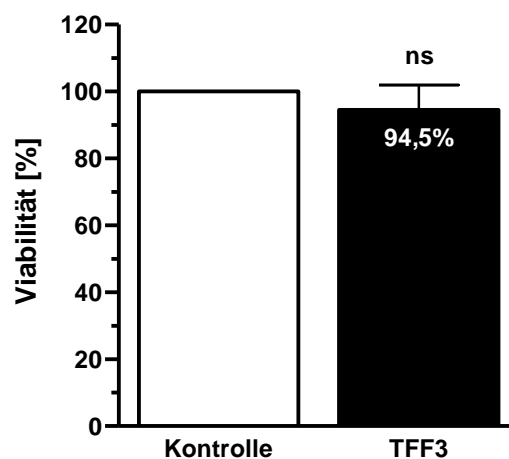


Abbildung 4.16: Einfluss stabiler TFF3-Überexpression auf die Viabilität von Y-79 RB-Zellen

Vergleich der Viabilität 15 Tage nach lentiviraler Transduktion von Y-79 Retinoblastomzellen mit *pLenti CMV_TFF3* (TFF3) bzw. *pPRIME-CMV-Neo-FF3* (Kontrolle). Die Zellen wurden nach Zellzahlbestimmung für 48 h unter Standardbedingungen kultiviert. Die Viabilität wurde 2 h nach Zusatz der WST-1-Gebrauchslösung spektralphotometrisch ermittelt und nach Normierung auf die Kontrolle in Prozent angegeben. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM vier unabhängiger Experimente. ns statistisch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

4.2.9 Einfluss stabiler TFF3-Überexpression auf Apoptose- und Proliferationsverhalten

Nach Bestätigung einer deutlichen *TFF3*-mRNA Expression sechs Tage nach viraler Transduktion mit dem Plasmid *pLenti CMV_TFF3*, wurden die Y-79 Retinoblastomzellen für weitere 24 h auf Deckgläschen ausgesät und zur Analyse von Apoptose und Zellproliferation eingesetzt. Die stabile Überexpression von TFF3 führte im Vergleich zu den mit *pPRIME-CMV-Neo-TFF3* transduzierten Kontrollzellen zu einer signifikant erhöhten Apoptoserate in den Y-79 Retinoblastomzellen (Abbildung 4.17). Diese Daten ähneln den Ergebnissen der Studien mit rTFF3 und transient überexprimiertem TFF3.

Durch Zusatz des Breitband-Caspase-Inhibitors Boc-D-Fmk (50 μ M) sollte die Beteiligung von Caspasen an der TFF3-induzierten Apoptose in Y-79 Retinoblastomzellen überprüft werden. Es zeigte sich, dass die Anwesenheit von Boc-D-Fmk sowohl die basale als auch TFF3-induzierte Apoptoserate signifikant reduziert (Abbildung 4.17).

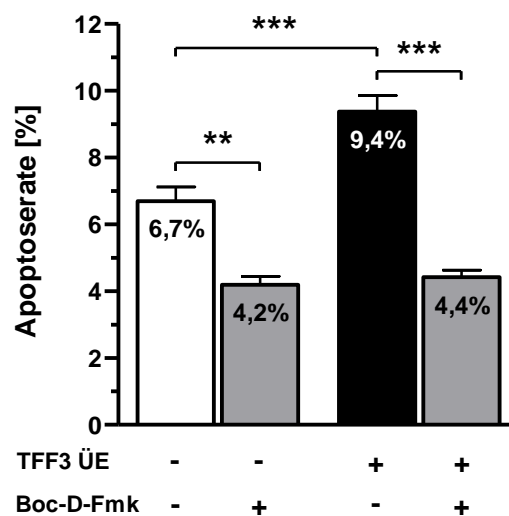


Abbildung 4.17: Einfluss stabiler TFF3-Überexpression auf die Apoptoserate von Y-79 RB-Zellen und Beteiligung von Caspasen

Vergleich der Apoptoserate sieben Tage nach lentiviraler Transduktion von Y-79 Retinoblastomzellen mit *pLenti CMV_TFF3* (+) bzw. *pPRIME-CMV-Neo-TFF3* (Kontrolle, -). Die Beteiligung von Caspasen an der basalen und TFF3-induzierten Apoptoseinduktion in Y-79 Retinoblastomzellen wurde durch Zusatz von 50 μ M des Breitband-Caspase-Inhibitors Boc-D-Fmk (+) über einen Zeitraum von 24 h untersucht. Zur Berechnung der Apoptoserate wurde der Anteil apoptotischer Zellen fluoreszenzmikroskopisch nach DAPI-Färbung bestimmt und mit der Gesamtzellzahl korreliert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM vier (ohne Boc-D-Fmk) bzw. zwei (mit Boc-D-Fmk) unabhängiger Experimente. ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied.

Übereinstimmend mit den vorherigen Auswertungen war auch zwischen Y-79 Retinoblastomzellen mit stabiler TFF3-Überexpression und den entsprechenden Kontrollzellen kein signifikanter Unterschied im Proliferationsverhalten nachweisbar (Abbildung 4.18). Die Proliferationsrate ist im Vergleich zur Proliferationsrate nach Stimulation mit rTFF3 (Abbildung 4.9) oder nach transienter TFF3-Überexpression (Abbildung 4.15) deutlich niedriger. Dieser Effekt hängt vermutlich mit der viralen Infektion der Zellen zusammen.

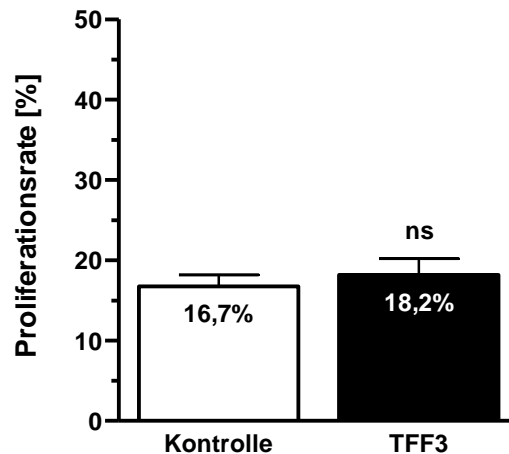


Abbildung 4.18: Einfluss von stabil exprimierten TFF3 auf die Proliferation von Y-79 RB-Zellen

Vergleich der Proliferationsrate sechs Tage nach lentiviraler Transduktion von Y-79 Retinoblastomzellen mit *pLenti CMV_TFF3* (TFF3) bzw. *pPRIME-CMV-Neo-FF3* (Kontrolle). Zur Berechnung der Proliferationsrate wurde der Anteil proliferierender Zellen fluoreszenzmikroskopisch nach BrdU-Immunzytochemie bestimmt und mit der Gesamtzellzahl korreliert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM drei unabhängiger Experimente. ns statistisch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

Zusätzlich zur BrdU-Färbung wurden Wachstumskurven erstellt. Dazu wurden, wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben, zu Beginn des Versuches jeweils 3×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 24-well-Platte in Triplikaten ausgesät und über einen Zeitraum von 192 h täglich mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Trotz leichter Tendenz eines schnelleren Wachstums durch TFF3-Überexpression waren auch hier keine signifikanten Unterschiede ($p=0,401$) zwischen Y-79 Retinoblastomzellen mit und ohne TFF3-Überexpression zu erkennen (Abbildung 4.19).

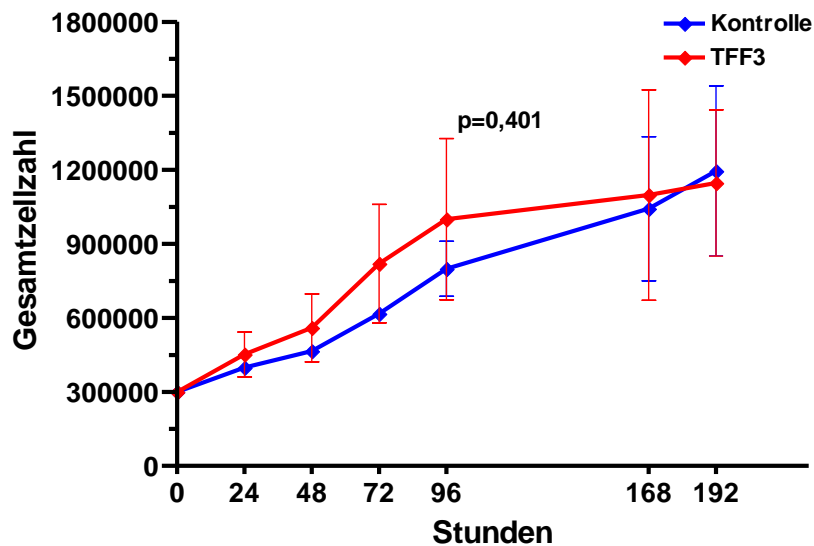


Abbildung 4.19: Einfluss von stabil exprimierten TFF3 auf das Wachstum von Y-79 RB-Zellen

Vergleich der Wachstumsrate sechs Tage nach lentiviraler Transduktion von Y-79 Retinoblastomzellen mit *pLenti CMV_TFF3* (TFF3) bzw. *pPRIME-CMV-Neo-FF3* (Kontrolle) über einen Zeitraum von 192 h. Eingesetzt wurden jeweils 300.000 Zellen. Zur Berechnung der Gesamtzellzahl wurden die Zellen mittels Neubauerzählkammer gezählt und mit dem Kultivierungsvolumen korreliert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM drei unabhängiger in Triplikaten angesetzter Experimente. Mit $p=0,401$ besteht statistisch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

4.2.10 Koloniebildungseffizienz TFF3-überexprimierender Y-79 RB-Zellen

Eine allgemeine Eigenschaft von Tumorzellen ist die Fähigkeit, als Einzelzellen kontaktunabhängig wachsen zu können und Kolonien auszubilden. Diese Fähigkeit wurde auch für die Retinoblastomzelllinie Y-79 in einer vorherigen Publikation unserer Arbeitsgruppe bestätigt (Busch *et al.* 2015). Um zu testen, ob TFF3 einen Einfluss auf die Ausbildung von Zellkolonien besitzt, wurden Y-79 Retinoblastomzellen mit und ohne TFF3-Überexpression als Einzelzellen in einem Koloniebildungsassay eingesetzt und auf kontaktunabhängiges Wachstum in Soft-Agarose untersucht.

Das Wachstum der Zellen wurde wöchentlich mittels Mikroskop untersucht und dokumentiert. Bereits nach einer Woche waren Zellaggregate in beiden Ansätzen nachweisbar (Abbildung 4.20). Im Vergleich zu Y-79 Kontrollzellen schienen TFF3-überexprimierende Y-79 Retinoblastomzellen durchschnittlich weniger Zellaggregate zu bilden.

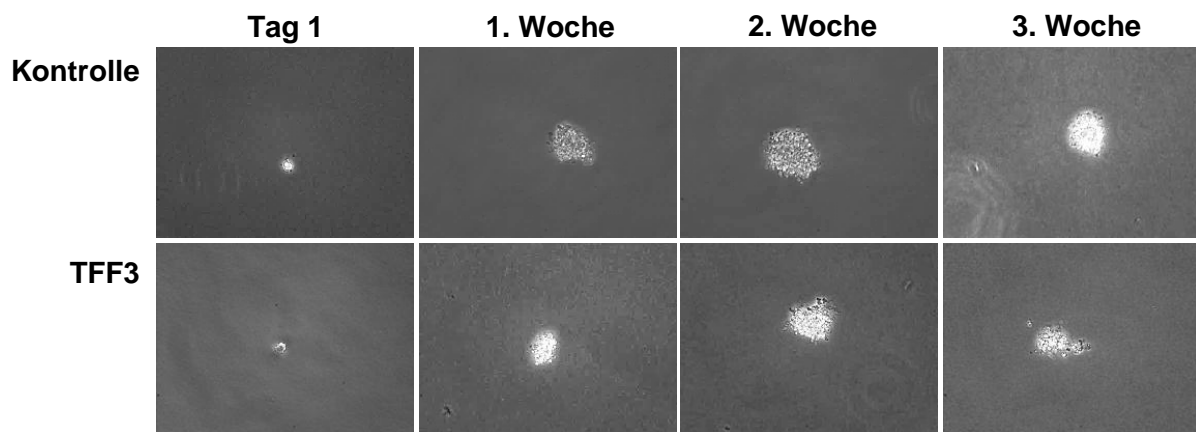


Abbildung 4.20: Kontaktunabhängiges Wachstum von Y-79 RB-Zellen

Vergleich der ausgebildeten Zellaggregate nach lentiviraler Transduktion von Y-79 Retinoblastomzellen mit *pLenti CMV_TFF3* (TFF3) bzw. *pPRIME-CMV-Neo-FF3* (Kontrolle). Die als Einzelzellen verdünnten Y-79 Retinoblastomzellen wurden am Tag der Aussaat und nach einer, zwei und drei Wochen Kultur am Mikroskop fotografiert. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Phasenkontrastaufnahme bei 200x Vergrößerung.

Drei Wochen nach der Aussaat wurden die gebildeten Zellaggregate ausgezählt und die Koloniebildungseffizienz bestimmt (Kapitel 3.4.5). Y-79 Retinoblastomzellen mit TFF3-Überexpression wiesen im Vergleich zu Y-79 Kontrollzellen eine leicht, aber bei insgesamt drei unabhängigen Experimenten nicht signifikant verminderte Fähigkeit zur Ausbildung von Kolonien auf (Abbildung 4.21).

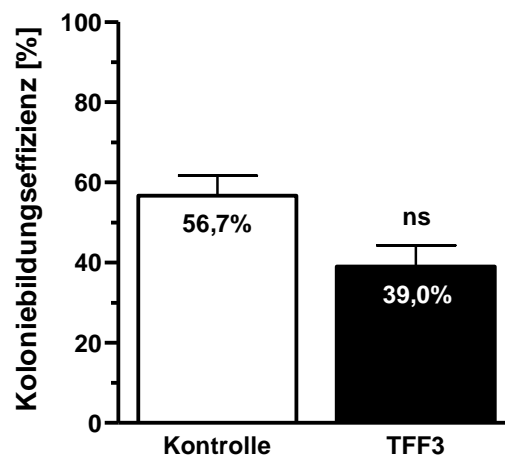


Abbildung 4.21: Einfluss von stabil exprimierten TFF3 auf die Koloniebildungseffizienz von Y-79 RB-Zellen

Vergleich der Koloniebildungseffizienz nach lentiviraler Transduktion von Y-79 Retinoblastomzellen mit *pLenti CMV_TFF3* (TFF3) bzw. *pPRIME-CMV-Neo-FF3* (Kontrolle). Nach einer dreiwöchigen Kultivierung in Soft-Agarose wurden die gebildeten Zellaggregate mit der in fünf Gesichtsfeldern gezählten Gesamtzellzahl korreliert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM drei unabhängiger in Triplikaten angesetzter Experimente. ns statistisch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

5 Diskussion

5.1 Regulation der *TFF*-Genexpression in Retinoblastomzelllinien

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob epigenetische Veränderungen eine Rolle bei der Regulation der transkriptionellen *TFF*-Genexpression in verschiedenen Retinoblastomzelllinien spielen. Dazu wurde zunächst das Expressionsprofil aller drei *TFF*-Gene untersucht.

5.1.1 Endogene *TFF*-Expression

Während *TFF1* von den meisten analysierten RB-Tumorzelllinien deutlich exprimiert wurde, waren nur niedrige *TFF3*-Level detektierbar und *TFF2* nicht nachweisbar. Um Anhaltspunkte zur Expression unter physiologischen Bedingungen zu erhalten, wurde die *TFF*-Expression der analysierten RB-Tumorzelllinien mit einem gesunden, humanen Retinapool verglichen, da sich Retinoblastome aus Retinazellen entwickeln. Verwendet wurde ein kommerziell erworbener RNA-Pool aus sechs verschiedenen adulten Spenderretinae. Da es sich bei Retinoblastomen mit wenigen Ausnahmen um kindliche Tumore handelt, wäre ein Pool sich entwickelnder, kindlicher Retinae eine optimale Kontrollprobe, die aus ethischen Gesichtspunkten jedoch verständlicherweise nicht realisierbar war. Bei der Analyse der *TFF*-Expression in der gesunden humanen Retina zeichnete sich ein zu den Retinoblastomzelllinien genau entgegengesetztes Expressionsprofil mit geringer *TFF1*-Expression und deutlicher *TFF3*-Expression ab.

Die Expression von *TFF2* war weder in den untersuchten Retinoblastomzelllinien noch in der gesunden Retina nachweisbar. Dieses Ergebnis hängt möglicherweise mit den strukturellen Unterschieden der *TFF*-Peptide (Monomere versus Dimere bzw. zwei (*TFF2*) versus drei *TFF*-Domänen (*TFF1* und *TFF3*)) zusammen (Thim 1997) oder ist evolutionär bedingt. So wird *TFF2* zum Beispiel als einziges *TFF*-Peptid in der murinen Retina (Paunel-Görgülü *et al.* 2011) oder der Hühnerretina (Jiang *et al.* 2011) exprimiert. Anders als *TFF1* und *TFF3* wird *TFF2* auch nicht in der humanen Kornea, der Konjunktiva oder im Tränenkanal exprimiert (Langer *et al.* 1999; Steven *et al.* 2004; Paulsen und Berry 2006), was vermutlich auch mit der unterschiedlichen Qualität des gebildeten Mukus in Zusammenhang steht (Thim *et al.* 2002).

Um die Expression der *TFF*-Gene in den Retinoblastomzelllinien mit einer geeigneten Positivkontrolle mit nachweislicher Expression aller drei *TFF*-Gene vergleichen zu können, wurden verschiedene Proben des Gastrointestinaltrakts getestet, da die TFF-Peptide vorwiegend in der Schleimhaut exprimiert werden. In einer vorherigen Studie von Paulsen und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass alle drei *TFF*-Gene im humanen Duodenum exprimiert werden (Paulsen *et al.* 2005). Auch in dieser Arbeit konnte mittels RT-PCR sowie *Realtime*-RT-PCR spezifisch die mRNA-Expression aller drei *TFF*-Gene nachgewiesen werden, sodass gesundes humanes Duodenum nachfolgend als Positivkontrolle verwendet wurde.

5.1.2 Korrelation von *TFF*-Expression und Promotormethylierung

Die Regulation der transkriptionellen Expression erfolgt für viele Gene durch epigenetische Prozesse. Sowohl die DNA-Methylierung als auch enzymatische Modifikationen der Histone haben Einfluss auf die Chromatinstruktur und können so die Genaktivität maßgeblich beeinflussen (Jaenisch und Bird 2003). In Tumorzellen wird oft eine Dysregulation dieser Mechanismen beschrieben, die insbesondere die Methylierung der DNA betrifft. Häufig äußert sich dies in einer generellen Demethylierung der gesamten DNA (Feinberg und Vogelstein 1983) sowie punktuellen Neumethylierungen, die vermehrt in Promotorregionen auftreten und zu einer verminderten Genexpression führen können (Jaenisch und Bird 2003).

Um Veränderungen der DNA-Methylierung als mögliche Ursache für die unterschiedliche Stärke der Genexpression in den RB-Tumorzelllinien im Vergleich zur gesunden Retina zu werten, wurde in dieser Arbeit das Methylierungsmuster der drei *TFF*-Promotorregionen analysiert. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen der endogenen *TFF*-Expression und dem Maß an DNA-Methylierung in der jeweiligen Promotorregion hergestellt werden, wobei eine stärkere Methylierung mit einer reduzierten Expression korrelierte und eine geringere Methylierung entsprechend mit erhöhter Expression. Dieser Befund wird durch zwei Studien gestützt, die zeigen, dass die deutlich gesteigerte *TFF1*-Expression in primären Retinoblastomen durch epigenetische Modifikationen der DNA-Methylierung und der Histon-Proteine hervorgerufen wird (Zhang *et al.* 2012; Theriault *et al.* 2014).

Auch für andere Tumore wurde bereits beschrieben, dass die Stärke der DNA-Methylierung mit der *TFF*-Expression korreliert. So basiert die verminderte *TFF1*-Expression in Magenkarzinomzellen weniger auf Mutationen des *TFF1*-Gens, sondern vielmehr auf einer erhöhten Methylierung in der *TFF1*-Promotorregion, weshalb diese auch als Schlüsselmechanismus zur *TFF1*-Inaktivierung angesehen wird (Carvalho *et al.* 2002; Tanaka *et al.* 2013; Feng *et al.* 2014). In einer Studie von Sato und Mitarbeitern konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten *TFF2*-Expression und deutlicher DNA-Hypomethylierung des Gens in Pankreaskarzinomzelllinien hergestellt werden (Sato *et al.* 2003). Auch in Bezug auf die *TFF3*-Expression wird die Methylierung der DNA als ein möglicher Regulationsmechanismus vermutet. In humanen hepatozellulären Karzinomen mit verstärkter *TFF3*-Expression sind einzelne CpG-Dinukleotide in der *TFF3*-Promotorregion hypomethyliert, die in gesunden Gewebeproben mit geringer *TFF3*-Expression methyliert vorliegen (Okada *et al.* 2005).

5.1.3 Einfluss epigenetischer Reagenzien auf den Methylierungsstatus und die *TFF*-Expression

Die Änderung des DNA-Methylierungsmusters ist ein frühes Ereignis in der Entstehung neuer Tumore und kann direkt an die Tochterzellen vererbt werden (Yano *et al.* 2004). Um auch funktionell zu überprüfen, ob die Promotormethylierung direkten Einfluss auf die *TFF*-Expression in Retinoblastomzellen hat, wurden diese im Rahmen dieser Arbeit mit zwei unterschiedlich wirkenden epigenetischen Reagenzien behandelt. Der DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2'-desoxycytidin (5-Aza-dC) wird in Studien zur epigenetischen Genregulation als Demethylierungsreagenz eingesetzt (Jones und Taylor 1980). Es handelt sich dabei um ein Cytosin-Analogon, welches in die DNA eingebaut wird und während des Übertrags von Methylgruppen eine irreversible, kovalente Bindung mit der DNA-Methyltransferase eingeht. Bedingt durch die Inaktivierung der DNA-Methyltransferasen führt dieser Effekt in den nachfolgenden DNA-Replikationen zu einer passiven, genomweiten DNA-Demethylierung, die wiederum zu einer partiellen Reaktivierung der Expression epigenetisch inaktivierter Gene führen kann (Jones und Taylor 1980; Michalowsky und Jones 1987).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Expression von *TFF1* und *TFF3* in Retinoblastomzelllinien nach Behandlung mit 5-Aza-dC erhöht ist, wodurch die These gestützt wird, dass epigenetische Mechanismen an der transkriptionellen Regulation der *TFF*-Genexpression beteiligt sind. Interessanterweise scheint die maximal mögliche Expressionssteigerung mit dem endogenen *TFF*-Level zu korrelieren und umso höher zu sein, je niedriger die basale Expression ist. So war eine signifikante Induktion der *TFF3*-Expression in allen RB-Tumorzelllinien mit geringer endogener *TFF3*-Expression nachweisbar, während die Expression von *TFF1* nur geringfügig steigerbar war. Ähnliche Beobachtungen wurden zuvor in Prostatakarzinomzelllinien mit unterschiedlich starker *TFF*-Expression gemacht. In Zelllinien ohne bzw. minimaler *TFF1*- und *TFF3*-Expression, bedingt durch eine dichte Promotor-methylierung, war eine sehr deutliche Induktion bzw. Steigerung der Expression nach Behandlung mit 5-Aza-dC zu beobachten, während in den Zelllinien mit eindeutig nachweisbarer endogener *TFF*-Expression nur geringe Unterschiede hervorgerufen wurden (Vestergaard *et al.* 2010).

Eine im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Inhibition der DNA-Methyltransferase mittels 5-Aza-dC führte zu einer deutlichen Reduktion der Methylierung in der Promotorregion aller drei *TFF*-Gene mit insgesamt sehr ähnlichem Ausmaß. Dennoch variierte die Stärke der *TFF1*- und *TFF3*-Expression nach Behandlung mit 5-Aza-dC erheblich und eine Aktivierung des in den Retinoblastomzelllinien vollständig inaktivierten *TFF2*-Gens war nicht möglich. Neben der Vermutung, dass die Steigerung der Expression für *TFF1* und *TFF3* von den endogenen Expressionsleveln abhängt, scheint insbesondere die Inaktivierung des *TFF2*-Gens in den Retinoblastomzelllinien nicht durch epigenetische Mechanismen wie der DNA-Methylierung reguliert zu werden.

Neben der DNA-Methylierung wird die Genexpression auch durch die Konformation des Chromatins beeinflusst (siehe auch Kapitel 1.2). Durch Histon-Acetylierung nimmt das Chromatin eine lockere Form an und ermöglicht die aktive Transkription einzelner Gene (Lee *et al.* 1993). Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Histon-Acetylierung auf die *TFF*-Genexpression hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Histon-Deacetylase-Inhibitor β -Phenyl- γ -aminobuttersäure (PBA) eingesetzt. PBA reduziert die Entfernung einzelner Acetylgruppen durch Histon-Deacetylasen, wodurch der aktive Chromatinstatus aufrecht erhalten bleiben soll und so die Genaktivität erhöht wird (Riggs *et al.* 1977; Kim *et al.* 2013).

Für sich betrachtet scheint die Hemmung der Histon-Deacetylierung nur einen geringen Einfluss auf die Aktivierung der *TFF*-Genexpression auszuüben. Die leichte Steigerung der Expression von *TFF1* und *TFF3*, deren Ausmaß auch in diesem Fall mit der endogenen Expression korreliert, wird durch eine leichte Reduktion der Methylierung in der jeweiligen Promotorregion erzielt. Der Effekt einer minimalen Demethylierung nach Behandlung mit Trichostatin A (TSA), einem weiteren Histon-Deacetylase-Inhibitor, wurde bereits für das in der Prostatakarzinomzelllinie MiaPaCa2 methyliert vorliegende Gen *14-3-3 σ* beschrieben (Sato *et al.* 2003). TSA hat jedoch keinen Effekt auf die Methylierung oder Reaktivierung von Genen mit dicht methylierten CpG-Inseln in der Promotorregion (Cameron *et al.* 1999). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die Wirkung des Inhibitors insbesondere von der Anzahl und Dichte der CpG-Dinukleotide in der Promotorregion abhängt (Sato *et al.* 2003). Damit passt diese These gut zu dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Methylierungsmusters nach Behandlung mit PBA, da die Dichte der CpG-Dinukleotide in den *TFF*-Promotorregionen gering ist.

Zur transkriptionellen Inaktivierung können sich die verschiedenen epigenetischen Mechanismen gegenseitig in ihrer Wirkung verstärken. Eine direkte Verbindung zwischen der DNA-Methylierung und der Histon-Deacetylierung besteht durch so genannte Repressormoleküle. Diese binden über eine Methyl-CpG-Bindedomäne mit hoher Affinität an methylierte CpG-Dinukleotide (Hendrich und Bird 1998; Mossman *et al.* 2010) und rekrutieren Histon-Deacetylasekomplexe zur Promotorregion, welche dann die N-terminalen Acetylgruppen der Kernhistone entfernen und zu einer Verdichtung des Chromatins beitragen (Jones *et al.* 1998; Nan *et al.* 1998; Bird und Wolffe 1999).

In der vorliegenden Arbeit wirkte sich die kombinierte Gabe von 5-Aza-dC und PBA verstärkend auf die *TFF1*- und *TFF3*-Expression in den Retinoblastomzelllinien aus. Ein ähnlich synergistischer Effekt einer parallelen Hemmung von DNA-Methyltransferasen und Histon-Deacetylasen auf die Genexpression wurde bereits in vorherigen Publikationen beschrieben (Cameron *et al.* 1999; Sato *et al.* 2003). Auch in der Studie von Cameron und Mitarbeitern wurde die Genaktivierung dabei wesentlich durch die Wirkung von 5-Aza-dC erzielt, während TSA, ähnlich wie PBA in dieser Arbeit, ausschließlich einen Effekt auf die Expression basal exprimierter Gene, nicht aber auf vollständig durch Methylierung inaktivierte Gene hatte (Cameron *et al.* 1999).

Die erhöhte *TFF1*- und *TFF3*-Expression nach Behandlung mit beiden epigenetischen Inhibitoren in der vorliegenden Arbeit spiegelte sich in einer deutlich gesteigerten Demethylierung der entsprechenden Promotorregion wider, die im Vergleich zu dem Effekt nach 5-Aza-dC-Behandlung mehr als verdoppelt war. Auch für diese Beobachtung lässt sich eine mögliche Erklärung im Zusammenspiel beider epigenetischer Mechanismen finden. Durch die zusätzliche Hemmung der Histon-Deacetylase mittels PBA erhöht sich die Zahl acetylierter Histone aufgrund der uneingeschränkten Aktivität von Histon-Acetyltransferasen, wodurch sich zunächst die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der DNA und den Histonen verringern und das Chromatin auflockert (Lee *et al.* 1993). Zusätzlich begünstigt die Acetylierung der Histone die Bindung von DNA-Demethylasen (Cervoni und Szyf 2001), wodurch sich, neben der synergistischen Wirkung mit 5-Aza-dC, auch eine mögliche Begründung für den schwach demethylierenden Effekt in dieser Arbeit nach der Einzelbehandlung mit PBA ergibt.

Die *TFF*-Promotorregionen zählen aufgrund ihres geringen GC-Gehaltes zu den CpG-armen Promotoren (Gardiner-Garden und Frommer 1987), bei denen schon die Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide Auswirkungen auf die Transkription haben kann, indem beispielsweise die Bindung einzelner Transkriptionsfaktoren an die DNA blockiert wird (Bird 2002). Ein Zusammenhang zwischen der Hypomethylierung einzelner CpG-Dinukleotide und der Überexpression von *TFF3* wurde bereits in humanen hepatozellulären Karzinomen beschrieben (Okada *et al.* 2005). Auch die Auswertung der *TFF*-Promotorregionen in den Retinoblastomzelllinien und der humanen Gewebeproben in dieser Arbeit deutet darauf hin, dass die Stärke der *TFF1*- und *TFF3*-Expression direkt mit dem Methylierungsgrad einzelner CpG-Dinukleotide korreliert. Passend zu dieser Annahme, wenn auch unerwartet, war in der *TFF3*-Promotorregion der humanen Retina mit hoher endogener *TFF3*-Expression nur ein einzelnes CpG-Dinukleotid demethyliert. Mit einer deutlich reduzierten Methylierung von 40% war dieses CpG-Dinukleotid auch in der *TFF3*-Promotorregion des humanen Duodenums nachweisbar, wobei neben diesem drei weitere Positionen mit gleichem Ausmaß demethyliert vorlagen. Die unterschiedlich stark ausgeprägte Demethylierung der Promotorregionen beider Gewebeproben mit jeweils starker endogener *TFF3*-Expression basiert möglicherweise auf der Tatsache, dass für die Expressions- und Promotormethylierungsanalysen verschiedene Retinaprobe verwendet wurden.

Nach kombinierter Hemmung von DNA-Methyltransferase und Histon-Deacetylase waren die vier CpG-Dinukleotide nahe des ATG in der *TFF3*-Promotorregion, die auch im humanen Duodenum nur schwach methyliert vorlagen, in der exemplarisch analysierten Retinoblastomzelllinie Y-79 komplett demethyliert. Exakt diese Positionen waren auch in verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien mit nachweisbarer *TFF3*-Expression auf mRNA- und Proteinebene fast vollständig demethyliert (Vestergaard *et al.* 2010). Dies lässt auf eine wichtige Bedeutung dieser Stellen in der transkriptionellen Regulation der *TFF3*-Expression schließen.

5.1.4 Rolle von Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Auch in der *TFF1*-Promotorregion scheint der Grad an Methylierung einiger CpG-Dinukleotide mit der Expression zu korrelieren. Diese befinden sich, ebenso wie drei der vier zuvor erwähnten CpG-Dinukleotide der *TFF3*-Promotorregion, innerhalb der Erkennungssequenz verschiedener Transkriptionsfaktoren. Dazu zählen die potenziellen Bindestellen von E2F, Elk-1, Myc/Max und NF- κ B in der *TFF1*-Promotorregion sowie CREB, SP1 und Elk-1 in der *TFF3*-Promotorregion. Die meisten dieser Transkriptionsfaktoren sind in Regulationsprozesse involviert, die funktionell mit der Kontrolle des Zellzyklus, Differenzierung, Apoptose oder Zellproliferation verknüpft sind (Amati *et al.* 1993; Henriksson und Luscher 1996; Shao *et al.* 1998; Lavia und Jansen-Durr 1999; Wang *et al.* 2013).

Interessanterweise konnte zudem für CREB, E2F, Myc/Max und NF- κ B gezeigt werden, dass deren Bindung an die DNA in Abhängigkeit des Methylierungsstatus erfolgt, womit sie zu den methylierungssensitiven Transkriptionsfaktoren zählen (Bednarik *et al.* 1991; Prendergast und Ziff 1991; Di Fiore *et al.* 1999; Fox *et al.* 2008).

Auch für SP1, für das zuerst angenommen wurde, dass es methylierungsunabhängig an die DNA bindet (Harrington *et al.* 1988), konnte gezeigt werden, dass die Methylierung der ersten beiden Cytosine innerhalb der Erkennungssequenz des Gegenstranges die Bindungsfähigkeit erheblich verringert (Clark *et al.* 1997). Darüber hinaus konnte in einer Studie zur *TFF3*-Expression mit unterschiedlichen Promotor-Konstrukten ein direkter Zusammenhang zwischen der Bindung von SP1 und der gesteigerten Aktivität des *TFF3*-Promotors hergestellt werden, die sich auch in einer erhöhten *TFF3*-Expression widerspiegelt (Sun *et al.* 2014). Zusammen

stützen diese Studien die Annahme dieser Arbeit, dass schon die Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide einen reduzierenden Effekt auf die *TFF3*-Expression haben kann.

Der Transkriptionsfaktor CREB, dessen Bindestelle ebenfalls in der *TFF3*-Promotorregion liegt, hat in Abhängigkeit seines Phosphorylierungsstatus sowohl eine aktivierende als auch reprimierende Wirkung auf die Transkription (Gonzalez *et al.* 1989; Ofir *et al.* 1991). Durch Phosphorylierung des Serins an Position 133 fördert CREB als wichtiges Regulationselement gezielt die Expression von Genen, die an der Differenzierung, Zellproliferation und Viabilität beteiligt sind (Lonze *et al.* 2002; Xiao *et al.* 2010; Wang *et al.* 2013). Ein direkter Zusammenhang zur *TFF3*-Expression ist bislang nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass CREB in Y-79 Retinoblastomzellen durch Stimulation mit rekombinantem TFF3 dephosphoryliert wird, wodurch sich eine mögliche Verbindung zur Wirkung von TFF3 ergibt (siehe auch Kapitel 5.2).

Auch NF- κ B ist in Prozesse involviert, die das Zellüberleben fördern und aktiviert gezielt die Expression anti-apoptotischer Gene wie zum Beispiel Bcl-2 oder Bcl-xL (Dolcet *et al.* 2005; Bassères und Baldwin 2006). In einer immunhistologischen Studie an mehr als 60 verschiedenen Retinoblastomen konnten Qu und Mitarbeiter die Expression von Proteinen der NF- κ B-Familie nachweisen, während in Proben von gesunder Retina kein NF- κ B exprimiert wird (Qu *et al.* 2011). Zudem konnte für die Retinoblastomzelllinien WERI-Rb1 und Y-79 gezeigt werden, dass die Aktivität von NF- κ B essentiell für das Zellüberleben ist, während die Inhibition von NF- κ B zu einer Bax-assoziierten Apoptose-Induktion führt (Poulaki *et al.* 2002) und die Fähigkeit zur Proliferation und Migration vermindert (Li und Li 2015). Inwiefern NF- κ B die Expression oder Funktion der *TFF*-Peptide in den verschiedenen untersuchten Retinoblastomzelllinien beeinflusst, ist nach aktuellem Stand nicht bekannt. Zuvor wurde jedoch beschrieben, dass transient exprimiertes NF- κ B die Expression aller drei *TFF*-Gene in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 durch transkriptionelle Repression reduziert (Dossinger *et al.* 2002; Loncar *et al.* 2003) und auch im Magen wird die Expression von TFF1 durch Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs reduziert (Cobler *et al.* 2013). Ungeklärt ist jedoch, ob die Regulation der Genexpression in Abhängigkeit des Methylierungsgrades erfolgt.

Im Gegensatz zu *TFF1* und *TFF3*, deren Expression in engem Zusammenhang mit der Promotormethylierung steht, scheinen an der vollständigen Inaktivierung des *TFF2*-Gens in der humanen Retina sowie den untersuchten Retinoblastomzelllinien andere Faktoren beteiligt zu sein, welche unabhängig vom Methylierungsstatus Einfluss auf die *TFF2*-Expression haben. Es zeigte sich, dass trotz deutlicher Demethylierung der *TFF2*-Promotorregion nach Behandlung mit 5-Aza-dC eine Induktion der *TFF2*-Genexpression nicht erzielbar war.

Neben der transkriptionellen Regulation können auch post-transkriptionelle Modifikationen die Stabilität der mRNA verändern und darüber die Genexpression beeinflussen. Ein Beispiel für eine solche Regulation sind kleine, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die als mikro RNAs (miRNAs) bezeichnet werden. Diese binden an die kodierende mRNA und destabilisieren das Transkript oder verhindern die Translation, wodurch die Genexpression negativ beeinflusst und darüber hinaus die Bildung des korrespondierenden Proteins reduziert wird (He und Hannon 2004; Reis *et al.* 2012). Mikro RNAs sind nicht nur in viele natürliche biologische Prozesse zur Regulation der Genexpression involviert, sondern auch Bestandteil verschiedener Onkogen- oder Tumorsuppressorgen-assoziiierter Signalwege (Zhao *et al.* 2009; Suzuki *et al.* 2013). Auch in Retinoblastomen wurde bereits eine Dysregulation unterschiedlicher miRNAs beschrieben, die durch Beeinflussung des RB1-Signalweg oder anderen verknüpften Proteinen in möglichem Zusammenhang mit der Entwicklung des Tumors stehen (Dalgard *et al.* 2009; Zhao *et al.* 2009; Conkrite *et al.* 2011). In aktuellen Studien an humanen Magenkarzinomzelllinien konnte ferner gezeigt werden, dass auch die Expression von *TFF1* durch miRNAs wie miR423-5p und miR218-5p reguliert wird, die direkt in der 3'-untranslatierten Region der kodierenden mRNA binden und diese dadurch inaktivieren (Liu *et al.* 2014; Shi *et al.* 2015).

5.1.5 Klinische Relevanz

Die Entwicklung und Progression von Tumoren steht in engem Zusammenhang mit veränderten genetischen und epigenetischen Mechanismen, die sich insbesondere auf die Genexpression auswirken. In der Klinik können solche Veränderungen potenziell als Biomarker verwendet werden. Dabei handelt es sich um nachweisbare Parameter verschiedener Art, die es ermöglichen, pathologische Prozesse zu diagnostizieren, prognostizieren oder Auskunft über die Ansprechbarkeit und

Wirkung therapeutischer Mittel zu geben (Naylor 2003). Neben einer veränderten Genaktivität kann zum Beispiel auch die DNA-Methylierung selbst als Biomarker genutzt werden (Claes *et al.* 2010; Mikeska und Craig 2014).

Bestätigt sich das Ergebnis dieser Arbeit, dass die *TFF1*- und *TFF3*-Expression nicht nur in den analysierten Retinoblastomzelllinien sondern auch in primären Tumoren im Vergleich zum gesunden Retinagewebe abweicht, kann auch der Nachweis der *TFF*-mRNA-Expression langfristig als Biomarker genutzt werden. Da von diesen Veränderungen primär die Tumorzellen selbst betroffen sind, eignet sich der Nachweis jedoch weniger für diagnostische Zwecke. Das eigentliche Potenzial liegt daher vielmehr in der Charakterisierung des Tumors nach Eukleation und zur Langzeitprognose, um beispielsweise Aussagen zur Bildung von Metastasen zu treffen. Auch besteht die Möglichkeit, Hinweise auf ergänzende Therapien zu erhalten. Essentiell ist in jedem Fall die Kenntnis über die Funktion und Wirkung der *TFF*-Peptide in Bezug auf das Zellverhalten (siehe auch Kapitel 5.2).

Durch die Reversibilität epigenetischer Modifikationen käme für *TFF3* beispielsweise neben einer direkten Gabe von rekombinantem *TFF3* möglicherweise auch eine epigenetische Therapie zur Reaktivierung des Gens in Frage. Im Fokus dieser therapeutischen Ansätze steht die Wiederherstellung des normalen epigenetischen Phänotyps durch Behandlung mit verschiedenen epigenetischen Reagenzien (Sharma *et al.* 2010). Die Wirkung dieser Reagenzien betrifft auf Grund ihrer schnellen Teilungsrates Tumorzellen, während sich normal teilende Zellen nur geringfügig betroffen sind (Jones und Baylin 2007; Sharma *et al.* 2010). Verschiedene DNA-Methyltransferase-Hemmer, zu denen auch 5-Aza-dC gehört, werden bereits zur Behandlung akuter und chronischer myeloischer Leukämien eingesetzt (Issa *et al.* 2005; Müller *et al.* 2006; Steensma 2009). Auch Histon-Deacetylase-Inhibitoren besitzen ein mögliches Potenzial als Therapeutikum. Verschiedene Studien zeigen, dass diese spezifisch in Tumorzellen zu einem Wachstumsstopp und Apoptose führen, während die anderen Zellen durch die Behandlung nur minimal beeinflusst werden und häufig nur einen Zellzyklusarrest aufweisen (Insinga *et al.* 2005; Bolden *et al.* 2006; Minucci und Pelicci 2006).

Da die Veränderungen jedoch nur die Tumorzellen selbst betreffen, ist eine systemische Gabe epigenetischer Inhibitoren eher ungeeignet. Eine Möglichkeit zur Behandlung wäre daher eine intravitreale Injektion der Reagenzien in den Glaskörper. Diese Form der Injektion wird bereits zur gezielten Gabe von

Chemotherapeutika genutzt, die speziell gegen die Streuung von Tumorzellen bei fortgeschrittenen Retinoblastomen wirken sollen oder im Rahmen einer Sekundärtherapie bei wiederkehrenden Rezidiven eingesetzt werden (Munier *et al.* 2013; Shields *et al.* 2014). Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die Wirkung von 5-Aza-dC oder auch PBA, nicht spezifisch zur Reaktivierung pathologisch inaktiver Gene genutzt werden kann, sondern möglicherweise auch andere Gene, die unter normalen Bedingungen durch epigenetische Mechanismen inaktiv vorliegen, exprimiert werden oder deren basale Expression ansteigt (Stresemann und Lyko 2008; Hamm *et al.* 2009). Welche Bedeutung diese Therapien in der Behandlung retinaler Tumore einnehmen, muss sich noch zeigen.

5.2 Rolle von TFF3 in Y-79 Retinoblastomzellen

Im Vergleich zur gesunden humanen Retina zeigten die in dieser Arbeit untersuchten Retinoblastomzelllinien eine deutlich reduzierte *TFF3*-Expression, die unter anderem auf Veränderungen der Promotormethylierung zu basieren scheint. Ob sich die Methylierung bereits zu Beginn der Erkrankung verändert und sogar an der Tumorentstehung beteiligt ist oder ob im Verlauf der Entwicklung weitere Faktoren eine Rolle spielen, die letztlich zu diesem Status führen, ist zum aktuellen Zeitpunkt ungeklärt. Da *TFF3* in eine Vielzahl verschiedener biologischer Prozesse involviert ist, die Auswirkungen auf die Zellviabilität, Proliferation, Apoptose und auch Migration haben (Storesund *et al.* 2009), wären beide der gerade genannten Möglichkeiten vorstellbar.

Ziel der Forschung ist es, zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen zu gelangen, die potenziell an der Ausbildung von Retinoblastomen beteiligt sind und deren Dissemination beeinflussen. Die Verwendung von Retinoblastomzelllinien bietet daher neue Ansätze, den Einfluss verschiedener Signalmoleküle auf das Verhalten der Tumorzellen zu untersuchen. Durch funktionelle *in vitro* Analysen sollte im zweiten Teil dieser Arbeit die Bedeutung von *TFF3* auf das Verhalten von Y-79 Retinoblastomzellen analysiert werden. Dazu wurden die Tumorzellen in verschiedenen Versuchsansätzen mit rekombinantem *TFF3* stimuliert sowie eine transiente und stabile *TFF3*-Überexpression induziert.

5.2.1 Einfluss von TFF3 auf Zellviabilität, Apoptose und Zellproliferation

Bedingt durch ihre anti-apoptotische sowie proliferative Wirkung haben alle drei TFF-Peptide eine wichtige Funktion in der Wundheilung und unterstützen den Heilungsprozess zudem durch ihre mitogenen Effekte auf benachbarte Zellen (Hoffmann 2005; Kjellev 2009). Gleichzeitig ist die Resistenz gegenüber Apoptose eines der charakteristischsten Merkmale vieler Tumorzellen (Bassères und Baldwin 2006; Perry *et al.* 2008).

Eine verstärkte Expression von TFF3 ist daher nicht nur während des Heilungsprozesses verletzter Mukosa nachweisbar (Srivastava *et al.* 2015), sondern auch in humanen Magentumoren (Leung *et al.* 2002; Meng *et al.* 2013), Kolonkarzinomen (Uchino *et al.* 2000; Vocka *et al.* 2015), Leberkarzinomen (Khoury *et al.* 2005; Okada *et al.* 2005), Prostatakarzinomen (Luo *et al.* 2001; Faith *et al.* 2004) sowie auch Brust- (May und Westley 1997; Poulsom *et al.* 1997) und Lungenkrebs (Qu *et al.* 2012).

In einer vorherigen Publikation wurde gezeigt, dass sowohl exogen appliziertes TFF3 als auch stabil exprimiertes TFF3 die humanen Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und HT-29 vor einer Apoptoseinduktion durch Serumentzug schützt (Taupin *et al.* 2000). Passend zu diesem Ergebnis wurde die Fähigkeit, Apoptose zu blockieren, auch für murine Kolonkarzinomzelllinien mit hoher endogener TFF3-Expression und nach stabiler TFF3-Überexpression beschrieben (Yio *et al.* 2005). In der stabil transfizierten Brustkarzinomzelllinie MCF-7 fördert TFF3 ebenfalls das Zellüberleben, während eine Antikörper-basierte Inaktivierung von sezerniertem TFF3 Apoptose in den Zellen auslöst (Kannan *et al.* 2010). Zudem führt die per Transfektion verstärkte TFF3-Expression in den Prostatakarzinomzelllinien DU145 und PC3 zu einem deutlichen Anstieg der Zellviabilität (Perera *et al.* 2015).

Entgegen der zuvor genannten Studien war die Viabilität der analysierten Y-79 Retinoblastomzellen in der vorliegenden Arbeit nach Stimulation mit 1 µg/ml und 5 µg/ml rekombinantem TFF3 (rTFF3) deutlich reduziert. Dieser Effekt ließ sich durch eine höhere Konzentration von 10 µg/ml rTFF3 nicht weiter steigern und deutet somit auf einen begrenzten Wirkungsbereich, wie er bereits in einer anderen Studie für TFF1 beschrieben wurde (Prest *et al.* 2002). Es zeigte sich, dass sowohl exogen appliziertes rTFF3 als auch transient und stabil überexprimiertes TFF3 zu einer signifikanten Induktion von Apoptose in Y-79 Retinoblastomzellen führen. Es wäre möglich, dass Retinoblastomzellen durch die im Rahmen der vorliegenden

Dissertation nachgewiesenen, epigenetischen Reduktion der *TFF3*-Expression eine Apoptoseinduktion umgehen.

Um zu prüfen, ob der pro-apoptotische Effekt von *TFF3* auf Y-79 Retinoblastomzellen Caspase-vermittelt ist, wurde Boc-D-Fmk, ein Breitband Caspase-Inhibitor verwendet, in dessen Anwesenheit keine Steigerung der basalen Apoptoserate durch *TFF3* beobachtbar war und somit die Annahme der Beteiligung von Caspasen bestätigt. Erste Immunfluoreszenz-Untersuchungen deuten auf eine Beteiligung von Caspase-3 hin (nicht gezeigte Daten).

Eine pro-apoptotische Wirkung von rekombinantem *TFF3* wurde auch in humanen Chondrozyten nachgewiesen, die passend zu dem Ergebnis dieser Arbeit mit einem signifikanten Anstieg der Caspase 3- und Caspase 7-Aktivität korreliert (Rösler *et al.* 2010). Zudem wurde auch für die humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29, die nach stabiler *TFF3*-Überexpression scheinbar unempfindlicher gegenüber einer induzierten Apoptose ist (Taupin *et al.* 2000), beschrieben, dass rekombinantes *TFF3* zu einer DNA-Fragmentierung und morphologischen Veränderungen der Zellen führt, die charakteristisch für eine Apoptose sind (Efsthathiou *et al.* 1998). Darüber hinaus ergaben Microarray-Analysen an oralen Keratinozyten nach Stimulation mit rekombinantem *TFF3*, dass die Veränderungen in der Transkription sowohl Gene betreffen die an der Regulation von Zelltod beteiligt sind, als auch solche, die das Zellüberleben fördern. Dies lässt vermuten, dass *TFF3* sowohl pro- als auch anti-apoptotische Effekte ausüben kann (Storesund *et al.* 2009).

Zusammen mit der Fähigkeit, Apoptose zu vermeiden, ist eine gesteigerte Proliferation essentiell für das Zellüberleben und Wachstum von Tumoren. In den Tumorzelllinien MCF-7 sowie DU145 und PC3 führt eine stabile *TFF3*-Überexpression nicht nur zu einer Resistenz gegenüber Apoptose, sondern auch zu einem signifikanten Anstieg der Zellproliferation (Kannan *et al.* 2010; Perera *et al.* 2015), wodurch die Tumor-charakteristischen Eigenschaften gefördert werden.

In dieser Arbeit hatte weder rekombinantes noch transient exprimiertes *TFF3* eine Wirkung auf die Proliferationsrate der untersuchten Y-79 Retinoblastomzellen. Ähnliche Beobachtungen wurden zuvor an humanen oralen Keratinozyten nach Stimulation mit rekombinantem *TFF3* (Storesund *et al.* 2008) sowie für die murine Kolonkarzinomzelllinie LP nach stabiler *TFF3*-Überexpression gemacht (Yio *et al.* 2005). Eine Reduktion der Proliferation war in einer humanen kornealen Epithelzelllinie nach Stimulation mit rekombinantem *TFF3* nachweisbar (Schulze *et*

al. 2014). In der vorliegenden Arbeit war nach stabiler TFF3-Überexpression ein leichter, aber nicht signifikanter pro-proliferativer Effekt in Y-79 Retinoblastomzellen nachweisbar und auch die Wachstumsrate war im Vergleich zu den Kontrollzellen tendenziell erhöht. Diese Effekte spiegeln sich möglicherweise auch in der nur leicht reduzierten Zellviabilität wider und bewirken einen Ausgleich der deutlichen Apoptoseinduktion nach TFF3-Überexpression. Die Kombination eines pro-apoptotischen und pro-proliferativen Effekts wurde bereits für TFF2 in der murinen Retina beobachtet (Paunel-Görgülü *et al.* 2011).

5.2.2 Einfluss von TFF3 auf die Invasivität

Ein weiteres typisches Merkmal vieler Tumorzellen, welches stark mit deren Invasivität korreliert, ist die Fähigkeit, kontaktunabhängig zu wachsen. Bei normalen Zellen führt der Verlust von Zell-Zell-Kontakten hingegen in der Regel zur Apoptoseinduktion (Carney *et al.* 1980; Chiarugi und Giannoni 2005). In vorherigen Studien wurde beschrieben, dass Y-79 Retinoblastomzellen nur bedingt fähig sind, Kolonien in halbfestem Standardmedium auszubilden (McFall *et al.* 1977) und das zumindest kleine Aggregate von zwei bis zehn Zellen zur Ausbildung größerer Kolonien nötig sind (Griegel *et al.* 1990). In einer aktuellen Studie unserer Arbeitsgruppe war auch nach vollständiger Vereinzelung von Y-79 Retinoblastomzellen eine Ausbildung von Zellaggregaten in Soft-Agarose beobachtbar (Busch *et al.* 2015).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass dieses Potenzial in Y-79 Retinoblastomzellen mit stabiler TFF3-Überexpression leicht vermindert ist und die Zellaggregate durchschnittlich etwas kleiner als die der Kontrollzellen sind. Passend dazu führt die Überexpression von TFF3 auch in der humanen Kolonkarzinomzelllinie LoVo ohne endogene TFF3-Expression zu reduziertem Wachstum und zur Ausbildung von kleineren Kolonien in 3D-Kollagengelen (Uchino *et al.* 2000). Auch in diesem Punkt unterscheidet sich das Verhalten der Y-79 Retinoblastomzellen von dem der zuvor erwähnten Brustkarzinomzellen und Prostatakarzinomzellen, bei denen TFF3 die Fähigkeit unabhängig zu wachsen verstärkt und zudem die Invasivität und auch das Migrationspotenzial der Zellen erhöht (Kannan *et al.* 2010; Perera *et al.* 2015).

Zellmigration ist ein essentieller Faktor in der Wundheilung. Alle drei TFF-Peptide haben eine mitogene Wirkung auf benachbarte Zellen und stimulieren die Zellwanderung zum verletzten Bereich (Wright *et al.* 1997; Kinoshita *et al.* 2000; Hoffmann 2005). Gleichzeitig stellt die Migrationsfähigkeit einen kritischen Punkt in der Tumorprogression dar, indem die Ausbildung von Metastasen begünstigt wird.

In ersten Versuchen zur Wirkung von TFF3 auf das Migrations- und Invasivitätsverhalten von Retinoblastomzellen wurden GFP-markierte Y-79 Retinoblastomzellen mit stabiler TFF3-Überexpression sowie markierte Kontrollzellen in einem *in ovo* Hühnchen-Chorioallantoismembran (CAM)-Modell getestet (Busch *et al.* 2015). Mit Hilfe dieses *in vivo* Modellsystems können die Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zu migrieren oder metastasieren analysiert werden (Zijlstra *et al.* 2002; Palmer *et al.* 2011). Erste Auswertungen ergaben keine signifikanten Unterschiede im Migrationsverhalten nach stabiler TFF3-Überexpression (nicht gezeigte Daten). In weiteren Studien muss dieses Ergebnis verifiziert werden.

5.2.3 Potenziell beteiligte Signalwege

Für erste Hinweise, welche Signalmoleküle potenziell an den TFF3-medierten Effekten auf Y-79 Retinoblastomzellen beteiligt sind, wurde ein Phosphokinase-Array durchgeführt, der den Phosphorylierungsstatus unterschiedlicher Regulationsmoleküle nach Stimulation mit rTFF3 wiedergibt. Die Auswahl des Array bezog sich auf Untersuchungen vorheriger Studien, die der Aktivierung des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR) und der daraufhin aktivierten Proteinkinasen eine wichtige Bedeutung in der Funktionsausübung der TFF-Peptide beimessen (Emami *et al.* 2004; Baus-Loncar und Giraud 2005). Passend dazu zeigte die Auswertung des Arrays in dieser Arbeit eine phosphorylierungsbedingte Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2 und p38, für die zuvor eine mögliche Bedeutung in der TFF3-vermittelten Regulation von Wachstum und Proliferation beschrieben wurde (Peng *et al.* 2003; Storesund *et al.* 2009). So führt die Aktivierung von ERK1/2 nach Stimulation mit TFF3 sowohl zu einer gesteigerten Proliferation als auch zur Migration in einer primären Kultur humaner Magenendothelzellen (Lin *et al.* 2015). Ein Effekt auf die Migration, nicht aber auf die Zellproliferation, wurde hingegen in oralen Keratinozyten nach Stimulation mit rekombinantem TFF3 und Phosphorylierung von ERK1/2 beobachtet (Storesund *et al.* 2008). Auch für die in dieser Arbeit untersuchten Y-79 Retinoblastomzellen hatte die Zugabe von rTFF3

keine Wirkung auf die Proliferation, während jedoch ein minimal pro-proliferativer Effekt nach transienter TFF3-Überexpression nachweisbar war. Zukünftige Untersuchungen zur Migrationsfähigkeit sind daher durchaus sinnvoll, um die Wirkung von TFF3 weiter zu differenzieren.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die beiden Untereinheiten der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) $\alpha 1$ und $\alpha 2$ nach Stimulation mit rTFF3 ebenfalls aktiviert vorliegen. Die AMPK fungiert in eukaryotischen Zellen als Energiesensor und reguliert die Proliferation und das Wachstum der Zellen. Durch die AMPK-bedingte Aktivierung verschiedener Tumorsuppressorgene, zu denen auch p53 zählt, wird ein Zellzyklusarrest induziert, der schließlich mit verminderter Proliferation einhergeht (Motoshima *et al.* 2006). Dabei umgeht der AMPK-Signalweg unterschiedliche, wachstumsfördernde Faktoren, zu denen auch zelluläre Proto-Onkogene gehören (Motoshima *et al.* 2006; Du *et al.* 2008). Bedingt durch die Wirkung weiterer Faktoren und mit Änderung des zellulären Umfeldes wurde auch ein möglicher pro-proliferativer Effekt der AMPK in Astrozytomen mit konstitutiver Expression des Onkogens *HRas*^{V12} beschrieben (Rios *et al.* 2013). Inwiefern die Aktivierung der AMPK die Wirkung von TFF3 auf Y-79 Retinoblastomzellen bezüglich ihres Proliferationsverhaltens tatsächlich beeinflusst ist aktuell ungeklärt.

Ferner zeigte die Auswertung des in dieser Arbeit durchgeführten Array eine deutliche Dephosphorylierung der WNK1-Kinase. WNK1 gehört, wie auch ERK1/2 und p38, zur Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen, deren Aktivität positiv durch Phosphorylierung reguliert wird. Im aktivierten Zustand interagiert WNK1 mit Kinasen des ERK5-Signalwegs und fördert die Zellproliferation. Gleichzeitig ist eine reduzierte Aktivität mit erhöhten Apoptoseleveln assoziiert, weshalb sie auch als *survival*-Kinase bezeichnet wird (Moniz und Jordan 2010). Die Inaktivierung der WNK1-Kinase korreliert daher gut mit der in dieser Arbeit beschriebenen Wirkung von TFF3.

In verschiedenen Studien wurde vermerkt, dass für den anti-apoptotischen Effekt von TFF3, beispielsweise nach Verletzung der Mukosa, eine Aktivierung des EGF-Rezeptors essentiell ist (Kinoshita *et al.* 2000; Taupin *et al.* 2000). Eine direkte Bindung von TFF3 an den Rezeptor hat sich jedoch nicht bestätigt, weshalb von einer indirekten Aktivierung ausgegangen wird (Baus-Loncar und Giraud 2005). Passend zu dem pro-apoptotischen Effekt von TFF3 auf Y-79 Retinoblastomzellen

war eine phosphorylierungsbedingte Aktivierung des EGFR in dem in dieser Arbeit eingesetzten Array nicht nachweisbar.

Die nachweisbare Reduktion der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB passt ebenfalls zum beschriebenen pro-apoptotischen Effekt von TFF3 in dieser Arbeit. Im phosphorylierten Zustand aktiviert CREB die Transkription von Genen wie Bcl-2, Bcl-xL und TNF- α , die sich positiv auf das Zellüberleben auswirken (Hui *et al.* 2014; Naqvi *et al.* 2014), während eine Reduktion in der Expression oder die Dephosphorylierung des Serins an Position 133 sowohl mit einer Apoptoseinduktion als auch mit der Inhibition von Proliferation einhergeht (Sakamoto und Frank 2009; Xiao *et al.* 2010). Ein stark dephosphorylierender Effekt von rekombinantem TFF3 auf CREB war auch in oralen Kerationozyten nachweisbar (Storesund *et al.* 2009). Zudem ist CREB einer der Transkriptionsfaktoren, dessen Bindestelle in der *TFF3*-Promotorregion mit einer variierenden CpG-Methylierung in Zusammenhang steht.

Insbesondere durch seine pro-apoptotische Wirkung auf Y-79 Retinoblastomzellen und der potenziell verminderten Fähigkeit der Zellen, Einzelkolonien in Soft-Agarose auszubilden, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass es sich bei TFF3 eventuell um ein Tumorsuppressorgen handelt, welches in den Retinoblastomzelllinien durch epigenetische Veränderungen herabreguliert ist. Welchen Einfluss TFF3 jedoch auf primäre Retinoblastome oder die gesunde humane Retina hat, ist zum aktuellen Zeitpunkt noch unbekannt. Da es sich um ein sezerniertes Peptid handelt, muss zudem untersucht werden, ob bestimmte Zelltypen der Retina besonders empfindlich auf Veränderungen der TFF3-Expressionsstärke reagieren und welche Auswirkungen die Stimulation zeigt. Dieses Wissen kann dazu beitragen, weiteres Verständnis über die Entstehung von Retinoblastomen zu erlangen und die Möglichkeit einer TFF3-basierten Therapie zu eröffnen.

6 Zusammenfassung

Trefoil factor family (TFF) Peptide, die vorwiegend in der Schleimhaut exprimiert werden und dort eine wichtige Rolle in der Wundheilung spielen, werden auch im zentralen Nervensystem sowie in einer Vielzahl verschiedener Tumore exprimiert und beeinflussen das Apoptose- und Proliferationsverhalten von Zellen. Die Regulation der *TFF*-Expression in Tumorzelllinien, etabliert aus Retinoblastomen, den häufigsten malignen, intraokularen Tumoren des frühen Kindesalters, sowie die Effekte von *TFF*-Peptiden auf diese Zellen sind bisher noch nicht untersucht worden.

Expressionsanalysen in acht humanen Retinoblastomzelllinien aus uni- und bilateralen Tumoren zeigten eine deutliche *TFF1*-Expression, während *TFF3* nur minimal exprimiert wird. In der gesunden humanen Retina war die Expression mit niedrigen *TFF1*-Leveln und starker *TFF3*-Expression genau gegensätzlich. In engem Zusammenhang mit einer Veränderung der Genexpression stehen epigenetische Modifikationen wie DNA-Methylierung oder Histon-Deacetylierung. Promotoranalysen im Rahmen dieser Arbeit ergaben eine Korrelation zwischen den endogenen *TFF*-mRNA-Leveln in Retinoblastomzelllinien und der Dichte der Methylierung in der korrespondierenden Promotorregion. Dabei ist eine dichte Methylierung mit niedriger Genexpression assoziiert, während eine geringe Methylierung die Genexpression steigert. Der direkte Einfluss von Promotormethylierung und Histon-Deacetylierung auf die *TFF*-Expression konnte in Inhibierungsstudien mit dem DNA-Methyltransferasehemmer 5-Aza-2'-desoxycytidin und dem Histon-Deacetylase-Inhibitor β -Phenyl- γ -aminobuttersäure bestätigt werden.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Wirkung von TFF3 auf das Wachstum, die Zellviabilität sowie das Apoptose- und Proliferationsverhalten von Y-79 Retinoblastomzellen untersucht. Funktionelle Studien nach Applikation von humanem rekombinanten TFF3 sowie nach transienter und stabiler, lentiviraler TFF3-Überexpression zeigten ein vermindertes Zellwachstum und eine deutliche Reduktion der Zellviabilität, die sich in einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate der Zellen widerspiegelte.

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Regulationsmechanismen der *TFF*-Expression und zur Rolle von TFF3 in Retinoblastomzellen und damit einen ersten Schritt in Richtung neuer, TFF-basierter Therapieansätze für das Retinoblastom.

7 Abstract

Trefoil factor family (TFF) peptides, predominantly expressed in mucous epithelia and playing an important role in wound healing, are also expressed in the central nervous system as well as in numerous tumors and have been shown to effect apoptosis and cell proliferation. The regulation of *TFF*-expression in tumor cell lines established from retinoblastomas, the most common malignant intraocular tumors in early childhood, as well as the impact of *TFF*-peptides on retinoblastoma cells have not been investigated so far.

Gene expression studies in eight human retinoblastoma cell lines derived from uni- and bilateral tumors demonstrated clear *TFF1*-expression, whereas *TFF3*-expression was low. By contrast, only weak *TFF1*-expression levels and high *TFF3*-expression was observed in the healthy human retina. Epigenetic modifications such as DNA-methylation or histone-deacetylation are in close relation with changes in gene expression. Promoter methylation studies performed in the present thesis clearly indicate a correlation between endogenous *TFF*-mRNA level in retinoblastoma cell lines and methylation status of the corresponding promoter region, whereby a higher degree of methylation is associated with low gene expression and low methylation increases gene expression. Epigenetic inhibition studies using the DNA-methyltransferase inhibitor 5-Aza-2`deoxycytidine and the histone-deacetylase inhibitor 4-Phenylbutyric acid revealed a direct effect of promoter methylation and histone-deacetylation on *TFF*-expression.

The second part of the present thesis deals with the influence of TFF3 on Y-79 retinoblastoma cell growth, cell viability, apoptosis and proliferation levels. Functional studies demonstrated reduced cell growth and a clear reduction in cell viability due to a significant pro-apoptotic effect after application of human recombinant TFF3 as well as after transient and stable, lentiviral TFF3-overexpression.

Taken together, the present thesis provides insights in epigenetic regulatory mechanisms of *TFF*-expression and reveals an important role of TFF3 in retinoblastoma cells behavior, providing new starting points for TFF-based retinoblastoma therapies.

8 Literaturverzeichnis

- Ahmed A. R., Griffiths A. B., Tilby M. T., Westley B. R. und May F. E. (2012) TFF3 is a normal breast epithelial protein and is associated with differentiated phenotype in early breast cancer but predisposes to invasion and metastasis in advanced disease. Am J Pathol **180**(3): 904-916.
- Allfrey V. G., Faulkner R. und Mirsky A. E. (1964) Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A **51**: 786-794.
- Amati B., Littlewood T. D., Evan G. I. und Land H. (1993) The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. EMBO J **12**(13): 5083-5087.
- Bassères D. S. und Baldwin A. S. (2006) Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. Oncogene **25**(51): 6817-6830.
- Baus-Loncar M. und Giraud A. S. (2005) Multiple regulatory pathways for trefoil factor (TFF) genes. Cell Mol Life Sci **62**(24): 2921-2931.
- Beck S., Sommer P., dos Santos Silva E., Blin N. und Gott P. (1999) Hepatocyte nuclear factor 3 (winged helix domain) activates trefoil factor gene TFF1 through a binding motif adjacent to the TATAA box. DNA Cell Biol **18**(2): 157-164.
- Bednarik D. P., Duckett C., Kim S. U., Perez V. L., Griffis K., Guenther P. C. und Folks T. M. (1991) DNA CpG methylation inhibits binding of NF-kappa B proteins to the HIV-1 long terminal repeat cognate DNA motifs. New Biol **3**(10): 969-976.
- Benavente C. A. und Dyer M. A. (2015) Genetics and epigenetics of human retinoblastoma. Annu Rev Pathol **10**: 547-562.
- Bernard P. und Couturier M. (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. J Mol Biol **226**(3): 735-745.
- Bernstein H. G., Dobrowolny H., Trubner K., Steiner J., Bogerts B. und Hoffmann W. (2015) Differential regional and cellular distribution of TFF3 peptide in the human brain. Amino Acids.
- Biel M., Wascholowski V. und Giannis A. (2005) Epigenetics--an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. Angew Chem Int Ed Engl **44**(21): 3186-3216.
- Bird A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev **16**(1): 6-21.
- Bird A. (2007) Perceptions of epigenetics. Nature **447**(7143): 396-398.
- Bird A. P. und Wolffe A. P. (1999) Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. Cell **99**(5): 451-454.
- Biswas J., Mani B., Shanmugam M. P., Patwardhan D., Kumar K. S. und Badrinath S. S. (2000) Retinoblastoma in adults. Report of three cases and review of the literature. Surv Ophthalmol **44**(5): 409-414.

- Bogenmann E., Lochrie M. A. und Simon M. I. (1988) Cone cell-specific genes expressed in retinoblastoma. Science **240**(4848): 76-78.
- Bolden J. E., Peart M. J. und Johnstone R. W. (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. Nat Rev Drug Discov **5**(9): 769-784.
- Bonkhoff H., Stein U., Welter C. und Remberger K. (1995) Differential expression of the pS2 protein in the human prostate and prostate cancer: association with premalignant changes and neuroendocrine differentiation. Hum Pathol **26**(8): 824-828.
- Bossenmeyer-Pourie C., Kannan R., Ribieras S., Wendling C., Stoll I., Thim L., Tomasetto C. und Rio M. C. (2002) The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. J Cell Biol **157**(5): 761-770.
- Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B. und Behr J. P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7297-7301.
- Brehm A., Miska E. A., McCance D. J., Reid J. L., Bannister A. J. und Kouzarides T. (1998) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. Nature **391**(6667): 597-601.
- Bremner R. und Sage J. (2014) Cancer: The origin of human retinoblastoma. Nature **514**(7522): 312-313.
- Buron N., Guery L., Creuzot-Garcher C., Lafontaine P. O., Bron A., Rio M. C. und Solary E. (2008) Trefoil factor TFF1-induced protection of conjunctival cells from apoptosis at premitochondrial and postmitochondrial levels. Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(9): 3790-3798.
- Busch M., Philippeit C., Weise A. und Dünker N. (2015) Re-characterization of established human retinoblastoma cell lines. Histochem Cell Biol **143**(3): 325-338.
- Cameron E. E., Bachman K. E., Myohanen S., Herman J. G. und Baylin S. B. (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. Nat Genet **21**(1): 103-107.
- Campeau E., Ruhl V. E., Rodier F., Smith C. L., Rahmberg B. L., Fuss J. O., Campisi J., Yaswen P., Cooper P. K. und Kaufman P. D. (2009) A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. PLoS One **4**(8): e6529.
- Carney D. N., Gazdar A. F. und Minna J. D. (1980) Positive correlation between histological tumor involvement and generation of tumor cell colonies in agarose in specimens taken directly from patients with small-cell carcinoma of the lung. Cancer Res **40**(6): 1820-1823.
- Cartharius K., Frech K., Grote K., Klocke B., Haltmeier M., Klingenhoff A., Frisch M., Bayerlein M. und Werner T. (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. Bioinformatics **21**(13): 2933-2942.
- Carvalho R., Kayademir T., Soares P., Canedo P., Sousa S., Oliveira C., Leistenschneider P., Seruca R., Gott P., Blin N., Carneiro F. und Machado J. C. (2002) Loss of heterozygosity and promoter methylation, but not mutation, may underlie loss of TFF1 in gastric carcinoma. Lab Invest **82**(10): 1319-1326.

- Cervoni N. und Szyf M. (2001) Demethylase activity is directed by histone acetylation. J Biol Chem **276**(44): 40778-40787.
- Chen D., Livne-bar I., Vanderluit J. L., Slack R. S., Agochiya M. und Bremner R. (2004) Cell-specific effects of RB or RB/p107 loss on retinal development implicate an intrinsically death-resistant cell-of-origin in retinoblastoma. Cancer Cell **5**(6): 539-551.
- Chiarugi P. und Giannoni E. (2005) Anchorage-dependent cell growth: tyrosine kinases and phosphatases meet redox regulation. Antioxid Redox Signal **7**(5-6): 578-592.
- Chinery R., Williamson J. und Poulson R. (1996) The gene encoding human intestinal trefoil factor (TFF3) is located on chromosome 21q22.3 clustered with other members of the trefoil peptide family. Genomics **32**(2): 281-284.
- Choi J. D. und Lee J. S. (2013) Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. Genomics Inform **11**(4): 164-173.
- Claes B., Buyschaert I. und Lambrechts D. (2010) Pharmaco-epigenomics: discovering therapeutic approaches and biomarkers for cancer therapy. Heredity (Edinb) **105**(1): 152-160.
- Clark S. J., Harrison J. und Molloy P. L. (1997) Sp1 binding is inhibited by (m)Cp(m)CpG methylation. Gene **195**(1): 67-71.
- Cobler L., Mejias-Luque R., Garrido M., Pera M., Badia-Garrido E. und de Bolos C. (2013) Activation of the NF- κ B pathway downregulates TFF-1 in gastric carcinogenesis. Virchows Arch **463**(4): 497-507.
- Conkrite K., Sundby M., Mukai S., Thomson J. M., Mu D., Hammond S. M. und MacPherson D. (2011) miR-17~92 cooperates with RB pathway mutations to promote retinoblastoma. Genes Dev **25**(16): 1734-1745.
- Coulondre C., Miller J. H., Farabaugh P. J. und Gilbert W. (1978) Molecular basis of base substitution hotspots in Escherichia coli. Nature **274**(5673): 775-780.
- Counts J. L. und Goodman J. I. (1995) Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. Cell **83**(1): 13-15.
- Dalgard C. L., Gonzalez M., deNiro J. E. und O'Brien J. M. (2009) Differential microRNA-34a expression and tumor suppressor function in retinoblastoma cells. Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(10): 4542-4551.
- Davis B. J. (1964) Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. Ann N Y Acad Sci **121**: 404-427.
- Di Fiore B., Palena A., Felsani A., Palitti F., Caruso M. und Lavia P. (1999) Cytosine methylation transforms an E2F site in the retinoblastoma gene promoter into a binding site for the general repressor methylcytosine-binding protein 2 (MeCP2). Nucleic Acids Res **27**(14): 2852-2859.
- DiCiommo D., Gallie B. L. und Bremner R. (2000) Retinoblastoma: the disease, gene and protein provide critical leads to understand cancer. Semin Cancer Biol **10**(4): 255-269.
- Dolcet X., Llobet D., Pallares J. und Matias-Guiu X. (2005) NF- κ B in development and progression of human cancer. Virchows Arch **446**(5): 475-482.

- Dossinger V., Kayademir T., Blin N. und Gott P. (2002) Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors. Cell Physiol Biochem **12**(4): 197-206.
- Du J., Guan T., Zhang H., Xia Y., Liu F. und Zhang Y. (2008) Inhibitory crosstalk between ERK and AMPK in the growth and proliferation of cardiac fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun **368**(2): 402-407.
- DuBridge R. B., Tang P., Hsia H. C., Leong P. M., Miller J. H. und Calos M. P. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. Mol Cell Biol **7**(1): 379-387.
- Dyer M. A. und Bremner R. (2005) The search for the retinoblastoma cell of origin. Nat Rev Cancer **5**(2): 91-101.
- Efstathiou J. A., Noda M., Rowan A., Dixon C., Chinery R., Jawhari A., Hattori T., Wright N. A., Bodmer W. F. und Pignatelli M. (1998) Intestinal trefoil factor controls the expression of the adenomatous polyposis coli-catenin and the E-cadherin-catenin complexes in human colon carcinoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3122-3127.
- Ehrlich M. (2003) Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. J Cell Biochem **88**(5): 899-910.
- Emami S., Le Floch N., Bruyneel E., Thim L., May F., Westley B., Rio M., Mareel M. und Gespach C. (2001) Induction of scattering and cellular invasion by trefoil peptides in src- and RhoA-transformed kidney and colonic epithelial cells. FASEB J **15**(2): 351-361.
- Emami S., Rodrigues S., Rodrigue C. M., Le Floch N., Rivat C., Attoub S., Bruyneel E. und Gespach C. (2004) Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. Peptides **25**(5): 885-898.
- Esteller M. und Herman J. G. (2002) Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. J Pathol **196**(1): 1-7.
- Faith D. A., Isaacs W. B., Morgan J. D., Fedor H. L., Hicks J. L., Mangold L. A., Walsh P. C., Partin A. W., Platz E. A., Luo J. und De Marzo A. M. (2004) Trefoil factor 3 overexpression in prostatic carcinoma: prognostic importance using tissue microarrays. Prostate **61**(3): 215-227.
- Feinberg A. P. und Vogelstein B. (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. Nature **301**(5895): 89-92.
- Feng G., Zhang Y., Yuan H., Bai R., Zheng J., Zhang J. und Song M. (2014) DNA methylation of trefoil factor 1 (TFF1) is associated with the tumorigenesis of gastric carcinoma. Mol Med Rep **9**(1): 109-117.
- Fox K. E., Colton L. A., Erickson P. F., Friedman J. E., Cha H. C., Keller P., MacDougald O. A. und Klemm D. J. (2008) Regulation of cyclin D1 and Wnt10b gene expression by cAMP-responsive element-binding protein during early adipogenesis involves differential promoter methylation. J Biol Chem **283**(50): 35096-35105.
- Friend S. H., Bernards R., Rogelj S., Weinberg R. A., Rapaport J. M., Albert D. M. und Dryja T. P. (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature **323**(6089): 643-646.

- Frommer M., McDonald L. E., Millar D. S., Collis C. M., Watt F., Grigg G. W., Molloy P. L. und Paul C. L. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci U S A **89**(5): 1827-1831.
- Gallie B. L., Ellsworth R. M., Abramson D. H. und Phillips R. A. (1982) Retinoma: spontaneous regression of retinoblastoma or benign manifestation of the mutation? Br J Cancer **45**(4): 513-521.
- Gardiner-Garden M. und Frommer M. (1987) CpG islands in vertebrate genomes. J Mol Biol **196**(2): 261-282.
- Göke M. N., Cook J. R., Kunert K. S., Fini M. E., Gipson I. K. und Podolsky D. K. (2001) Trefoil peptides promote restitution of wounded corneal epithelial cells. Exp Cell Res **264**(2): 337-344.
- Gonzalez G. A., Yamamoto K. K., Fischer W. H., Karr D., Menzel P., Biggs W., 3rd, Vale W. W. und Montminy M. R. (1989) A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. Nature **337**(6209): 749-752.
- Gonzalogo M. L. und Jones P. A. (1997) Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. Mutat Res **386**(2): 107-118.
- Gonzalo S. und Blasco M. A. (2005) Role of Rb family in the epigenetic definition of chromatin. Cell Cycle **4**(6): 752-755.
- Greger V., Passarge E., Hopping W., Messmer E. und Horsthemke B. (1989) Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. Hum Genet **83**(2): 155-158.
- Grewal S. I. und Moazed D. (2003) Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. Science **301**(5634): 798-802.
- Griegel S., Hong C., Frotschl R., Hulser D. F., Greger V., Horsthemke B. und Rajewsky M. F. (1990) Newly established human retinoblastoma cell lines exhibit an "immortalized" but not an invasive phenotype in vitro. Int J Cancer **46**(1): 125-132.
- Griepentrog T., Bauer M., Hornstein C., Sauer H. und Jirikowski G. F. (2000) Coexistence of intestinal trefoil factor (hITF) and oxytocin in magnocellular neurons in the human hypothalamus. Horm Metab Res **32**(4): 121-124.
- Hamm C. A., Xie H., Costa F. F., Vanin E. F., Seftor E. A., Sredni S. T., Bischof J., Wang D., Bonaldo M. F., Hendrix M. J. und Soares M. B. (2009) Global demethylation of rat chondrosarcoma cells after treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine results in increased tumorigenicity. PLoS One **4**(12): e8340.
- Harrington M. A., Jones P. A., Imagawa M. und Karin M. (1988) Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. Proc Natl Acad Sci U S A **85**(7): 2066-2070.
- Hartmann L., Neveling K., Borkens S., Schneider H., Freund M., Grassman E., Theiss S., Wawer A., Burdach S., Auerbach A. D., Schindler D., Hanenberg H. und Schaal H. (2010) Correct mRNA processing at a mutant TT splice donor in FANCC ameliorates the clinical phenotype in patients and is enhanced by delivery of suppressor U1 snRNAs. Am J Hum Genet **87**(4): 480-493.
- He L. und Hannon G. J. (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet **5**(7): 522-531.

- Hendrich B. und Bird A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. Mol Cell Biol **18**(11): 6538-6547.
- Henriksson M. und Luscher B. (1996) Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. Adv Cancer Res **68**: 109-182.
- Hinz M., Schwegler H., Chwieralski C. E., Laube G., Linke R., Pohle W. und Hoffmann W. (2004) Trefoil factor family (TFF) expression in the mouse brain and pituitary: changes in the developing cerebellum. Peptides **25**(5): 827-832.
- Hirota M., Awatsuji H., Sugihara Y., Miyashita S., Furukawa Y. und Hayashi K. (1995) Expression of pS2 gene in rat brain. Biochem Mol Biol Int **35**(5): 1079-1084.
- Hoffmann W. (2005) Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. Cell Mol Life Sci **62**(24): 2932-2938.
- Hoffmann W. und Jagla W. (2002) Cell type specific expression of secretory TFF peptides: colocalization with mucins and synthesis in the brain. Int Rev Cytol **213**: 147-181.
- Hoffmann W., Jagla W. und Wiede A. (2001) Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. Histol Histopathol **16**(1): 319-334.
- Holliday R. (1987) The inheritance of epigenetic defects. Science **238**(4824): 163-170.
- Hui K., Yang Y., Shi K., Luo H., Duan J., An J., Wu P., Ci Y., Shi L. und Xu C. (2014) The p38 MAPK-regulated PKD1/CREB/Bcl-2 pathway contributes to selenite-induced colorectal cancer cell apoptosis in vitro and in vivo. Cancer Lett **354**(1): 189-199.
- Insinga A., Monestiroli S., Ronzoni S., Gelmetti V., Marchesi F., Viale A., Altucci L., Nervi C., Minucci S. und Pelicci P. G. (2005) Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. Nat Med **11**(1): 71-76.
- Issa J. P., Gharibyan V., Cortes J., Jelinek J., Morris G., Verstovsek S., Talpaz M., Garcia-Manero G. und Kantarjian H. M. (2005) Phase II study of low-dose decitabine in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to imatinib mesylate. J Clin Oncol **23**(17): 3948-3956.
- Jaenisch R. und Bird A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat Genet **33** **Suppl**: 245-254.
- Jagla W., Wiede A., Dietzmann K., Rutkowski K. und Hoffmann W. (2000) Co-localization of TFF3 peptide and oxytocin in the human hypothalamus. FASEB J **14**(9): 1126-1131.
- Jehanne M., Brisse H., Gauthier-Villars M., Lumbroso-le Rouic L., Freneaux P. und Aerts I. (2014) Retinoblastoma: recent advances. Bull Cancer **101**(4): 380-387.
- Jeltsch J. M., Roberts M., Schatz C., Garnier J. M., Brown A. M. und Chambon P. (1987) Structure of the human oestrogen-responsive gene pS2. Nucleic Acids Res **15**(4): 1401-1414.
- Jiang Z., Lossie A. C. und Applegate T. J. (2011) Evolution of trefoil factor(s): genetic and spatio-temporal expression of trefoil factor 2 in the chicken (*Gallus gallus domesticus*). PLoS One **6**(7): e22691.

- Jones P. A. und Baylin S. B. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet **3**(6): 415-428.
- Jones P. A. und Baylin S. B. (2007) The epigenomics of cancer. Cell **128**(4): 683-692.
- Jones P. A. und Taylor S. M. (1980) Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. Cell **20**(1): 85-93.
- Jones P. L., Veenstra G. J., Wade P. A., Vermaak D., Kass S. U., Landsberger N., Strouboulis J. und Wolffe A. P. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nat Genet **19**(2): 187-191.
- Kannan N., Kang J., Kong X., Tang J., Perry J. K., Mohankumar K. M., Miller L. D., Liu E. T., Mertani H. C., Zhu T., Grandison P. M., Liu D. X. und Lobie P. E. (2010) Trefoil factor 3 is oncogenic and mediates anti-estrogen resistance in human mammary carcinoma. Neoplasia **12**(12): 1041-1053.
- Khoury T., Chadha K., Javle M., Donohue K., Levea C., Iyer R., Okada H., Nagase H. und Tan D. (2005) Expression of intestinal trefoil factor (TFF-3) in hepatocellular carcinoma. Int J Gastrointest Cancer **35**(3): 171-177.
- Kim S. W., Hooker J. M., Otto N., Win K., Muench L., Shea C., Carter P., King P., Reid A. E., Volkow N. D. und Fowler J. S. (2013) Whole-body pharmacokinetics of HDAC inhibitor drugs, butyric acid, valproic acid and 4-phenylbutyric acid measured with carbon-11 labeled analogs by PET. Nucl Med Biol **40**(7): 912-918.
- Kinoshita K., Taupin D. R., Itoh H. und Podolsky D. K. (2000) Distinct pathways of cell migration and antiapoptotic response to epithelial injury: structure-function analysis of human intestinal trefoil factor. Mol Cell Biol **20**(13): 4680-4690.
- Kjellev S. (2009) The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities. Cell Mol Life Sci **66**(8): 1350-1369.
- Knudson A. G., Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-823.
- Kornberg R. D. und Lorch Y. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. Cell **98**(3): 285-294.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**(5259): 680-685.
- Langer G., Jagla W., Behrens-Baumann W., Walter S. und Hoffmann W. (1999) Secretory peptides TFF1 and TFF3 synthesized in human conjunctival goblet cells. Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(10): 2220-2224.
- Lavia P. und Jansen-Durr P. (1999) E2F target genes and cell-cycle checkpoint control. Bioessays **21**(3): 221-230.
- Lee D. Y., Hayes J. J., Pruss D. und Wolffe A. P. (1993) A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. Cell **72**(1): 73-84.
- Leung W. K., Yu J., Chan F. K., To K. F., Chan M. W., Ebert M. P., Ng E. K., Chung S. C., Malfertheiner P. und Sung J. J. (2002) Expression of trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) in gastric carcinomas, intestinal metaplasia, and non-neoplastic gastric tissues. J Pathol **197**(5): 582-588.

- Li E., Bestor T. H. und Jaenisch R. (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell **69**(6): 915-926.
- Li P. und Li Z. (2015) Effects of NF-kappaB and hypoxia on the biological behavior of Y79 retinoblastoma cells. Int J Clin Exp Pathol **8**(2): 1725-1730.
- Lin J., Sun Z., Zhang W., Liu H., Shao D., Ren Y., Wen Y., Cao L., Wolfram J., Yang Z. und Nie S. (2015) Protective effects of intestinal trefoil factor (ITF) on gastric mucosal epithelium through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). Mol Cell Biochem **404**(1-2): 263-270.
- Liu J., Wang X., Yang X., Liu Y., Shi Y., Ren J. und Guleng B. (2014) miRNA423-5p regulates cell proliferation and invasion by targeting trefoil factor 1 in gastric cancer cells. Cancer Lett **347**(1): 98-104.
- Loncar M. B., Al-zazeh E. D., Sommer P. S., Marinovic M., Schmehl K., Kruschewski M., Blin N., Stohwasser R., Gott P. und Kayademir T. (2003) Tumour necrosis factor alpha and nuclear factor kappaB inhibit transcription of human TFF3 encoding a gastrointestinal healing peptide. Gut **52**(9): 1297-1303.
- Lonze B. E., Riccio A., Cohen S. und Ginty D. D. (2002) Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. Neuron **34**(3): 371-385.
- Lottspeich F. und Engels J. W. (2006a). Hybridisierung und Nachweistechiken. Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag: 707-709.
- Lottspeich F. und Engels J. W. (2006b). Analyse der genomischen DNA-Methylierung. Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag: 823.
- Luo J., Duggan D. J., Chen Y., Sauvageot J., Ewing C. M., Bittner M. L., Trent J. M. und Isaacs W. B. (2001) Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. Cancer Res **61**(12): 4683-4688.
- Madreperla S. A., Bookstein R., Jones O. W. und Lee W. H. (1991) Retinoblastoma cell lines Y79, RB355 and WERI-Rb27 are genetically related. Ophthalmic Paediatr Genet **12**(1): 49-56.
- Mancini D. N., Singh S. M., Archer T. K. und Rodenhiser D. I. (1999) Site-specific DNA methylation in the neurofibromatosis (NF1) promoter interferes with binding of CREB and SP1 transcription factors. Oncogene **18**(28): 4108-4119.
- Martins R. A. und Pearson R. A. (2008) Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. Brain Res **1192**: 37-60.
- May F. E. (2012) The potential of trefoil proteins as biomarkers in human cancer. Biomark Med **6**(3): 301-304.
- May F. E., Church S. T., Major S. und Westley B. R. (2003) The closely related estrogen-regulated trefoil proteins TFF1 and TFF3 have markedly different hydrodynamic properties, overall charge, and distribution of surface charge. Biochemistry **42**(27): 8250-8259.
- May F. E. und Westley B. R. (1997) Expression of human intestinal trefoil factor in malignant cells and its regulation by oestrogen in breast cancer cells. J Pathol **182**(4): 404-413.
- McFall R. C., Sery T. W. und Makadon M. (1977) Characterization of a new continuous cell line derived from a human retinoblastoma. Cancer Res **37**(4): 1003-1010.

- Meng J. R., Tang H. Z., Zhou K. Z., Shen W. H. und Guo H. Y. (2013) TFF3 and survivin expressions associate with a lower survival rate in gastric cancer. Clin Exp Med **13**(4): 297-303.
- Michalowsky L. A. und Jones P. A. (1987) Differential nuclear protein binding to 5-azacytosine-containing DNA as a potential mechanism for 5-aza-2'-deoxycytidine resistance. Mol Cell Biol **7**(9): 3076-3083.
- Mikeska T. und Craig J. M. (2014) DNA methylation biomarkers: cancer and beyond. Genes (Basel) **5**(3): 821-864.
- Miki T., Park J. A., Nagao K., Murayama N. und Horiuchi T. (1992) Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in Escherichia coli. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress letD (ccdB) product growth inhibition. J Mol Biol **225**(1): 39-52.
- Minucci S. und Pelicci P. G. (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. Nat Rev Cancer **6**(1): 38-51.
- Miranda T. B. und Jones P. A. (2007) DNA methylation: the nuts and bolts of repression. J Cell Physiol **213**(2): 384-390.
- Moniz S. und Jordan P. (2010) Emerging roles for WNK kinases in cancer. Cell Mol Life Sci **67**(8): 1265-1276.
- Mossman D., Kim K. T. und Scott R. J. (2010) Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine in colorectal cancer cells targets genomic DNA whilst promoter CpG island methylation persists. BMC Cancer **10**: 366.
- Motoshima H., Goldstein B. J., Igata M. und Araki E. (2006) AMPK and cell proliferation--AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. J Physiol **574**(Pt 1): 63-71.
- Müller C. I., Ruter B., Koeffler H. P. und Lubbert M. (2006) DNA hypermethylation of myeloid cells, a novel therapeutic target in MDS and AML. Curr Pharm Biotechnol **7**(5): 315-321.
- Munier F. L., Gaillard M. C., Balmer A. und Beck-Popovic M. (2013) Intravitreal chemotherapy for vitreous seeding in retinoblastoma: Recent advances and perspectives. Saudi J Ophthalmol **27**(3): 147-150.
- Nan X., Ng H. H., Johnson C. A., Laherty C. D., Turner B. M., Eisenman R. N. und Bird A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. Nature **393**(6683): 386-389.
- Naqvi S., Martin K. J. und Arthur J. S. (2014) CREB phosphorylation at Ser133 regulates transcription via distinct mechanisms downstream of cAMP and MAPK signalling. Biochem J **458**(3): 469-479.
- Naylor S. (2003) Biomarkers: current perspectives and future prospects. Expert Rev Mol Diagn **3**(5): 525-529.
- Neugut A. I. und Weinstein I. B. (1979) The use of agarose in the determination of anchorage-independent growth. In Vitro **15**(5): 351-355.
- Ofir R., Dwarki V. J., Rashid D. und Verma I. M. (1991) CREB represses transcription of fos promoter: role of phosphorylation. Gene Expr **1**(1): 55-60.
- Ohtani-Fujita N., Dryja T. P., Rapaport J. M., Fujita T., Matsumura S., Ozasa K., Watanabe Y., Hayashi K., Maeda K., Kinoshita S., Matsumura T., Ohnishi Y., Hotta Y., Takahashi R., Kato M. V., Ishizaki K., Sasaki M. S., Horsthemke B.,

- Minoda K. und Sakai T. (1997) Hypermethylation in the retinoblastoma gene is associated with unilateral, sporadic retinoblastoma. Cancer Genet Cytogenet **98**(1): 43-49.
- Okada H., Kimura M. T., Tan D., Fujiwara K., Igarashi J., Makuuchi M., Hui A. M., Tsurumaru M. und Nagase H. (2005) Frequent trefoil factor 3 (TFF3) overexpression and promoter hypomethylation in mouse and human hepatocellular carcinomas. Int J Oncol **26**(2): 369-377.
- Okano M., Xie S. und Li E. (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. Nat Genet **19**(3): 219-220.
- Orime K., Shirakawa J., Togashi Y., Tajima K., Inoue H., Ito Y., Sato K., Nakamura A., Aoki K., Goshima Y. und Terauchi Y. (2013) Trefoil factor 2 promotes cell proliferation in pancreatic beta-cells through CXCR-4-mediated ERK1/2 phosphorylation. Endocrinology **154**(1): 54-64.
- Palmer T. D., Lewis J. und Zijlstra A. (2011) Quantitative analysis of cancer metastasis using an avian embryo model. J Vis Exp(51).
- Paulsen F., Varoga D., Paulsen A. und Tsokos M. (2005) Trefoil factor family (TFF) peptides of normal human Vater's ampulla. Cell Tissue Res **321**(1): 67-74.
- Paulsen F. P. und Berry M. S. (2006) Mucins and TFF peptides of the tear film and lacrimal apparatus. Prog Histochem Cytochem **41**(1): 1-53.
- Paulsen F. P., Woon C. W., Varoga D., Jansen A., Garreis F., Jager K., Amm M., Podolsky D. K., Steven P., Barker N. P. und Sel S. (2008) Intestinal trefoil factor/TFF3 promotes re-epithelialization of corneal wounds. J Biol Chem **283**(19): 13418-13427.
- Paunel-Görgülü A. N., Franke A. G., Paulsen F. P. und Dünker N. (2011) Trefoil factor family peptide 2 acts pro-proliferative and pro-apoptotic in the murine retina. Histochem Cell Biol **135**(5): 461-473.
- Peng X., Wang S. L., You Z. Y. und Wang P. (2003) Experimental study on the effects of intestinal trefoil factor on intestinal epithelial proliferation and its signal transduction mechanism. Zhonghua Shao Shang Za Zhi **19**(5): 285-288.
- Perera O., Evans A., Pertziger M., MacDonald C., Chen H., Liu D. X., Lobie P. E. und Perry J. K. (2015) Trefoil factor 3 (TFF3) enhances the oncogenic characteristics of prostate carcinoma cells and reduces sensitivity to ionising radiation. Cancer Lett **361**(1): 104-111.
- Perry J. K., Kannan N., Grandison P. M., Mitchell M. D. und Lobie P. E. (2008) Are trefoil factors oncogenic? Trends Endocrinol Metab **19**(2): 74-81.
- Philippeit C., Busch M. und Dünker N. (2014) Epigenetic control of trefoil factor family (TFF) peptide expression in human retinoblastoma cell lines. Cell Physiol Biochem **34**(3): 1001-1014.
- Podolsky D. K., Lynch-Devaney K., Stow J. L., Oates P., Murgue B., DeBeaumont M., Sands B. E. und Mahida Y. R. (1993) Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. J Biol Chem **268**(9): 6694-6702.
- Poulaki V., Mitsiades C. S., Jousseaume A. M., Lappas A., Kirchhof B. und Mitsiades N. (2002) Constitutive nuclear factor-kappaB activity is crucial for human retinoblastoma cell viability. Am J Pathol **161**(6): 2229-2240.

- Poulsom R., Hanby A. M., Lalani E. N., Hauser F., Hoffmann W. und Stamp G. W. (1997) Intestinal trefoil factor (TFF 3) and pS2 (TFF 1), but not spasmolytic polypeptide (TFF 2) mRNAs are co-expressed in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast epithelium. J Pathol **183**(1): 30-38.
- Prendergast G. C. und Ziff E. B. (1991) Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. Science **251**(4990): 186-189.
- Prest S. J., May F. E. und Westley B. R. (2002) The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells. FASEB J **16**(6): 592-594.
- Probst J. C., Zetzsche T., Weber M., Theilemann P., Skutella T., Landgraf R. und Jirikowski G. F. (1996) Human intestinal trefoil factor is expressed in human hypothalamus and pituitary: evidence for a novel neuropeptide. FASEB J **10**(13): 1518-1523.
- Qu Y., Yang Y., Ma D. und Xiao W. (2012) Increased trefoil factor 3 levels in the serum of patients with three major histological subtypes of lung cancer. Oncol Rep **27**(4): 1277-1283.
- Qu Y., Zhou F., Dai X., Wang H., Shi J., Zhang X., Wang Y. und Wei W. (2011) Clinicopathologic significances of nuclear expression of nuclear factor-kappaB transcription factors in retinoblastoma. J Clin Pathol **64**(8): 695-700.
- Reid T. W., Albert D. M., Rabson A. S., Russell P., Craft J., Chu E. W., Tralka T. S. und Wilcox J. L. (1974) Characteristics of an established cell line of retinoblastoma. J Natl Cancer Inst **53**(2): 347-360.
- Reis A. H., Vargas F. R. und Lemos B. (2012) More epigenetic hits than meets the eye: microRNAs and genes associated with the tumorigenesis of retinoblastoma. Front Genet **3**: 284.
- Riggs M. G., Whittaker R. G., Neumann J. R. und Ingram V. M. (1977) n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. Nature **268**(5619): 462-464.
- Rios M., Foretz M., Viollet B., Prieto A., Fraga M., Costoya J. A. und Senaris R. (2013) AMPK activation by oncogenesis is required to maintain cancer cell proliferation in astrocytic tumors. Cancer Res **73**(8): 2628-2638.
- Robertson K. D. (2005) DNA methylation and human disease. Nat Rev Genet **6**(8): 597-610.
- Robertson K. D., Ait-Si-Ali S., Yokochi T., Wade P. A., Jones P. L. und Wolffe A. P. (2000) DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. Nat Genet **25**(3): 338-342.
- Rodriguez-Galindo C., Chantada G. L., Haik B. G. und Wilson M. W. (2007) Treatment of retinoblastoma: current status and future perspectives. Curr Treat Options Neurol **9**(4): 294-307.
- Rodriguez-Galindo C., Orbach D. B. und VanderVeen D. (2015) Retinoblastoma. Pediatr Clin North Am **62**(1): 201-223.
- Roehm N. W., Rodgers G. H., Hatfield S. M. und Glasebrook A. L. (1991) An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. J Immunol Methods **142**(2): 257-265.
- Rösler S., Haase T., Claassen H., Schulze U., Schicht M., Riemann D., Brandt J., Wohlrab D., Muller-Hilke B., Goldring M. B., Sel S., Varoga D., Garreis F. und

- Paulsen F. P. (2010) Trefoil factor 3 is induced during degenerative and inflammatory joint disease, activates matrix metalloproteinases, and enhances apoptosis of articular cartilage chondrocytes. Arthritis Rheum **62**(3): 815-825.
- Rushlow D. E., Mol B. M., Kennett J. Y., Yee S., Pajovic S., Theriault B. L., Prigoda-Lee N. L., Spencer C., Dimaras H., Corson T. W., Pang R., Massey C., Godbout R., Jiang Z., Zacksenhaus E., Paton K., Moll A. C., Houdayer C., Raizis A., Halliday W., Lam W. L., Boutros P. C., Lohmann D., Dorsman J. C. und Gallie B. L. (2013) Characterisation of retinoblastomas without RB1 mutations: genomic, gene expression, and clinical studies. Lancet Oncol **14**(4): 327-334.
- Saheb A., Patterson S. und Josowicz M. (2014) Probing for DNA methylation with a voltammetric DNA detector. Analyst **139**(4): 786-792.
- Sakamoto K. M. und Frank D. A. (2009) CREB in the pathophysiology of cancer: implications for targeting transcription factors for cancer therapy. Clin Cancer Res **15**(8): 2583-2587.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.
- Sato N., Maitra A., Fukushima N., van Heek N. T., Matsubayashi H., Iacobuzio-Donahue C. A., Rosty C. und Goggins M. (2003) Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Res **63**(14): 4158-4166.
- Schorpp M., Jager R., Schellander K., Schenkel J., Wagner E. F., Weiher H. und Angel P. (1996) The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice. Nucleic Acids Res **24**(9): 1787-1788.
- Schulze U., Hampel U., Sel S., Contreras-Ruiz L., Schicht M., Dieckow J., Diebold Y. und Paulsen F. (2014) Trefoil factor family peptide 3 (TFF3) is upregulated under experimental conditions similar to dry eye disease and supports corneal wound healing effects in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci **55**(5): 3037-3042.
- Shao N., Chai Y., Cui J. Q., Wang N., Aysola K., Reddy E. S. und Rao V. N. (1998) Induction of apoptosis by Elk-1 and deltaElk-1 proteins. Oncogene **17**(4): 527-532.
- Sharifzadeh M., Ghassemi F., Amoli F. A., Rahmanikhah E. und Tabatabaie S. Z. (2014) Retinoblastoma in adults: a case report and literature review. J Ophthalmic Vis Res **9**(3): 388-391.
- Sharma S., Kelly T. K. und Jones P. A. (2010) Epigenetics in cancer. Carcinogenesis **31**(1): 27-36.
- Shi Y., Chen G. B., Huang Q. W., Chen X., Liu J. J., Xu W., Huang X. X., Liu Y. P., Xiao C. X., Wu D. C., Guleng B. und Ren J. L. (2015) miR218-5p regulates the proliferation of gastric cancer cells by targeting TFF1 in an Erk1/2-dependent manner. Biochim Biophys Acta **1852**(5): 970-979.
- Shields C. L., Lally S. E., Leahey A. M., Jabbour P. M., Caywood E. H., Schwendeman R. und Shields J. A. (2014) Targeted retinoblastoma management: when to use intravenous, intra-arterial, periocular, and intravitreal chemotherapy. Curr Opin Ophthalmol **25**(5): 374-385.
- Shuman S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. J Biol Chem **269**(51): 32678-32684.

- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. und Klenk D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem **150**(1): 76-85.
- Spruck C., Sun D., Fiegl H., Marth C., Mueller-Holzner E., Goebel G., Widschwendter M. und Reed S. I. (2006) Detection of low molecular weight derivatives of cyclin E1 is a function of cyclin E1 protein levels in breast cancer. Cancer Res **66**(14): 7355-7360.
- Srivastava S., Kedia S., Kumar S., Pratap Mouli V., Dhingra R., Sachdev V., Tiwari V., Kurrey L., Pradhan R. und Ahuja V. (2015) Serum Human Trefoil Factor 3 is a Biomarker for Mucosal Healing in Ulcerative Colitis Patients with Minimal Disease Activity. J Crohns Colitis.
- Steensma D. P. (2009) Decitabine treatment of patients with higher-risk myelodysplastic syndromes. Leuk Res **33 Suppl 2**: S12-17.
- Stegmeier F., Hu G., Rickles R. J., Hannon G. J. und Elledge S. J. (2005) A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A **102**(37): 13212-13217.
- Steven P., Schafer G., Nolle B., Hinz M., Hoffmann W. und Paulsen F. (2004) Distribution of TFF peptides in corneal disease and pterygium. Peptides **25**(5): 819-825.
- Storesund T., Hayashi K., Kolltveit K. M., Bryne M. und Schenck K. (2008) Salivary trefoil factor 3 enhances migration of oral keratinocytes. Eur J Oral Sci **116**(2): 135-140.
- Storesund T., Schenck K., Osmundsen H., Roed A., Helgeland K. und Kolltveit K. M. (2009) Signal transduction and gene transcription induced by TFF3 in oral keratinocytes. Eur J Oral Sci **117**(5): 511-517.
- Stresemann C. und Lyko F. (2008) Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. Int J Cancer **123**(1): 8-13.
- Sun Y., Wang L., Zhou Y., Mao X. und Deng X. (2014) Cloning and characterization of the human trefoil factor 3 gene promoter. PLoS One **9**(4): e95562.
- Suzuki H., Maruyama R., Yamamoto E. und Kai M. (2013) Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer. Front Genet **4**: 258.
- Tanaka T., Nakamura J., Kitajima Y., Kai K., Miyake S., Hiraki M., Ide T., Koga Y. und Noshiro H. (2013) Loss of trefoil factor 1 is regulated by DNA methylation and is an independent predictive factor for poor survival in advanced gastric cancer. Int J Oncol **42**(3): 894-902.
- Taupin D. R., Kinoshita K. und Podolsky D. K. (2000) Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 799-804.
- Terris B., Dubois S., Buisine M. P., Sauvanet A., Ruszniewski P., Aubert J. P., Porchet N., Couvelard A., Degott C. und Flejou J. F. (2002) Mucin gene expression in intraductal papillary-mucinous pancreatic tumours and related lesions. J Pathol **197**(5): 632-637.
- Theriault B. L., Dimaras H., Gallie B. L. und Corson T. W. (2014) The genomic landscape of retinoblastoma: a review. Clin Experiment Ophthalmol **42**(1): 33-52.

- Thim L. (1989) A new family of growth factor-like peptides. 'Trefoil' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). FEBS Lett **250**(1): 85-90.
- Thim L. (1997) Trefoil peptides: from structure to function. Cell Mol Life Sci **53**(11-12): 888-903.
- Thim L., Madsen F. und Poulsen S. S. (2002) Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. Eur J Clin Invest **32**(7): 519-527.
- Thim L. und May F. E. (2005) Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. Cell Mol Life Sci **62**(24): 2956-2973.
- Tomasetto C., Rockel N., Mattei M. G., Fujita R. und Rio M. C. (1992) The gene encoding the human spasmolytic protein (SML1/hSP) is in 21q 22.3, physically linked to the homologous breast cancer marker gene BCE1/pS2. Genomics **13**(4): 1328-1330.
- Towbin H., Staehelin T. und Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Uchino H., Kataoka H., Itoh H., Hamasuna R. und Kono M. (2000) Overexpression of intestinal trefoil factor in human colon carcinoma cells reduces cellular growth in vitro and in vivo. Gastroenterology **118**(1): 60-69.
- Vestergaard E. M., Nexø E., Tørring N., Borre M., Orntoft T. F. und Sørensen K. D. (2010) Promoter hypomethylation and upregulation of trefoil factors in prostate cancer. Int J Cancer **127**(8): 1857-1865.
- Vocka M., Langer D., Petrtyl J., Vockova P., Hanus T., Kalousova M., Zima T. und Petruzalka L. (2015) Trefoil factor family (TFF) proteins as potential serum biomarkers in patients with metastatic colorectal cancer. Neoplasma **62**(3): 470-477.
- Wachsman J. T. (1997) DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. Mutat Res **375**(1): 1-8.
- Wang P., Huang S., Wang F., Ren Y., Hehir M., Wang X. und Cai J. (2013) Cyclic AMP-response element regulated cell cycle arrests in cancer cells. PLoS One **8**(6): e65661.
- Watt F. und Molloy P. L. (1988) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. Genes Dev **2**(9): 1136-1143.
- Weise A. und Dünker N. (2013) High trefoil factor 1 (TFF1) expression in human retinoblastoma cells correlates with low growth kinetics, increased cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor levels and a selective down-regulation of CDK6. Histochem Cell Biol **139**(2): 323-338.
- Westley B. R., Griffin S. M. und May F. E. (2005) Interaction between TFF1, a gastric tumor suppressor trefoil protein, and TFIZ1, a brichos domain-containing protein with homology to SP-C. Biochemistry **44**(22): 7967-7975.
- Wink M. (2004). Klonierungsverfahren. Molekulare Biotechnologie: Konzepte und Methoden, WILEY-VCH Verlag: 214-215.

- Wright N. A., Hoffmann W., Otto W. R., Rio M. C. und Thim L. (1997) Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. FEBS Lett **408**(2): 121-123.
- Xiao X., Li B. X., Mitton B., Ikeda A. und Sakamoto K. M. (2010) Targeting CREB for cancer therapy: friend or foe. Curr Cancer Drug Targets **10**(4): 384-391.
- Xu X. L., Fang Y., Lee T. C., Forrest D., Gregory-Evans C., Almeida D., Liu A., Jhanwar S. C., Abramson D. H. und Cobrinik D. (2009) Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends upon cone-specific MDM2 signaling. Cell **137**(6): 1018-1031.
- Xu X. L., Singh H. P., Wang L., Qi D. L., Poulos B. K., Abramson D. H., Jhanwar S. C. und Cobrinik D. (2014) Rb suppresses human cone-precursor-derived retinoblastoma tumours. Nature **514**(7522): 385-388.
- Yano T., Ito F., Kobayashi K., Yonezawa Y., Suzuki K., Asano R., Hagiwara K., Nakazawa H., Toma H. und Yamasaki H. (2004) Hypermethylation of the CpG island of connexin 32, a candidate tumor suppressor gene in renal cell carcinomas from hemodialysis patients. Cancer Lett **208**(2): 137-142.
- Yio X., Zhang J. Y., Babyatsky M., Chen A., Lin J., Fan Q. X., Werther J. L. und Itzkowitz S. (2005) Trefoil factor family-3 is associated with aggressive behavior of colon cancer cells. Clin Exp Metastasis **22**(2): 157-165.
- Yousef Y. A., Istetieh J., Nawaiseh I., Al-Hussaini M., Alrawashdeh K., Jaradat I., Sultan I. und Mehyar M. (2014) Resistant retinoblastoma in a 23-year-old patient. Oman J Ophthalmol **7**(3): 138-140.
- Zhang J., Benavente C. A., McEvoy J., Flores-Otero J., Ding L., Chen X., Ulyanov A., Wu G., Wilson M., Wang J., Brennan R., Rusch M., Manning A. L., Ma J., Easton J., Shurtleff S., Mullighan C., Pounds S., Mukatira S., Gupta P., Neale G., Zhao D., Lu C., Fulton R. S., Fulton L. L., Hong X., Dooling D. J., Ochoa K., Naeve C., Dyson N. J., Mardis E. R., Bahrami A., Ellison D., Wilson R. K., Downing J. R. und Dyer M. A. (2012) A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses. Nature **481**(7381): 329-334.
- Zhang X., Zheng L., Gao F. und Dong F. (2015) Adult onset retinoblastoma: a case report. Chin Med J (Engl) **128**(1): 133-134.
- Zhao J. J., Yang J., Lin J., Yao N., Zhu Y., Zheng J., Xu J., Cheng J. Q., Lin J. Y. und Ma X. (2009) Identification of miRNAs associated with tumorigenesis of retinoblastoma by miRNA microarray analysis. Childs Nerv Syst **25**(1): 13-20.
- Zhu X., Dunn J. M., Goddard A. D., Squire J. A., Becker A., Phillips R. A. und Gallie B. L. (1992) Mechanisms of loss of heterozygosity in retinoblastoma. Cytogenet Cell Genet **59**(4): 248-252.
- Zijlstra A., Mellor R., Panzarella G., Aimes R. T., Hooper J. D., Marchenko N. D. und Quigley J. P. (2002) A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. Cancer Res **62**(23): 7083-7092.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dünker für die Bereitstellung dieses interessanten Themas bedanken und der Möglichkeit, unter ihrer Leitung daran zu arbeiten. Ihr großes Interesse an meinen Ergebnissen sowie zahlreiche wissenschaftliche Diskussionen und ihre konstruktive Kritik haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Für die ständige Motivation und Förderung bin ich überaus dankbar.

Ich möchte mich zudem bei allen Kollegen unserer Arbeitsgruppe bedanken, die mich während meiner Laborzeit unterstützt haben und mit ihren wertvollen Ratschlägen zum Erfolg dieser Arbeit beigesteuert haben.

Besonders möchte ich mich bei Ursula Gerster und Ulrike Laub bedanken, die mir nicht nur während der Einarbeitungsphase eine große Hilfe waren, sondern auch an dem raschen Fortschritt meiner Versuche mitgewirkt haben.

Bei Dagmar Gioè möchte ich mich für die Unterstützung bei der Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen und beim Zurechtfinden im Bürokratiedschungel bedanken.

Bei Frau Dr. Maike Busch bedanke ich mich ganz herzlich für die gute Stimmung im Büro, viele ausgiebige Gespräche und produktive Diskussionen, in denen ich noch vieles lernen konnte. Ihre Tipps und Anregungen bezüglich neuer Klonierungsstrategien haben mir sehr geholfen. Danke für die konstruktive Kritik und gute Zusammenarbeit.

Bei den Medizindoktoranden Rebekka Doliva und Patrick Müller bedanke ich mich für die Gelegenheit, mein praktisches Laborwissen weitergeben zu dürfen und für zahlreiche lustige Momente im Büro und Labor, die uns den Alltag versüßten.

Herrn Dr. Harald Stephan aus der Klinik für Kinderheilkunde danke ich für die Bereitstellung der Retinoblastomzelllinien und die hilfreichen Tipps bezüglich ihrer Kultivierung.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und meiner Familie die fortwährend für mich da waren und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben. Ich danke für ihre aufbauenden Worte in schwierigen Momenten, ihre stetige Motivation und ihre immerwährende Liebe. Besonders danke ich meinem Mann Marc Winter, der mich während der gesamten Zeit vorangetrieben und immer wieder geerdet hat.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Zur Regulation der Genexpression von *Trefoil Factor Family* (TFF) Peptiden in humanen Retinoblastomzelllinien und zur Bedeutung von TFF3 für das Zellverhalten“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Claudia Winter, M.Sc. befürworte.

Essen, den _____

Prof. Dr. rer. nat. Nicole Dünker

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Claudia Winter, M.Sc.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Claudia Winter, M.Sc.