

4 Ergebnisse

4.1 Expression von FLAG-getagtem hTFF3 in stabil transfizierten epithelialen Zellen

4.1.1 Stabile Transfektion von HT29/B6 und MDCK-Zellen mit pFLAG-hTFF3

Als Modellsystem zur Untersuchung der Wirkung von hTFF3 auf epitheliale Zellen wurden die gut charakterisierten epithelialen Zelllinien HT29/B6 und MDCK gewählt. Beide Zelllinien wurden mit dem Expressionsvektor pFLAG-hTFF3 transfiziert, der humanes hTFF3 mit einem durch den Vektor codierten Preprotrypsin-Signalpeptid (MSALLILALVGAAVA) zusammen mit dem FLAG-Tag Peptid (DYKDDDDK) exprimiert. Als Kontrolle wurden HT29/B6- und MDCK-Zellen mit dem Leervektor pFLAG-CMV3 transfiziert. Nach der Selektionierung mit G418 wurden stabil transfizierte Klone isoliert und weiterkultiviert.

Um die stabile Integration der FLAG-hTFF3 kodierenden DNA in das Wirtsgenom und die hieraus resultierende Expression von FLAG-hTFF3-mRNA zu bestätigen, wurde aus verschiedenen Einzelklonen die Gesamt-RNA extrahiert und hieraus über spezifische Primer-Oligonukleotide FLAG-hTFF3-mRNA mit Hilfe einer RT-PCR amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt durch Agarose-Gelelektrophoresen nachgewiesen (Abb. 4-1).

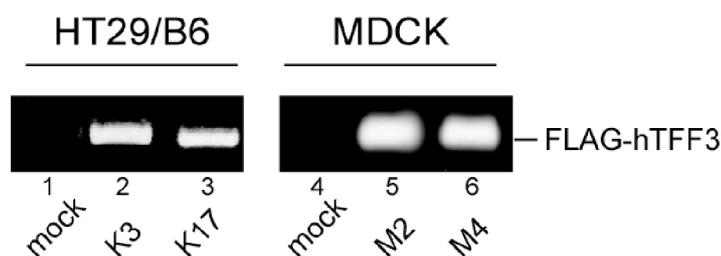


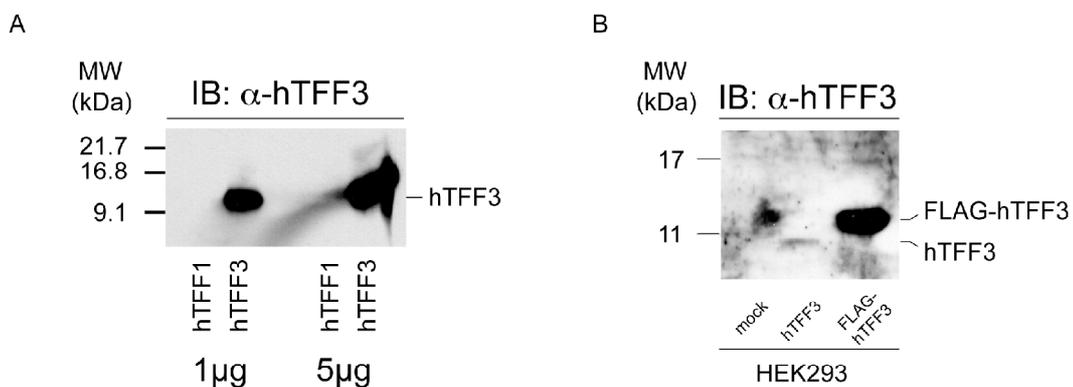
Abb. 4-1: Expressionsnachweis von FLAG-hTFF3. Die mRNA für FLAG-hTFF3 in stabil transfizierten HT29/B6- und MDCK-Klonen wurde über RT-PCR nachgewiesen: Lane 1/4: mit Leerplasmid transfizierte HT29/B6- bzw. MDCK-Klone; Lane 2/3: FLAG-hTFF3-transfizierte HT29/B6-Klone; Lane 5/6: FLAG-hTFF3-transfizierte MDCK-Klone.

Für die weiteren Experimente wurden zwei FLAG-hTFF3-transfizierte HT29/B6-Klone (K3 und K17), zwei FLAG-hTFF3-transfizierte MDCK-Klone (M2 und M4) sowie jeweils ein mit dem Leerplasmid transfizierter Klon (mock) als Kontrolle ausgewählt.

4.1.2 Nachweis des FLAG-getagten hTFF3-Peptids

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die jeweiligen FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6- und MDCK-Klone tatsächlich das FLAG-hTFF3-Fusionsprotein exprimieren und sekretieren. Für den Nachweis wurden zwei verschiedene Antikörper eingesetzt: i) ein neu generierter monoklonaler anti-hTFF3 Antikörper und ii) der gegen das FLAG-Peptid gerichtete monoklonale anti-FLAG-M2 Antikörper.

Es wurden monoklonale Antikörper gegen das folgende Peptid generiert: GluGluTyr ValGlyLeuSerAlaAsnGlnCysAla. Dieses Peptid entspricht dem prozessierten N-Terminus von hTFF3. Über einen ELISA Screen konnten 3 Hybridoma-Klone identifiziert und isoliert werden, die Antikörper gegen hTFF3 erzeugten (Meyer zum Büschenfelde et al., previously accepted). Für die weiteren Untersuchungen wurde der Klon 15C6 genauer charakterisiert. Um die Spezifität des monoklonalen anti-hTFF3-Antikörper Klons 15C6 zu testen, wurden in *E. coli* rekombinant exprimiertes und gereinigtes hTFF1 und hTFF3 auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, geblottet und mit dem anti-hTFF3 Antikörper Klon 15C6 analysiert. Dabei konnte keine Kreuzaktivität des anti-hTFF3 (15C6) Antikörpers mit hTFF1 beobachtet werden (Abb. 4-2 A). Um zu überprüfen, ob der monoklonale anti-hTFF3 Antikörper 15C6 auch das von Zellen in den Zellkulturüberstand sekretierte hTFF3-Peptid erkennt, wurden HEK293 Zellen transient mit pFLAG-hTFF3 oder pcDNA6-hTFF3 transfiziert. Nach 48h Kultivierung wurde das TFF3-Peptid in dem Zellkultur-Überstand durch Western Blotting nachgewiesen. Dabei konnten sowohl das FLAG-getagte als auch das ungetagte hTFF3-Peptid mit dem anti-hTFF3-Antikörper Klon 15C6 spezifisch dedektiert werden (Abb. 4-2 B). Es fiel auf, dass das monomere FLAG-getagte hTFF3-Peptid ein deutlich höheres apparentes Molekulargewicht aufwies als das entsprechende, ungetagte Polypeptid. Wie schon in anderen Untersuchungen (Wang et al., 2002) führt offensichtlich auch bei hTFF3 das N-terminale FLAG-Tag bei einer SDS-PAGE zu einem veränderten Laufverhalten, so dass der apparente Größenunterschied zwischen hTFF3 und FLAG-hTFF3 größer ist, als es aufgrund der Differenz der berechneten Molekulargewichte zu erwarten war.



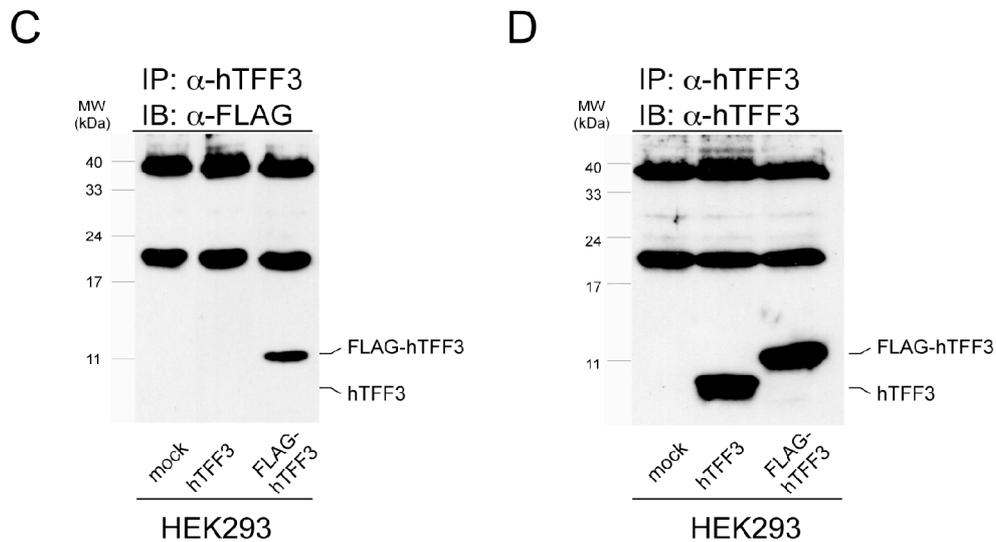


Abb. 4-2: Charakterisierung des monoklonalen anti-hTFF3 Antikörper Klons 15C6. A) Die Spezifität des anti-hTFF3 Antikörpers wurde getestet, indem zunächst hTFF1 und hTFF3 in *E.coli* exprimiert wurde. Nach einer Reinigung durch Kationenaustauscherchromatographie wurden je 1 µg und 5 µg hTFF1 und hTFF3 auf eine 14 % SDS-PAGE aufgetragen und auf eine PVDF-Membran geblottet. Anschließend erfolgte die Immunodetektion mit dem anti-hTFF3 Antikörper Klon 15C6 B) Um zu prüfen, ob mit dem anti-hTFF3 Antikörper Klon 15C6 in eukaryontischen Zellen exprimierte und sekretierte hTFF3- und FLAG-hTFF3-Peptide detektiert werden können, wurde der Zellkulturüberstand von HEK293-Zellen untersucht, die zuvor transient mit hTFF3-pFLAG-CMV3 oder mit hTFF3-pcDNA6/V5-HisB transfiziert worden waren. Hierzu wurde Zellkulturüberstand mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit dem anti-hTFF3 Antikörper 15C6 immunogefärbt. C) und D) FLAG-hTFF3 oder hTFF3 wurden mit dem monoklonalen anti-hTFF3 Antikörper Klon15C6 aus dem Zellkulturüberstand von mock-, hTFF3- oder FLAG-hTFF3-transfizierten HEK293-Zellen immunpräzipitiert. Die gereinigten Präzipitate wurden nach Auftrennung mittels SDS-PAGE im Western Blot C) mit dem monoklonalen anti-FLAG M2 Antikörper oder D) mit dem monoklonalen anti-hTFF3 Antikörper Klon 15C6 detektiert.

In weiteren Versuchen wurde gezeigt, dass mit dem anti-hTFF3 Antikörper 15C6 hTFF3 und FLAG-getagtes hTFF3 aus dem Zellkulturüberstand von transient transfizierten HEK293-Zellen immunpräzipitiert werden kann. Das immunpräzipitierte FLAG-hTFF3 war sowohl mit dem monoklonalen anti-FLAG-M2 Antikörper als auch mit dem anti-hTFF3 Antikörper 15C6 auf einem Western Blot nachweisbar (Abb. 4-2 C/D). Mit diesen Untersuchungen wurde gezeigt, dass der monoklonale anti-hTFF3 Antikörper 15C6 durch seine Spezifität und seine Reaktivität mit dem nativem und mit denaturiertem hTFF3 ein wertvolles Reagenz für den Nachweis von hTFF3 darstellt.

Um schließlich nachzuweisen, dass die stabil mit pFLAG-hTFF3 transfizierten HT29/B6- und MDCK-Klone auf Proteinebene FLAG-hTFF3 exprimieren und dieses Polypeptid anschließend in den Zellkulturüberstand abgegeben wird, wurden Immunpräzipitationsstudien durchgeführt. In Vorversuchen zeigte sich, dass der monoklonale anti-FLAG M2-Antikörper bei niedrigeren Salzkonzentrationen FLAG-hTFF3 besser bindet als bei physiologischen Salzkonzentrationen. Daher wurde der Zellkulturüberstand der jeweiligen FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 und MDCK Klone mit zwei Volumenteilen eines salzarmen Puffers versetzt und anschließend mit dem Antikörper anti-FLAG M2 inkubiert. Die gebildeten Proteinkomplexe wurden mit Protein A- Sepharose präzipitiert und über eine SDS-PAGE getrennt. Anschließend wurde FLAG-hTFF3 mittels Western Blot mit dem monoklonalen anti-hTFF3-Antikörper Klon 15C6 nachgewiesen (Abb. 4-3). Es fiel auf, dass die FLAG-hTFF3 Expression bei den stabil mit FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen deutlich niedriger war als bei den transient transfizierten HEK293-Zellen.

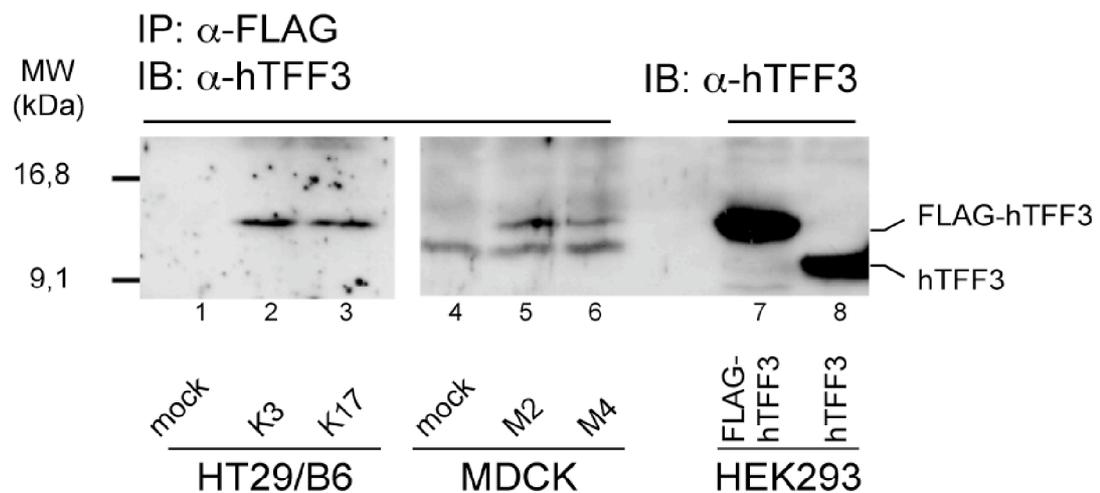


Abb. 4-3: Expressions- und Sekretionsnachweis des FLAG-getagten hTFF3-Peptids bei den stabil transfizierten Klonen. Sekretierte FLAG-hTFF3-Peptide wurden mit dem monoklonalen anti-FLAG-M2 Antikörper aus dem Zellkulturüberstand von mock-transfizierten (Lane 1; 4) und FLAG-hTFF3-transfizierten (Lane 2, 3; 5, 6) HT29/B6- und MDCK-Klonen K3 und K17 bzw. M2 und M4 immunpräzipitiert und im Western Blot mit dem monoklonalen anti-hTFF3 Antikörper (Klon 15C6) nachgewiesen. Um auszuschließen, dass die jeweilige zusätzliche Bande in Lane 4-6 nicht hTFF3 repräsentieren, wurde in Lane 7 und 8 das Laufverhalten von sekretiertem hTFF3 und FLAG-hTFF3 aus dem Zellkulturüberstand von HEK293-Zellen, die zuvor transient mit hTFF3-pFLAG-CMV3 und mit hTFF3-pFLAG-pcDNA6/V5-HisB worden waren, verglichen.

Somit wurde sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene die Expression von FLAG-hTFF3 in den stabil transfizierten HT29/B6 und MDCK Zellen nachgewiesen. Die Klone K3 und K17 bzw. M2 und M4 wiesen jeweils eine ähnliche Expressionsstärke auf.

4.2 FLAG-hTFF3-transfizierte Zellen weisen eine Erhöhung der Migration und eine Veränderung des Aktincytoskeletts auf

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass TFF3 in epithelialen Zellen eine motogene Wirkung zeigt. Daher wurde in einem ersten Schritt das Zellmigrationsverhalten der FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Klone sowie des entsprechenden Kontrollklons untersucht. Um die Wanderungsgeschwindigkeiten der transfizierten HT29/B6-Klone quantitativ zu bestimmen, wurde ein *Gap-Filling*-Assays entwickelt: Dazu wurde die Gummiabdichtung eines *Chamber Slides* auf eine mit Kollagen A beschichteten Zellkulturschale vorgelegt. Anschließend wurden die zu untersuchenden Zellen innerhalb der durch die Gummiabdichtung abgegrenzten Felder ausgesät. Nachdem die Zellen innerhalb der vorgegebenen Felder konfluent gewachsen waren, wurde die Gummieabdichtung langsam entfernt und losgelöste Zellen und Zelltrümmer vorsichtig mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen mit frischem Kulturmedium überschichtet und weiter in Kultur gehalten. Innerhalb der nächsten Tage wurden die Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h fotografiert und die Wanderungsstrecke der Zellen gemessen (Abb. 4-4 A/B).

Aus diesem Migrationsassays ging eindeutig hervor, dass die mit FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen deutlich schneller wandern als die entsprechenden Kontrollzellen. So verschob sich bei den Leervektor-transfizierten HT29/B6 Zellen die Zellfront innerhalb von zwei Tagen um 20 mm. Hingegen wanderten die FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6-Klone innerhalb des gleichen Zeitraums um 51 mm (Klon 3) bzw. um 78 mm (Klon 17). Desweiteren ist in den FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen eine Veränderung der Zellmorphologie erkennbar. Dieses wird besonders in den Bereichen der Zellfront sichtbar. Dort zeigen FLAG-hTFF3-transfizierte HT29/B6 Zellen im Gegensatz zu Kontrollzellen eine vermehrt spindelförmige Morphologie, wie sie oftmals bei Zellen beobachtet wird, die einen epithelial-mesenchymalen Übergang durchlaufen haben (Abb. 4-4 C).

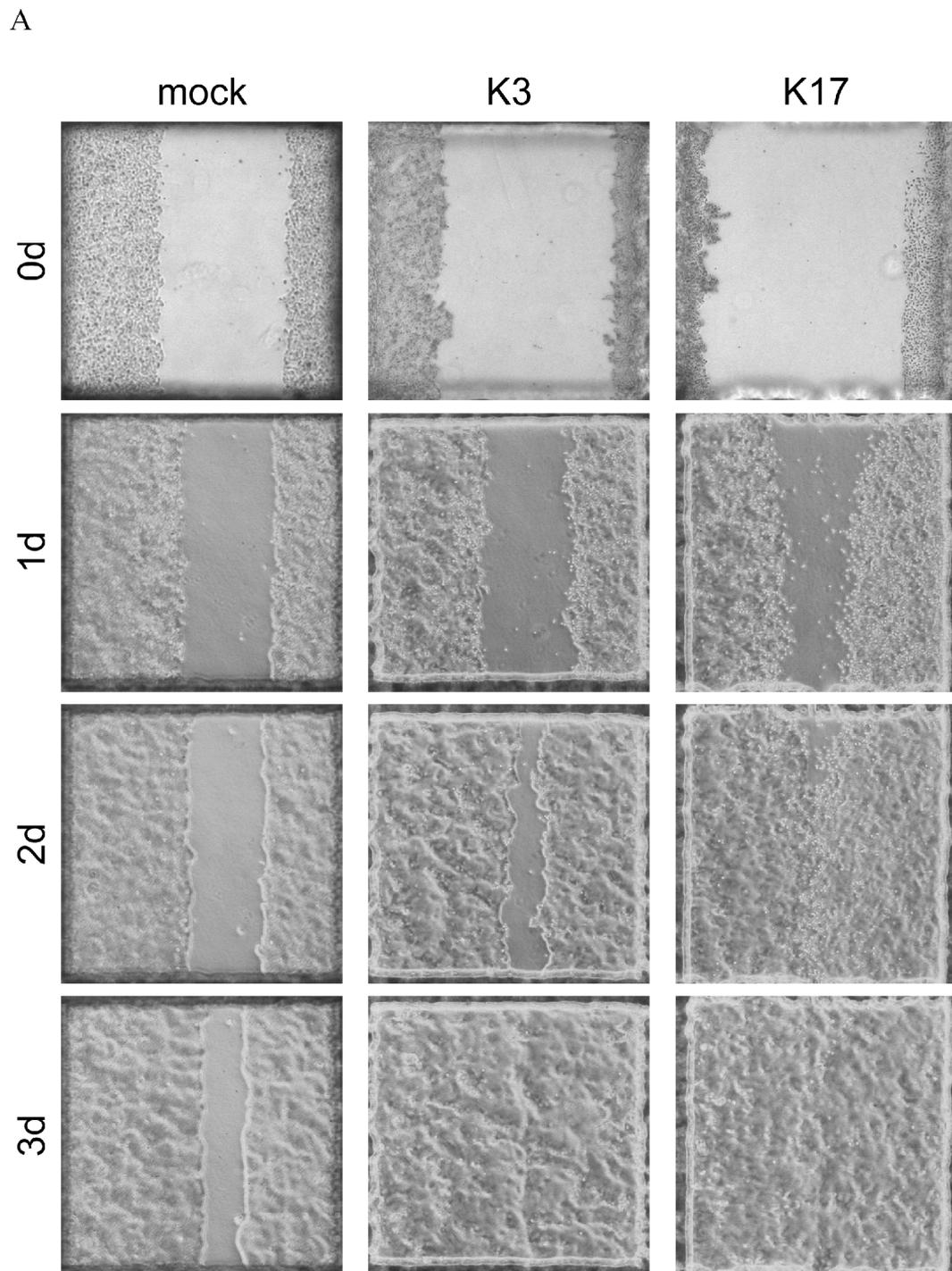


Abb. 4-4: Gap-Filling-Assay von FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen. A) Phasenkontrast-Aufnahmen von mit Leervektor (mock) und pFLAG-hTFF3 transfizierten HT29/B6 (Klon 3 und Klon 17) Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Entfernung der Gummiabgrenzung zwischen den konfluent bewachsenen Zellfeldern.

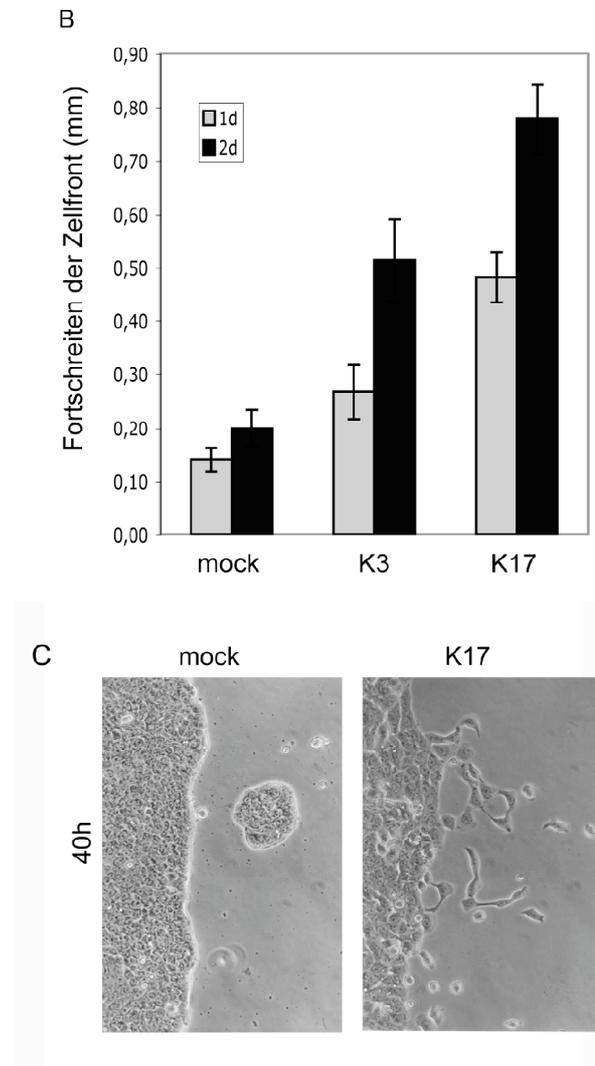


Abb. 4-4: B) Quantifizierung der Zellwanderungsgeschwindigkeit. Hierzu wurde die Verschiebung der Zellfront an den beiden Rändern nach 1 und 2 Tagen gemessen (n=4, Angaben als Mittelwert +/- Standardabweichung) C) Phasenkontrast-Aufnahmen von mit Leervektor (mock) und pFLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 (Klon 17) Zellen 40 h nach Entfernung der Gummiabgrenzung zwischen den konfluent bewachsenen Zellfeldern.

Im Folgenden wurde der Einfluß von FLAG-hTFF3 auf das Proliferationsverhalten der transfizierten Zellen untersucht. Hierzu wurde die Wachstumsgeschwindigkeit der FLAG-hTFF3- und Leerplasmid-transfizierten HT29/B6-Klone bestimmt. Jeweils gleich viele Zellen wurden ausgesät und die Zellzahl der verschiedenen Zell-

populationen in einem Zeitintervall von 0 bis 5 Tagen ermittelt (Abb. 4-5). Dabei zeigte sich in Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungen (Dignass et al., 1994), dass die Transfektion mit FLAG-hTFF3 keinen merklichen Einfluß auf die Zellproliferation ausübt.

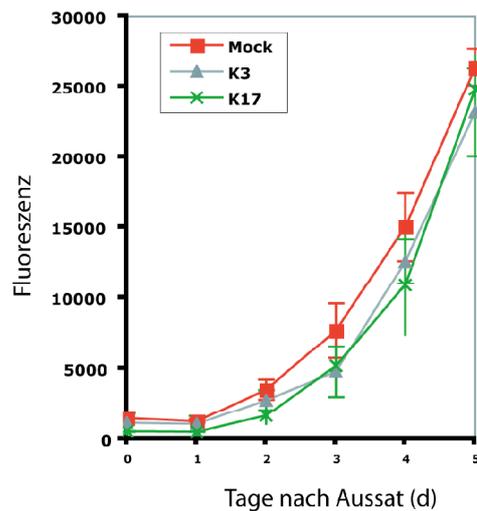


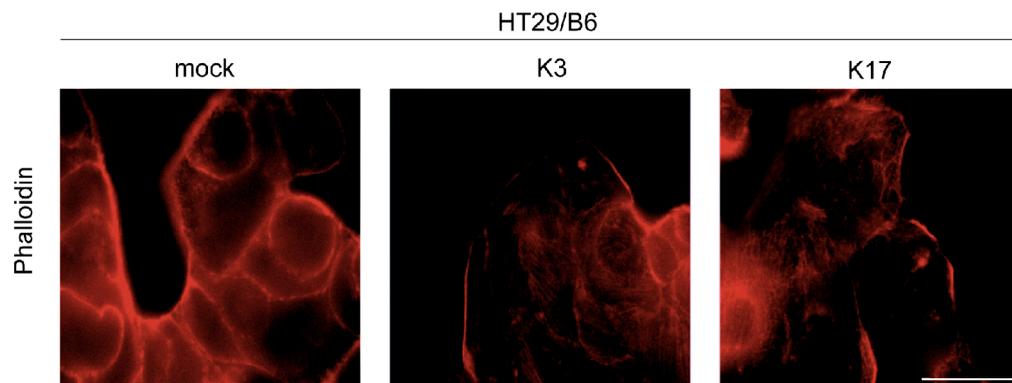
Abb. 4-5: Wachstumsverhalten von FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen. Messung der Zellproliferation mit dem Fluoresceindiacetat-Assay zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aussaat von 10^3 Zellen/Well in 96-Well Schalen (n=4, Angabe als Mittelwert +/- Standardabweichung).

Mit diesen Untersuchungen konnte somit gezeigt werden, dass die FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen als Modellsystem zur Untersuchung der molekularen Wirkungsmechanismen von hTFF3 geeignet sind.

Oftmals geht eine erhöhte Zellmotilität mit der Umstrukturierung des Cytoskeletts einher. Um zu überprüfen, ob die durch FLAG-hTFF3 hervorgerufene verstärkte Zellmigration mit Veränderungen des Cytoskeletts einhergeht, wurde das Aktin-Cytoskelett der stabil transfizierten HT29/B6 Zellen mit fluorophormarkiertem Phalloidin gefärbt. Bei den Leerplasmid-transfizierten HT29/B6 Zellen konnte man Aktin-Filamente vorwiegend submembranär nachweisen. Im Gegensatz dazu beobachtete man bei den stabil mit FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen einen Verlust des subcortikalen Cytoskeletts (Abb. 4-6 A). Um sicherzustellen, dass die beobachteten Veränderungen des Aktincytoskeletts tatsächlich von FLAG-hTFF3

hervorgerufen wurden, wurden zudem die stabil transfizierten MDCK Zellen untersucht. Auch hier konnte man eine verringerte Färbung des submembranären Aktinfilamentsystems beobachten. Auffällig war, dass in den FLAG-hTFF3-transfizierten MDCK Zellen eine verstärkte Bildung von Aktin-Streißfasern festzustellen ist. Zudem beobachtete man hier eine vermehrte Aktinfärbung im Cytosol (Abb. 4-6 B).

A



B

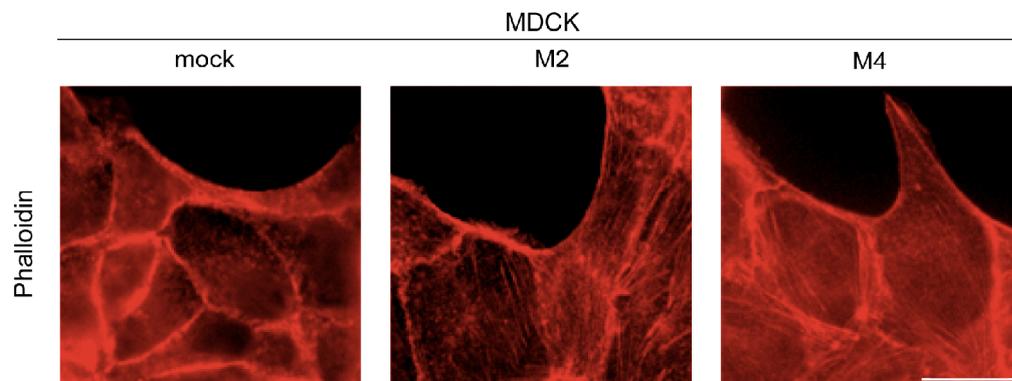


Abb. 4-6: Immunfluoreszenz-mikroskopischer Nachweis des Aktin-Cytoskeletts in FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 und MDCK Zellen. Färbung des Aktincytoskeletts mit Alexa Fluor 594 Phalloidin (A) in mit Leerplasmid transfizierten (mock) und FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen (Klon K3 und Klon K17); (B) in mit Leerplasmid transfizierten (mock) und FLAG-hTFF3-transfizierten MDCK Zellen (Klon M2 und Klon M4). Balkenlänge entspricht 10 μm .

4.3 Untersuchung des E-Cadherin/Catenin-Komplexes

4.3.1 Der E-Cadherin/Catenin-Komplex in FLAG-TFF3-transfizierten Zellen

Nachdem in den vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die Transfektion mit FLAG-getagtem hTFF3 auf epitheliale Zellen eine motogene Wirkung ausübt, sollte im folgenden untersucht werden, über welche molekularen Mechanismen hTFF3 eine Erhöhung der Zellmotilität hervorruft. Eine verstärkte Wanderung von Zellen erfordert eine Modulation ihrer Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakte. Die nachfolgenden Untersuchungen fokussierten sich auf eine durch hTFF3 induzierte Modulation epithelialer Zell-Zellkontakte.

Speziell die Modulation der durch Cadherin/Catenin-Komplexe vermittelten Zellkontakte in den *Adherens Junctions* epithelialer Zellverbände steht in engem Zusammenhang mit einem veränderten Migrationsverhalten von Zellen. Dabei zeigte sich in Gesamtllysaten sowohl von FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 und MDCK Zellen eine Reduktion der Menge an E-Cadherin. Ebenso war eine Abnahme von α -Catenin detektierbar. In FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen war zudem eine starke Reduktion von β -Catenin nachweisbar, wohingegen die Abnahme von β -Catenin in MDCK Zellen vergleichsweise gering war (Abb. 4-7A/B). Durch Immunfluoreszenz-mikroskopie konnte diese Abnahme von E-Cadherin, α - und β -Catenin bestätigt werden (Abb. 4-7 C/D).

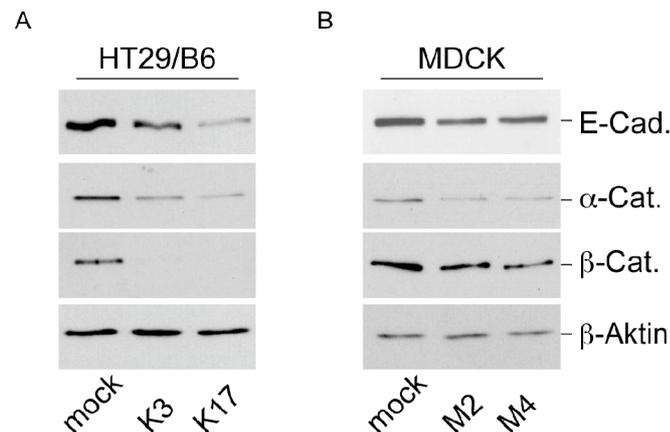


Abb. 4-7: Modulation des E-Cadherin/Catenin-Komplexes in FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen. A/B) Nachweis von E-Cadherin, α - und β -Catenin in FLAG-hTFF3- und mock-transfizierten HT29/B6- und MDCK-Zellen durch Western Blot-Analyse. Je 5 μ g Totallysat wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western Blot auf eine PVDF-Membran mit Antikörpern gegen E-Cadherin, α - und β -Catenin analysiert; β -Aktin diente als Ladekontrolle.

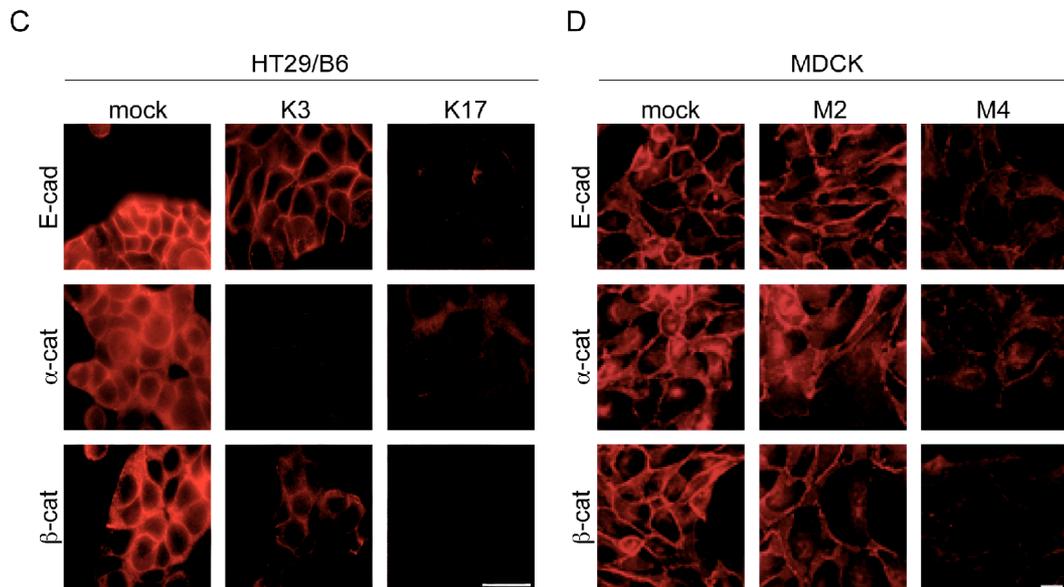


Abb. 4-7: C/D) Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Komponenten des E-Cadherin/Catenin-Komplexes. Balkenlänge entspricht 10 μ m. A/C HT29/B6 Zellen: Leervektor transfizierte Kontrollzellen (mock) und FLAG-hTFF3-transfizierte Klone K3 und K17; B/D MDCK Zellen: Leervektor transfizierte Kontrollzellen (mock) und FLAG-hTFF3-transfizierte Klone M2 und M4.

Damit stellte sich die Frage nach den molekularen Mechanismen, die dieser Reduktion des E-Cadherin/Catenin-Komplexes zugrunde liegen. Da der zelluläre Gehalt an Cateninen sehr häufig mit dem Gehalt an E-Cadherin korreliert, stellte sich somit primär die Frage nach den Unterschieden in der Regulation von E-Cadherin in den FLAG-hTFF3-transfizierten und Kontroll-Zellen.

4.3.2 Transkriptionelle Regulation von E-Cadherin in FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen

Um herauszufinden, ob die beobachtete Verringerung der Menge an E-Cadherin auf eine verminderte Transkription zurückzuführen ist, wurden Multiplex-RT-PCR Experimente durchgeführt. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus den Leerplasmid-transfizierten und den FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Klonen isoliert und die RNA-Konzentration spektrometrisch gemessen. Anschließend wurden gleiche Mengen an RNA als Template für eine Multiplex-One-Step RT-PCR Reaktion eingesetzt, bei der ein Oligonukleotid-Primerpaar für E-Cadherin und für β -Aktin als Haushaltsgen vorlagen, so dass im gleichen Reaktionsansatz neben E-Cadherin zusätzlich β -Aktin als interner Standard amplifiziert wurde. Nach 20, 25, 30 und 35 Amplifikationszyklen wurden jeweils Proben aus dem PCR-Ansatz entnommen und durch Agarosegelelektrophorese analysiert (Abb. 4-8). Bereits in der Probe, die nach 30 Zyklen entnommen wurde, ließ sich die Bande für das E-Cadherin PCR-Produkt nachweisen. In den FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen war das E-Cadherin PCR-Produkt erst nach 35 PCR-Zyklen detektierbar. Entsprechend der Ergebnisse aus den Western Blot Analysen war die Menge des E-Cadherin PCR-Produkts im Klon 17 geringer als im Klon 3. Diese Beobachtung wurde durch *Real-Time* RT-PCR Analysen mit einem *LightCycler* bestätigt.

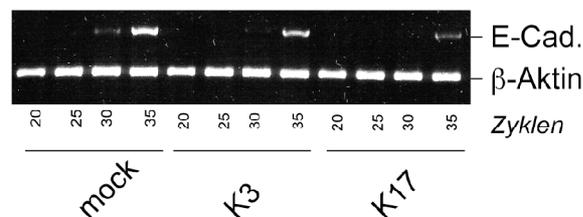


Abb. 4-8: Bestimmung des E-Cadherin-mRNA-Gehalts in FLAG-hTFF3- und mock-transfizierten Zellen durch Multiplex-RT-PCR-Analyse. Je 0,3 μ g RNA von stabil transfizierten HT29/B6-Klonen (mock, K3, K17) dienen als Template zur Amplifizierung von E-Cadherin. Das Haushaltsgen β -Aktin diente als interner Standard.

In Abb. 4-9 ist die Auswertung der LightCycler-Analyse skizziert. Bei den *Real-Time*-PCR-Analysen wurde die Untersuchung von GAPDH als Haushaltsgen zur Kontrolle durchgeführt. Wie in Abb. 4-9D gezeigt, betrug der Quotient der in FLAG-hTFF3-transfizierten und mit dem Leerplasmid transfizierten Zellen bestimmten GAPDH-mRNA ca. 80 % und lag somit bei den erwarteten 100 %. Dies zeigt, dass aus den

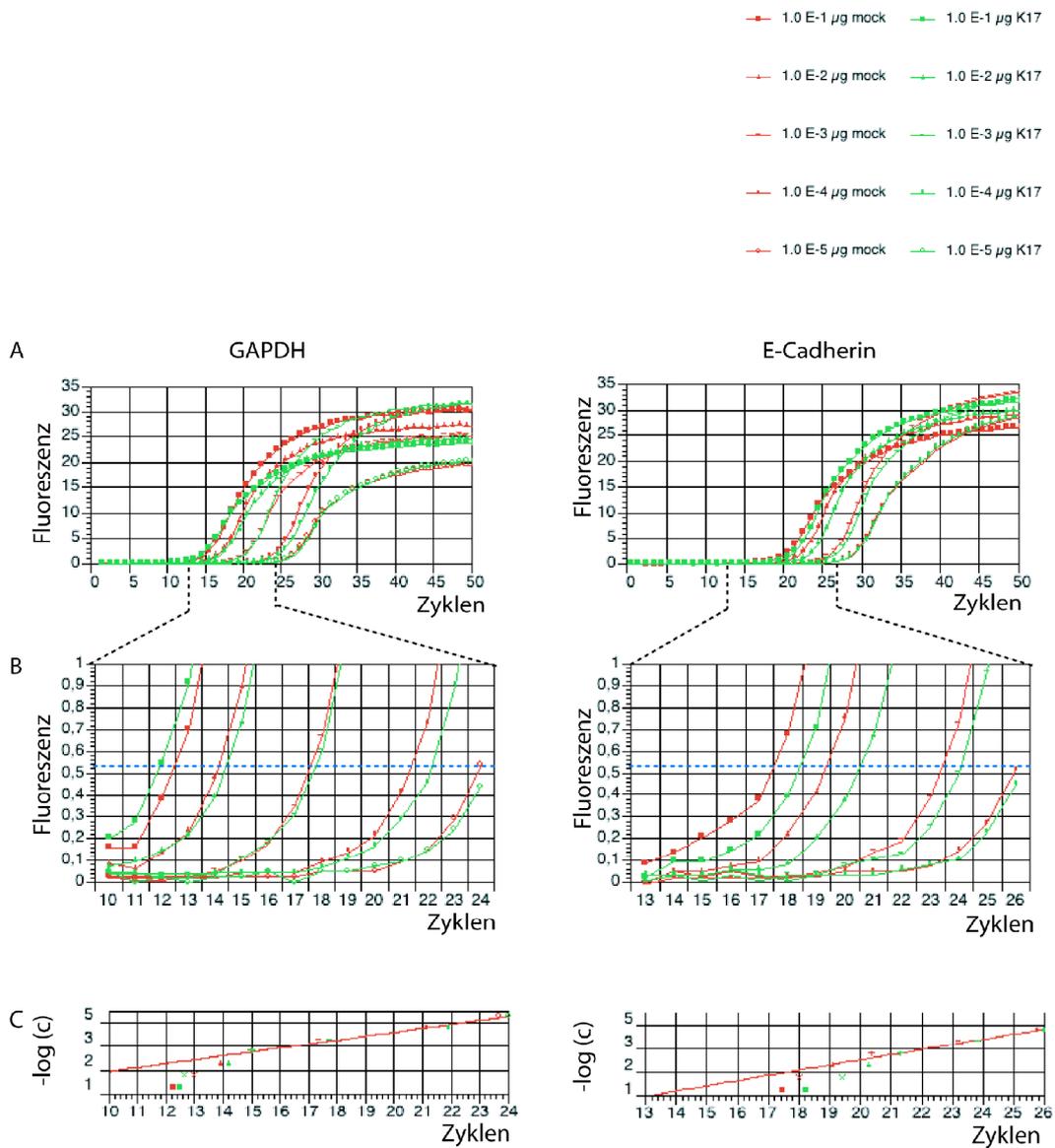


Abb. 4-9: Bestimmung des E-Cadherin mRNA Gehalts in FLAG-hTFF3- und Leerplasmid-transfizierten Zellen durch eine Real-Time RT-PCR Analyse. $1,0 \cdot 10^{-5}$ – $1,0 \cdot 10^{-1}$ μg RNA aus den stabil transfizierten HT29/B6-Klonen (mock, K17) dienen als Template zur Amplifizierung von E-Cadherin und GAPDH. A/B) Darstellung des kinetischen Verlaufs der RT-PCR Reaktionen: Nach jedem Amplifikationszyklus wurde bei den RT-PCR Ansätzen von Leerplasmid- und FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen die Menge an doppelsträngiger DNA mit SYBR Green I quantifiziert. (C) Bestimmung der C_T -Werte sowie deren halblogarithmische Darstellung in Bezug zu der jeweils eingesetzten Menge an RNA. Zur Erstellung einer Eichgraden wurden mehrere RT-PCRs mit unterschiedlichen RNA-Mengen aus Leerplasmid-transfizierten HT29/B6 Zellen analysiert.

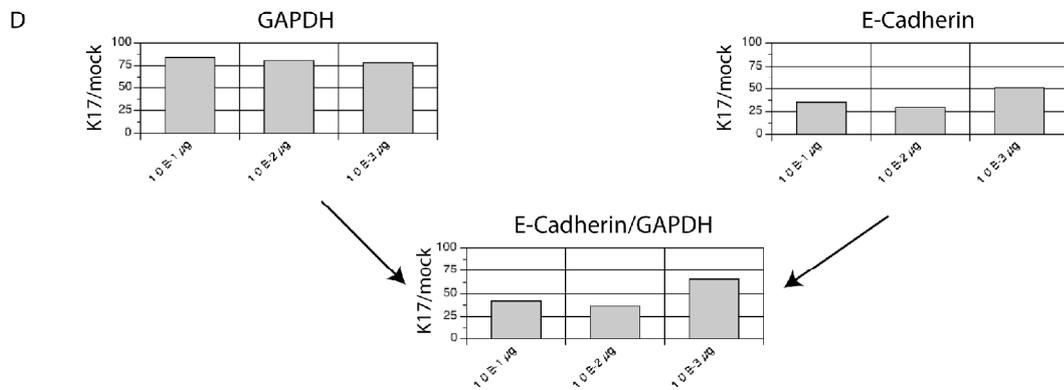


Abb. 4-9: D) Mit Hilfe der Eichgeraden war es möglich, die anfängliche Menge an Template-mRNA mit der entsprechenden Menge bei Leerplasmid-transfizierten HT29/B6 Zellen in Bezug zu setzen und zusammen mit den eingesetzten Gesamt-RNA Mengen den mRNA-Gehalt der verschiedenen HT29/B6-Klone miteinander zu vergleichen.

FLAG-hTFF3-transfizierten und den mock-transfizierten HT29/B6 Zellen vergleichbare Template-Mengen eingesetzt wurden. Dieser Befund ließ sich bei jeder der drei eingesetzten Template-Mengen bestätigen. Dagegen war die Menge an E-Cadherin-mRNA in den FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen auf ca. 25 % der Menge in mock-transfizierten Zellen reduziert, wenn Template-Mengen von 10^{-1} und 10^{-2} µg eingesetzt wurden. Bei einer Template-Menge von 10^{-3} µg betrug die Reduktion etwa 50 %. Unter Einbeziehung der bestimmten GAPDH-Mengen als externer Standard ergab sich aus diesen Untersuchungen, dass der Gehalt an E-Cadherin-mRNA in den FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen (Klon 17) um mehr als 30 % reduziert ist im Vergleich zu dem E-Cadherin-mRNA-Gehalt in den Leerplasmid-transfizierten HT29/B6 Zellen.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, die zu verringerten Transkriptionsraten des *E-Cadherin* Gens führen. Für eine Vielzahl von Karzinomen wurde gezeigt, dass die Methylierung des E-Cadherin-Promotors die E-Cadherin Expression herunterreguliert. Um herauszufinden, ob FLAG-hTFF3 Änderungen in der E-Cadherin Promotormethylierung verursacht, wurden methylierungsspezifische PCR (MS-PCR) Reaktionen durchgeführt. Mit dieser Methode kann analysiert werden, ob eine Methylierung von Cytosin-Resten in CpG-Inseln des E-Cadherin Promotors vorliegen. Dazu wird chromosomale DNA aus den Zellen isoliert.

Nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA wird die nun einzelsträngig vorliegende DNA mit Bisulfit behandelt. Dabei werden unmethylierte Cytosine zu Uracil umgewandelt, wohingegen methylierte Cytosine nicht reagieren. In einer nachfolgenden PCR-Reaktion mit spezifischen Primerpaaren, die so gewählt sind, dass sie nach der Bisulfit-Modifikation komplementär zu dem methylierten oder dem nicht-methylierten DNA-Templatestrang sind, kann dann selektiv methylierte von nicht-methylierter DNA unterschieden werden (Abb. 4-10 A).

A)

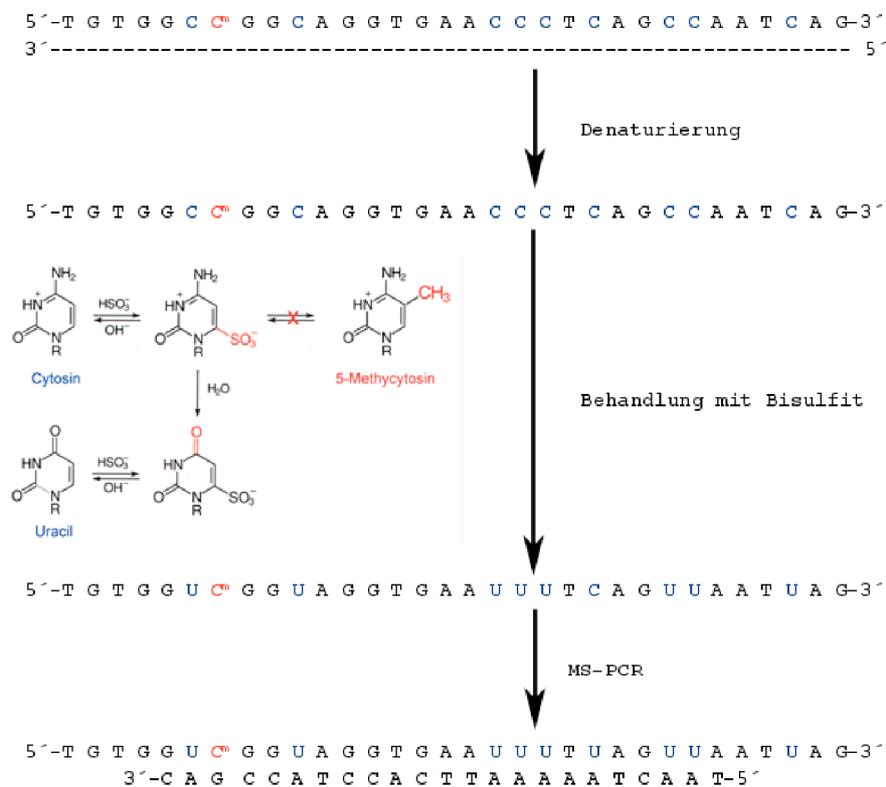


Abb. 4-10: Untersuchung des Methylierungsmusters des E-Cadherin-Promotors durch methylierungsspezifische PCR (MS-PCR-Analyse). A) Prinzip der Methylierungsanalyse. Durch die Bisulfitbehandlung werden unmethylierte Cytosine im Gegensatz zu methylierten Cytosinen (^mC) zu Uracil konvertiert. In einer nachfolgenden PCR ist es möglich, DNA-Bereiche methylierungsspezifisch zu amplifizieren

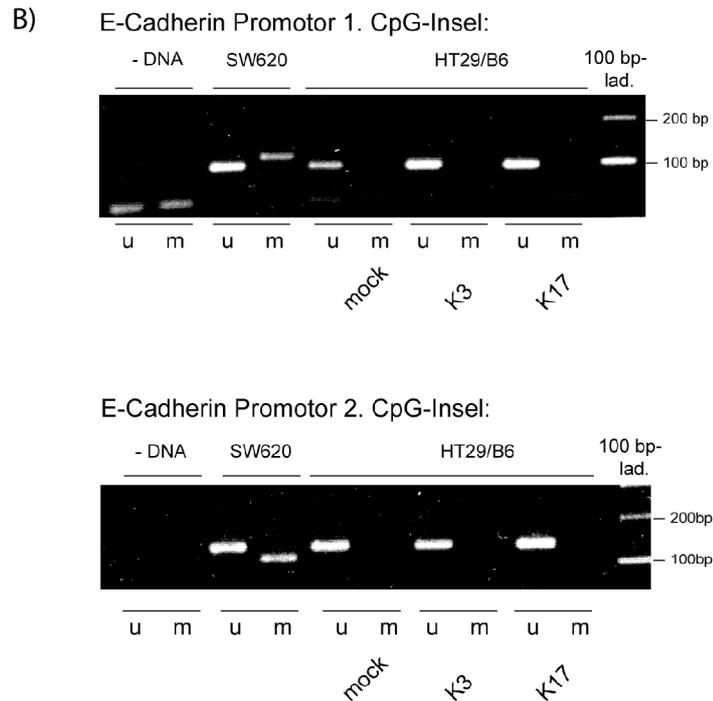


Abb. 4-10: B) Um den Einfluß von hTFF3 auf das Methylierungsmuster des E-Cadherin Promotors zu analysieren, wurde genomische DNA von stabil transfizierten HT29/B6-Klonen (mock, K3, K17) mittels MS-PCR untersucht. Mit jeweils zwei Primerpaaren wurden zwei unterschiedliche CpG-Inseln innerhalb des E-Cadherin Promotors untersucht. Als Kontrollen dienten PCR-Ansätze ohne Template (Negativkontrolle) bzw. Bisulfit-modifizierte DNA aus SW620 Zellen (Positivkontrolle). u, unmethyliert; m, methyliert.

Für den humanen E-Cadherin Promotor sind in der Literatur zwei CpG-Inseln beschrieben, die Ziele einer Methylierung sein können und deren Methylierung zu einer Repression der E-Cadherin-Promotoraktivität führen können (Herman et al., 1996; Kato et al., 2002). Weder in Leerplasmid-transfizierten noch in FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen konnte ein PCR-Produkt für der beiden methylierten CpG Inseln nachgewiesen werden (Abb. 4-10 B). Kontrollversuche mit Primern für nicht-methylierte DNA zeigten jeweils ein spezifisches PCR-Produkt. In einer Positivkontrolle mit DNA aus SW620 Zellen, für die bereits eine Methylierung des E-Cadherin Promotors beschrieben worden war (Poser et al., 2001), konnten PCR-Produkte für methylierter DNA nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass Promotormethylierung in FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen nicht für die verringerte *E-Cadherin* Transkription verantwortlich ist.

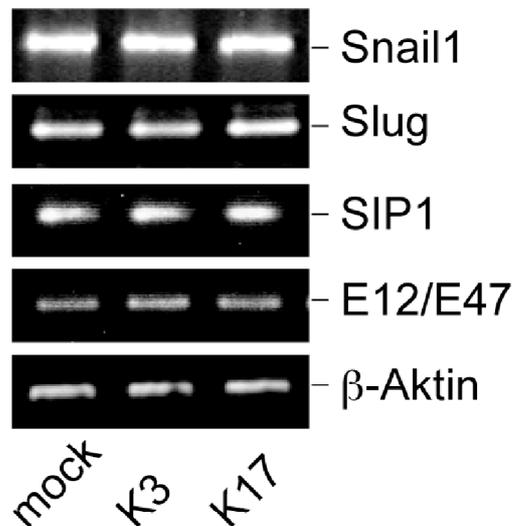


Abb. 4-11: Bestimmung des Gehalts von Snail1-, Slug-, SIP-1- and E12/E47-mRNA durch RT-PCR Analyse. Je 0,3 µg Gesamt-RNA von stabil transfizierten HT29/B6-Klonen (mock, K3, K17) wurden als Template zur Amplifizierung von Snail1-, Slug-, SIP-1-, E12/E47-mRNA und β-Aktin-mRNA eingesetzt.

Neben der transkriptionellen Repression durch Promotormethylierungen sind inzwischen Transkriptionsfaktoren beschrieben worden, die durch die Bindung an den Promotor die Transkription des E-Cadherin Gens hemmen. In diesem Zusammenhang sind die Transkriptionsrepressoren Snail-1, Slug, SIP1 und E12/E47 untersucht worden. Eine erhöhte Expression dieser Transkriptionsrepressoren in FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen könnte zur verringerten Expression von E-Cadherin beitragen. Um zu untersuchen, ob die Transkriptionsraten von Snail, Slug, SIP1 oder E12/E47 durch hTFF3 verändert werden, wurden RT-PCR-Reaktionen mit spezifischen Primer-Paaren für die jeweiligen Faktoren durchgeführt (Abb. 4-11).

Für keinen dieser Transkriptionsrepressoren konnte eine signifikante Veränderung der mRNA-Menge als Maß ihrer Expressionsrate nachgewiesen werden. Auch durch *Real-Time* RT-PCR konnten keine Unterschiede festgestellt werden (nicht gezeigt). Bisher ist allerdings nicht bekannt, ob möglicherweise die Stabilität oder die Aktivität dieser Repressoren sich zwischen mit Leervektor und FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen unterscheidet.

4.3.3 Verringerung der E-Cadherin Stabilität in FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen

Aus früheren Veröffentlichungen war bekannt, dass die TFF-Behandlung zu einer schnellen Phosphorylierung von β -Catenin und zu einer verstärkten Interaktion mit dem EGF-Rezeptor führt (Liu et al., 1997). Außerdem war bekannt, dass die Phosphorylierung von β -Catenin nach EGF- oder TGF α -Behandlungen zu einer Destabilisierung des Cadherin/Catenin-Komplexes und damit einhergehend zu einer verringerten Assoziation des Cadherin/Catenin-Komplexes mit dem Aktincytoskelett führt (Hoschuetzky et al., 1994). Um herauszufinden, ob in FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen die Stabilität des E-Cadherin/Catenin-Komplexes beeinträchtigt ist, wurde als erstes untersucht, ob E-Cadherin unter dem Einfluß von hTFF3 einem Shedding-Prozeß unterliegt. In Immunpräzipitationsexperimenten mit dem monoklonalen anti-E-Cadherin Antikörper HECD-1, welcher gegen die extrazelluläre Domäne von E-Cadherin gerichtet ist, konnte im Zellkulturüberstand von FLAG-hTFF3- und mock-transfizierten HT29/B6-Zellen kein gesheddetes E-Cadherin-Fragment nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Somit ergaben sich keine Hinweise auf eine Verminderung des E-Cadherin-Gehalts, der durch einen Shedding-Prozeß verursacht sein könnte. Anschließend wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente mit einem monoklonalen anti-E-Cadherin Antikörper aus L-[³⁵S]-Met/Cys markierten Zelllysaten durchgeführt.

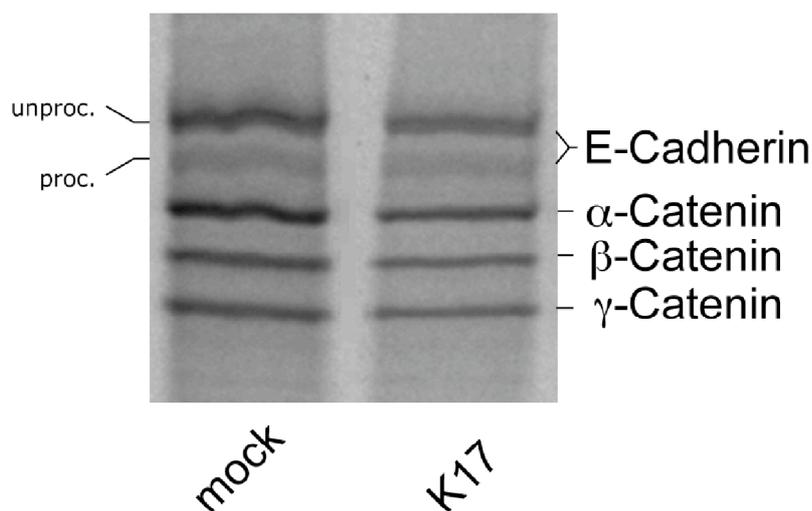


Abb. 4-12: Analyse der Stabilität des E-Cadherin/Catenin-Komplexes. Mit pFLAG-hTFF3 und mit Leerplasmid transfizierte HT29/B6 Zellen (mock- und K17-Klon) wurden nach einer 30-minütigen in vitro-Markierung mit radioaktivem L-[³⁵S]-Methionin/Cystein lysiert. Aus je 500 μ g

Zelllysate wurden die E-Cadherin/Catenin-Komplexe mit Anti-E-Cadherin Antikörper co-immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE autoradiographisch analysiert. Neben prozessiertem E-Cadherin (proz.) konnte überwiegend unprozessiertes E-Cadherin (unproz.) sowie α -, β - und γ -Catenin nachgewiesen werden.

Dabei zeigte sich, dass der charakteristische E-Cadherin/Catenin-Komplex präzipitiert wurde, der aus der unprozessierten E-Cadherin Vorläuferform, dem prozessierten E-Cadherin, α -Catenin, β -Catenin und γ -Catenin (Plakoglobin) besteht. Die Stabilität des Komplexes scheint nicht beeinträchtigt zu sein. Jedoch zeigte sich auch in diesen Experimenten, dass die Menge an E-Cadherin und auch an Cateninen in den FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen reduziert ist (Abb. 4-12).

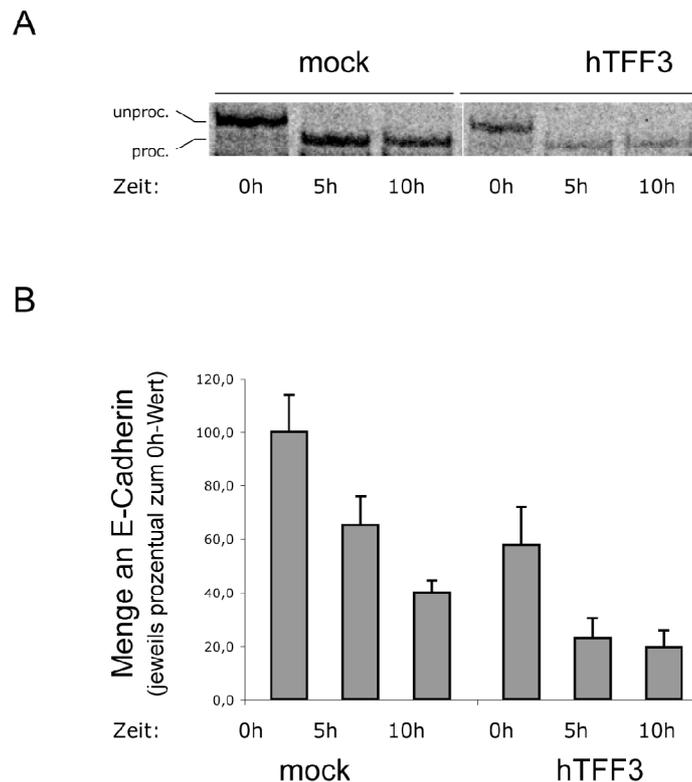


Abb. 4-13: Pulse-chase Experimente zur Bestimmung der E-Cadherin Halbwertszeit in FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/b6-Zellen. A) Autoradiographische Analyse von E-Cadherin aus Zellysaten von FLAG-hTFF3- und Leerplasmid-transfizierten HT29/B6 Zellen (mock- und K17-K1on), die nach einer 30-minütigen in vivo-Markierung mit radioaktivem [35 S]-Methionin/Cystein für weitere 0 h, 5 h oder 10 h in Kultur gehalten wurden. Aus je 500 μ g Zellysate wurde E-Cadherin mit Anti-E-Cadherin Antikörper immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE autoradiographisch analysiert. Unmittelbar nach der in vivo-Markierung kann man u.a. unprozessiertes E-Cadherin (unproz.) nachweisen, welches mit der Zeit zu prozessiertem E-Cadherin (proz.) reift. B) Die quantitative Analyse der E-Cadherin Reduktion erfolgt mit einem Phosphoimager (n=3, Angabe als SEM).

Kürzlich wurde im Zusammenhang mit einer veränderten Tyrosin-Phosphorylierung gezeigt, dass E-Cadherin ubiquitiniert wird. Dies führt zur Endozytose, zum Abbau und zur verringerten Halbwertszeit von E-Cadherin sowie zu einer erhöhten Zellmigration.

Daher sollte untersucht werden, ob die Halbwertszeit von E-Cadherin in FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen im Vergleich zu mit Leerplasmid transfizierten Zellen reduziert ist.

Dazu wurden *Pulse-Chase*-Experimente durchgeführt. Es wurden die Zellen für 30 Minuten mit L-[³⁵S]-Met/Cys-haltigen Zellkulturmedium inkubiert, welches anschließend gewaschen und durch nicht-radioaktives Medium ersetzt wurde. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 5 h, und 10 h) nach Beginn der *Chase*-Periode wurden die Zellen lysiert und nach Proteinbestimmung Immunpräzipitationen mit dem monoklonalen anti-E-Cadherin Antikörper durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden durch SDS-PAGE getrennt, durch Autoradiographie analysiert und mit einem Phosphorimager quantifiziert (Abb. 4-13). Dabei zeigte sich eine eindeutige Verringerung der E-Cadherin Halbwertszeit von 7,9 h in Leerplasmid-transfizierten Zellen auf 3,7 h in FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen.

Somit wurde in diesen Experimenten neben der transkriptionellen Repression ein zweiter, posttranslatonaler Mechanismus gefunden, der an der Regulation der E-Cadherin-Menge in FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen beteiligt ist.

4.4 Untersuchung von *Tight Junctions*-Proteinen

Aufgrund ihrer engen Wechselwirkungen rufen Veränderungen des Cadherin/Catenin-Komplexes häufig Änderungen der *Tight Junctions* hervor. In diesem Zusammenhang wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt, dass in epithelialen Geweben ein erhöhter hTFF3 mRNA-Gehalt mit einem erhöhten transepithelialen Widerstand einhergeht (Marchbank et al., 2001). Diese Beobachtungen deuten auf durch TFF3-vermittelte Modulation der *Tight Junctions* Zellen hin. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde der zelluläre Gehalt verschiedener *Tight Junctions*-Komponenten mit Hilfe von Western Blots analysiert. Hierzu wurden die FLAG-hTFF3- und Leerplasmid-transfizierten HT29/B6 und MDCK Klone zwei Tage nach Aussaat mit einem SDS-haltigen Lysispuffer lysiert. Die Gesamtproteinmenge der gewonnenen Lysate wurde mittels der BCA-Methode ermittelt. Anschließend wurden jeweils gleiche Proteinmengen mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (Abb. 4-14 A). Dabei zeigte sich, dass sich der Gehalt an Claudin-1, Occludin, ZO-1 und ZO-2 nicht signifikant zwischen FLAG-hTFF3- und Leerplasmid-transfizierten Zellen unterscheidet. Im Gegensatz dazu war der Claudin-2-Gehalt in den FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6- und MDCK-Klonen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollklonen deutlich reduziert. In immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnten diese Beobachtungen bestätigt werden (Abb. 4-14 B).

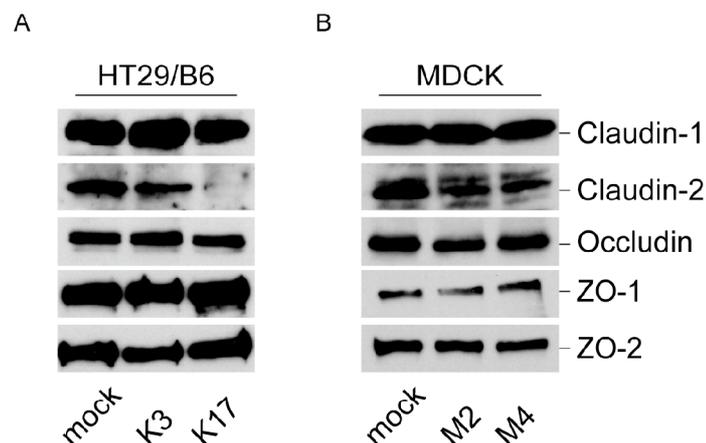


Abb. 4-14: Modulation des *Tight Junctions*-Komplexes in FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen. A/B) Western Blot von Claudin-1, -2, Occludin, ZO-1 und -2 in 5 µg Zellysat von Leerplasmid- und FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 und MDCK Zellen.

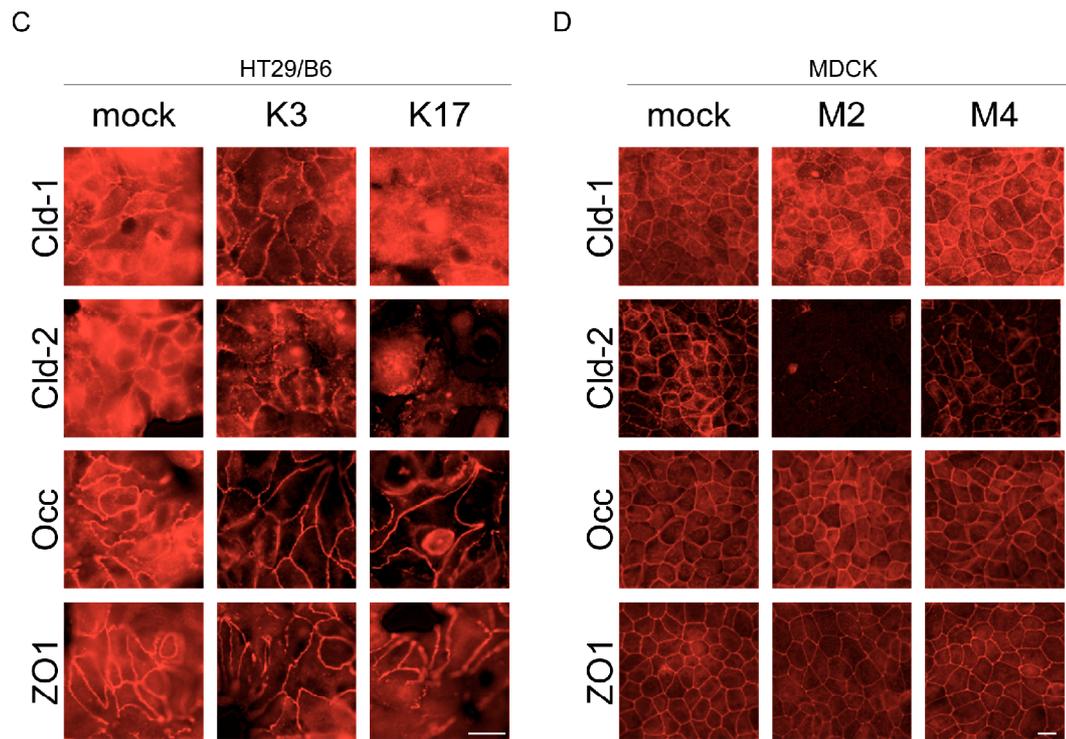


Abb. 4-14: C/D) Immunfluoreszenz-Analyse der Komponenten des Tight Junction-Komplexes. Balkenlänge entspricht 10 μ m. A/C) HT29/B6 Klone mock, K3 und K17; B/D) MDCK-Klone mock, M2 und M4.

Desweiterm zeigte sich in RT-PCR Analysen, dass die auf Proteinebene beobachtete Reduktion von Claudin-2 auf eine reduzierte Transkriptionsrate zurückzuführen ist (Abb. 4-15). Im Gegensatz zur Menge der Claudin-1 mRNA, die sich zwischen Leervektor und FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen nicht unterschied, zeigte sich beim Klon 17 eine starke Reduktion des Claudin-2 mRNA-Gehalts; bei Klon 3 fand man keinen entsprechenden Unterschied.

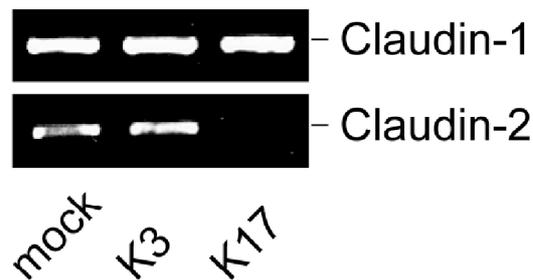


Abb. 4-15: Bestimmung des mRNA-Gehalts von Claudin-1 und Claudin-2 durch RT-PCR Analyse. Je 0,3 µg Gesamt-RNA von stabil transfizierten HT29/B6 Klonen (mock, K3,K17) wurden als Template für die RT-PCR Amplifizierung von Claudin-1 und Claudin-2 eingesetzt. Die PCR-Produkte von Claudin-1 wurden nach 25, die von Claudin-2 nach 20 Amplifikationszyklen entnommen und Agarosegelelektrophoretisch untersucht.

Die physiologische Konsequenzen dieses Unterschiedes z.B. auf den transepithelialen Widerstand müssen in weiteren Experimenten untersucht werden.