

# **Kleeblattpeptide und proinflammatorische Cytokine**

## Dissertation

der Fakultät für Biologie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

vorgelegt von

*Veronika Dossinger*  
aus Lauingen

2002

Tag der mündlichen Prüfung:

*05.07.2002*

Dekan:

Prof. Dr. H.-U. Schnitzler

Erster Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. h. c. N. Blin

Zweiter Berichterstatter:

PD Dr. P. Gött

Auch darf nicht geleugnet werden, daß wir persönlich einem Buch gar manchen Fehler verzeihen, indem wir uns durch dessen Entdeckung geschmeichelt fühlen.

nach Johann W. von Goethe



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn PD Dr. P. Gött für die Überlassung und Betreuung des Dissertationsthemas und für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. N. Blin für die Ermöglichung der Ausführung dieser Arbeit, sowie für die wiederholten Anregungen und Denkanstöße.

Herrn B. Lüscher und Herrn V. Bours für die Überlassung der C/EBP $\beta$ - und NF $\kappa$ -B-Expressionsvektoren.

Der deutschen Krebshilfe für die Finanzierung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Genetik für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit, insbesondere Herrn Dr. Tuncay Kayademir für die Aufnahme ins S1 und seine wiederholte Unterstützung und Frau Petra Fegert für ihre Hilfe und ihren fachlichen Rat bei der Zellkultur.

Allen meinen Freunden, insbesondere Pia und Ulli, für die Hilfe und Anteilnahme.

Und nicht zuletzt meiner Familie, besonders meinen Eltern und meinem Freund Stan für die liebevolle Unterstützung, Motivation und nicht selten Trost.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Immunologie des Gastrointestinaltraktes . . . . .	1
1.1.1	Der Gastrointestinaltrakt als Grenzfläche zur Umwelt . . . . .	1
1.1.2	Das darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT) . . . . .	2
1.1.3	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen . . . . .	3
1.2	Magenkrebs . . . . .	5
1.3	Die Kleeblattpeptid-Familie . . . . .	6
1.3.1	Allgemeines . . . . .	6
1.3.2	Nomenklatur . . . . .	6
1.3.3	Struktur der Kleeblattpeptide-Gene . . . . .	6
1.3.4	Struktur der Kleeblattpeptide . . . . .	7
1.3.5	Expression der Kleeblattpeptide . . . . .	8
1.3.5.1	TFF1 . . . . .	9
1.3.5.2	TFF2 . . . . .	9
1.3.5.3	TFF3 . . . . .	10
1.3.6	Funktion der Kleeblattpeptide . . . . .	10
1.4	An der Regulation der <i>TFF</i> Gene beteiligte Transkriptionsfaktoren . .	14
1.5	Ziel der Arbeit . . . . .	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Material . . . . .	17
2.1.1	Verwendete Puffer und Reagenzien . . . . .	17
2.1.2	Zelllinien . . . . .	19
2.1.3	Primer . . . . .	19
2.1.4	Plasmide und Reportergen Konstrukte . . . . .	21
2.2	Methoden I . . . . .	21
2.2.1	Zellkultur . . . . .	21
2.2.2	Reportergentechnologie . . . . .	22
2.2.3	Transfektion . . . . .	22
2.2.3.1	Transfektion mittels kationischer Polymere . . . . .	23
2.2.4	Stimulation . . . . .	24
2.2.5	Luminiszenznachweis der enzymatischen Luziferaseaktivität . .	24
2.2.6	RT-PCR . . . . .	25

## INHALTSVERZEICHNIS

---

2.2.6.1	RNA-Isolation . . . . .	25
2.2.6.2	Reverse Transkription . . . . .	26
2.2.6.3	Multiplex-PCR . . . . .	26
2.2.6.4	Realtime-PCR . . . . .	27
2.3	Methoden II . . . . .	29
2.3.1	Zellkultur . . . . .	29
2.3.2	PMN-Isolation . . . . .	30
2.3.3	Stimulation . . . . .	30
2.3.4	RT-PCR . . . . .	30
2.3.4.1	Cytokin-Multiplex-PCR . . . . .	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1	Auswirkung von proinflammatorischen Cytokinen auf die Transkription der <i>TFF</i> Gene in gastrointestinalen Zelllinien . . . . .	33
3.1.1	Stimulation der exogenen <i>TFF</i> Expression durch $IL1\beta$ und $IL6$	33
3.1.1.1	Herabregulation der <i>TFF</i> Reporter Gen Expression bei HT-29 . . . . .	33
3.1.1.2	Herabregulation der <i>TFF</i> Reporter Gen Expression bei LS 174 T . . . . .	34
3.1.1.3	Herabregulation der <i>TFF</i> Reporter Gen Expression bei KATO III . . . . .	35
3.1.1.4	Herabregulation der <i>TFF</i> Reporter Gen Expression bei MKN-45 . . . . .	36
3.1.1.5	Zusammenfassung . . . . .	36
3.1.2	Stimulation der exogenen <i>TFF</i> Expression durch $NF\kappa$ -B und $C/EBP\beta$ . . . . .	37
3.1.2.1	Herabregulation der <i>TFF</i> Reporter Gen Expression bei HT-29 . . . . .	38
3.1.2.2	Herabregulation der <i>TFF</i> Reporter Gen Expression bei LS 174 T . . . . .	39
3.1.2.3	Herabregulation der <i>TFF</i> Reporter Gen Expression bei KATO III . . . . .	40
3.1.2.4	Zusammenfassung . . . . .	40
3.1.3	Stimulation mit $IL1\beta$ und $IL6$ nach Co-Transfektion mit $NF\kappa$ -B und $C/EBP\beta$ . . . . .	41
3.1.3.1	Herabregulation der <i>TFF3</i> Reporter Gen Expression bei HT-29 . . . . .	41
3.1.3.2	Herabregulation der <i>TFF3</i> Reporter Gen Expression bei LS 174 T . . . . .	42
3.1.3.3	Herabregulation der <i>TFF1</i> und <i>TFF3</i> Reporter Gen Expression bei KATO III . . . . .	43
3.1.4	Abnahme der endogenen <i>TFF</i> Expression unter Einfluß von $IL1\beta$ und $IL6$ . . . . .	43

## INHALTSVERZEICHNIS

---

3.1.4.1	TFF-Multiplex-PCR . . . . .	44
3.1.4.2	TFF-Realtime-PCR . . . . .	46
3.1.4.3	Zusammenfassung . . . . .	52
3.2	Wirkung von TFF Peptiden auf die Cytokinexpression in Immunzellen	53
3.2.1	Cytokinexpression nach TFF Peptid Induktion bei HL-60 . . .	53
3.2.2	Cytokinexpression nach TFF Peptid Induktion bei PMN . . .	54
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1	Der herabregulierende Effekt von IL1 $\beta$ und IL6 . . . . .	57
4.2	Der herabregulierende Effekt von NF $\kappa$ -B und C/EBP $\beta$ . . . . .	60
4.3	Der immunmodulierende Effekt von rekombinanten TFF2 und TFF3 Peptiden . . . . .	61
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Abstract</b>	<b>65</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>82</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>87</b>

## **INHALTSVERZEICHNIS**

---

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Immunologie des Gastrointestinaltraktes

In diesem Abschnitt soll in Kürze das Immunsystem im Verdauungstrakt dargestellt werden. Zuerst wird die normale immunologische Situation im Darm beschrieben, anschließend wird auf Fehlfunktionen am Beispiel der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingegangen. Bei dieser Zusammenstellung handelt es sich um Grundlagen, die für das allgemeine Verstehen dieser Arbeit hilfreich und die in verschiedenen Lehrbüchern ausführlich beschrieben sind [Abbas et al., 1996, Gemsa et al., 1991, Janeway and Travers, 1997].

#### 1.1.1 Der Gastrointestinaltrakt als Grenzfläche zur Umwelt

Der Gastrointestinaltrakt stellt mit 200-300m<sup>2</sup> Oberfläche eine erstaunlich große Grenzfläche zwischen Organismus und Umwelt dar und ist wie keine andere Körperoberfläche einer Unzahl potentiell pathogener Noxen ausgesetzt. Im Gegensatz zur Haut ist er jedoch - um seiner Funktion als Resorptions- und Sekretionsorgan nachzukommen - mit einschichtigem Epithel ausgekleidet. Entsprechend spielen nicht so sehr mechanische, sondern funktionelle Prinzipien eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Schrankenfunktion des Gastrointestinaltraktes. Diese wird in ihrer Gesamtheit als Mukosablock bezeichnet.

Die mechanischen und funktionellen Mechanismen des Mukosablocks sind sowohl unspezifischer als auch spezifischer Art. Unspezifische mechanische Abwehrmechanismen sind die Barrieren des Epithels mit den muzinösen Glykoproteinen, unspezifische funktionelle Faktoren sind vor allem die Darmflora, die Peristaltik, die Magensäure, Enzyme sowie Lysozym, Gallensäuren und die Zellen und Faktoren der unspezifischen Immunität.

Den entscheidenden spezifischen funktionellen Mechanismus des Mukosablocks stellt das spezifische Immunsystem des Gastrointestinaltraktes dar. Dies läßt sich ähnlich dem peripheren Immunsystem in eine humorale und eine zellvermittelte Immunität unterteilen. Die gastrointestinale Immunität unterscheidet sich aber in vieler Hin-

## **Kapitel 1. Einleitung**

---

sicht vom peripheren Immunsystem und kann auch weitgehend unabhängig von diesem reagieren. Sie soll einerseits das Eindringen potentieller Antigene aus dem Darmlumen verhindern und intestinale Pathogene eliminieren. Andererseits soll sie aber nicht gegen zahlreiche "normale" Bestandteile des Darminhaltes, z.B. Nahrungsmittelantigene, reagieren und die Reaktivität des peripheren Immunsystems gegen zahlreiche Umweltantigene, die über den Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden, kontrollieren. Damit sollen schädigende Reaktionen des peripheren Immunsystems verhindert werden. Darüber hinaus soll die gastrointestinale Immunität die intestinalen Resorptions- und Sekretionsvorgänge mitregulieren.

### **1.1.2 Das darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT)**

Der Träger der gastrointestinalen Immunität ist das "darmassoziierte lymphatische Gewebe" ("gut associated lymphoid tissue"; GALT). Es ist zum einen in den Peyer-Plaques, den solitären Lymphfollikeln der Darmwand und den Mesenteriallymphknoten streng kompartimentiert, zum anderen diffus in der Mukosa verteilt (Abbildung 1.1). Das kompartimentierte lymphatische Gewebe einschließlich der monozytären Zellen des großen Netzes stellt vor allem den afferenten Schenkel der Immunantwort des GALT dar, d. h., hier wird die Immunantwort initiiert. Die diffus in der Mukosa verteilten lymphoiden Zellen hingegen entsprechen vor allem dem Effektorschengel, der die Immunantwort an den mukosalen Oberflächen ausführt.

Wie in Abbildung 1.1 zu sehen, ist die intestinale Lamina Propria durch eine Epithelschicht gegen das Lumen mechanisch abgegrenzt. Innerhalb dieser Epithelschicht, deren Aufgabe die Resorption ist, findet man Populationen von intraepithelialen Lymphozyten, fast immer T-Lymphozyten. An einigen wenigen Stellen sind die lymphfollikelähnliche Strukturen der Peyer-Plaques nachweisbar. Sie bestehen aus einem germinalen Zentrum, um das B-Zellen angeordnet sind. Über ihnen sind typischerweise spezialisierte Epithelzellen mit einer flachen Zelloberfläche ohne Villi- und Mikrovillibusatz zu finden, die keine resorptiven Aufgaben übernehmen. Diese Zellen werden als Microfold-(M-)Zellen bezeichnet. Sie selektieren durch Glykoproteinrezeptoren Antigene aus dem intestinalen Lumen, die sie durch Transzytose an die Lymphozyten der Peyer-Plaques weiterleiten. So wird die Immunreaktion initiiert, welche kontrolliert abläuft.

Im Stroma übernehmen Mastzellen, Makrophagen, B- und T-Lymphozyten komplexe Verteidigungsaufgaben. Diese resultieren in der kontinuierlichen Bereitstellung von Antikörpern v.a. von IgA, welches im Darm wie in anderen mukosalen Sekreten überwiegt, im Gegensatz zur Dominanz des IgG im Blut. IgA und auch IgM werden über Bindungen an Cysteinreste des Mukus zum festen Bestandteil der Epitheloberfläche und bilden den sogenannten "antiseptic paint". Dieser verhindert durch Bindung von Antigenen deren Aufnahme in den Organismus und die damit verbundene antigene Restimulation des lokalen und peripheren Immunsystems. Dieser Vorgang der Immunexklusion stellt die "first line of defense" des Gastrointestinaltraktes dar.

Antigene, die dennoch den Mukosablock in größerem Umfang penetrieren, stimu-

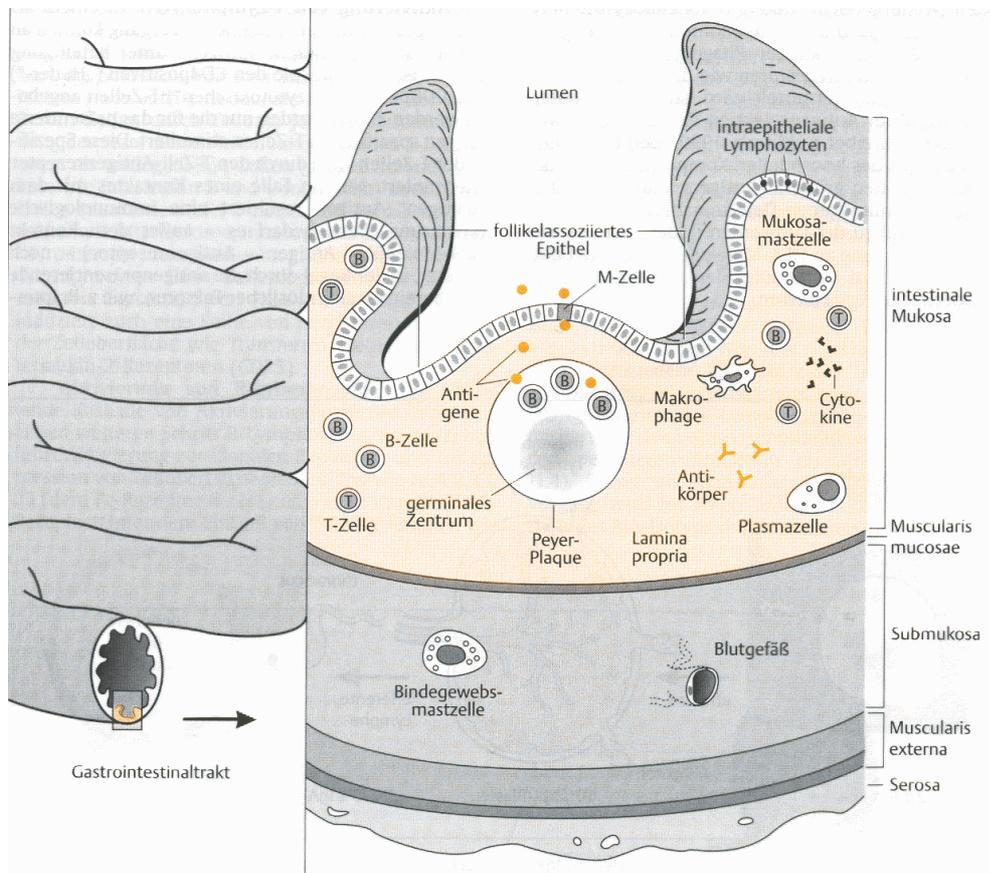


Abbildung 1.1: Anatomie des GALT.

lieren eine “second line of defense”, die Immunelimination. Diese wird vor allem von IgG (und IgM), von IgG-aktiviertem Komplement, verbunden mit Stimulation von polymorphkernigen Granulozyten (PMN) und Makrophagen, einer IgG-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität durch Killer-Zellen, sowie von T-Lymphozyten getragen.

Diese Immunelimination an mukosalen Oberflächen besitzt neben ihrer Schutzfunktion aber auch ein hohes Entzündungspotential. So kann es durch IgG und einer verstärkten Aktivierung von unspezifischen Amplifikatormechanismen und Entzündungsmediatoren (z.B. Komplement, Mastzellen, Prostaglandine, Leukotrine und proinflammatorische Cytokine) zu einer Gewebsschädigung und so zu einer Schädigung des Mukosablocks kommen. Dies ist z.B. bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen der Fall.

### 1.1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) werden historisch in zwei Haupterkrankungen unterteilt: den Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa. Beide sind

## Kapitel 1. Einleitung

---

durch einen chronisch entzündlichen Krankheitsprozeß gekennzeichnet, wobei die beiden Erkrankungen durch unterschiedliche klinische Manifestationsformen voneinander differenziert werden können.

Der Morbus Crohn ist durch eine transmurale, häufig granulomatöse Entzündung mit diskontinuierlichem Befallmuster gekennzeichnet. Bevorzugt betroffen sind der untere Dünndarm und/oder der Dickdarm. Die Colitis ulcerosa ist eine auf die Mukosa des Kolons beschränkte CED, die vom Rektum ausgehend - bei kontinuierlicher Ausbreitung - das Kolon teilweise oder vollständig befallen kann. Ist eine klare Unterscheidung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nicht möglich, wird von der "undefinierten" ("indeterminate") Kolitis gesprochen.

Das histologische Bild des Morbus Crohn und auch der Colitis ulcerosa weist klassische Komponenten chronisch entzündlicher Infiltrate wie Plasmazellen, Makrophagen und Lymphozyten auf. Der langwierige, chronische Krankheitsverlauf wechselt jedoch oft mit akuten und hyperakuten, mitunter lebensbedrohlichen Phasen ab. Diese Phasen korrelieren histopathologisch mit dem Einstrom neutrophiler Granulozyten und mononukleärer Phagozyten aus dem peripheren Blut in das entzündete Darmgewebe. Obwohl auslösende Ereignisse in der Ätiologie und der Pathogenese dieser CED z.T. noch unklar sind, weist viel auf eine systemische Fehlregulation des Immunsystems hin.

Neben genetischen Komponenten und erblicher Prädisposition [Cattan et al., 2000, Consortium, 2001, Lawrance et al., 2001] können spezifische Mechanismen charakterisiert werden, die wahrscheinlich an der Manifestation beider Krankheitsbilder beteiligt sind. So ist bei Patienten mit CED das IgA, welches hauptsächlich protektive Eigenschaften hat teilweise durch IgG ersetzt. Einige Befunde weisen auch darauf hin, daß in der makroskopisch entzündeten intestinalen Schleimhaut von Patienten mit CED vermehrt Interleukin1 (IL1) und IL6 (und auch  $TNF\alpha$ ) freigesetzt werden und diese sogenannten proinflammatorischen Cytokine an der Entwicklung der CED beteiligt sind [Brynskov et al., 1994, Sartor, 1997].

Die biochemische Reinigung von IL1 hat gezeigt, daß die biologische Aktivität dieses Cytokins in Form von zwei Hauptpeptiden vorkommt, jedes etwa 17kD groß, aber mit verschiedenen isoelektrischen Punkten von 5,0 und 7,0. Es ist bekannt, daß diese beiden Formen, IL1 $\alpha$  und IL1 $\beta$  genannt, auf zwei verschiedenen Genen kodiert sind. Die beiden Formen von IL1 zeigen weniger als 30 Prozent strukturelle Homologie, aber beide binden an den gleichen Rezeptor auf der Zelloberfläche, und ihre biologischen Aktivitäten sind im wesentlichen identisch. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ausschließlich IL1 $\beta$  verwendet. Neben mononukleären Phagozyten wird IL1 von einer ganzen Reihe von Zelltypen, wie den Epithel- und Endothelzellen, produziert, welche somit eine wichtige lokale Quelle für IL1 in der Abwesenheit von Makrophagen-reichen Infiltraten darstellen. Die biologische Wirkung von IL1 hängt von der freigesetzten Cytokinmenge ab. Wird IL1 in großen Mengen sezerniert, kommt es in den Blutstrom und entfaltet dort eine endokrine Wirkung. Bei niedriger Konzentration wirkt IL1 hauptsächlich als Mediator der lokalen Entzündung, unter anderem führt es zu einer weiteren Synthese von IL1 und induziert die Synthese von IL6.

IL6 ist ein Cytokin von etwa 26kD, das von mononukleären Phagozyten, Gefäßendothelzellen, Fibroblasten und einer Reihe anderer Zellen synthetisiert wird. Die funktionelle Form des IL6 ist wahrscheinlich ein Homodimer. IL6 hat ähnliche entzündungsfördernde Wirkungen wie IL1.

Neben anderen proinflammatorischen Cytokinen wurden bei Patienten mit CED vermehrt IL1 $\beta$  und IL6 im Serum [Gross et al., 1991], in Biopsiegewebe [Stevens et al., 1992] und in isolierten Lamina Propria Lymphozyten [Mahida et al., 1989, Pullman et al., 1992] entdeckt. In einer großen Anzahl an Zellen aus dem entzündeten Darm von CED Patienten wurde IL1 $\beta$  und IL6 mRNA gefunden und auch in makroskopisch nicht betroffenen Gewebeproben der selben Patienten [Woywodt et al., 1999]. Werden aus Biopsieproben von der entzündeten Mukosa Kulturen angelegt, produzieren diese spontan verstärkt IL1 $\beta$  und IL6 (und auch TNF $\alpha$ ) [Reimund et al., 1996]. IL1 $\beta$  und IL6 scheinen also bei CED nicht nur in betroffenen Darmsegmenten, sondern allgemein vermehrt exprimiert zu werden.

Daß IL1 $\beta$  und IL6 notwendig für die Entstehung einer Entzündungsreaktion sind, zeigten *in vivo* Versuche an IL1 $\beta$ - und IL6-knockout (KO) Mäusen. Bei einer durch Terpentininjektion entstandenen lokalen Gewebeschädigung waren diese Mäuse nicht mehr in der Lage eine normale Entzündungsreaktion aufzubauen [Fattori et al., 1994, Fantuzzi and Dinarello, 1996]. Neben ihrer Rolle bei CED sind IL1 $\beta$  und IL6 auch in die Entstehung von Magenkrebs verwickelt.

## 1.2 Magenkrebs

Magenkrebs ist eine der häufigsten Krebsarten auf der Welt. Auf vereinfachte Weise sollen hier die beiden Haupt-Entstehungswege für maligne Transformationen der Magenschleimhaut dargestellt werden. Ein Weg beginnt mit intestinalen Metaplasien und adenomatösen Dysplasien und führt zum intestinalen Karzinom. Der anderen Weg beginnt mit hyperplastischen Polypen oder *de novo* Veränderungen, mit oder auch ohne begleitende nichtplastische Dysplasie und führt zur diffusen Form des Magenkrebses [Correa, 1992, Solcia et al., 1996, Carneiro, 1997].

Beim diffusen Magenkrebs infiltrieren dürrtig kohäsive Zellen die Magenwand. Dies tritt gewöhnlich nicht mit intestinaler Metaplasie assoziiert auf, und kann durch genetische Prädisposition determiniert sein [Bocker et al., 1997].

Beim intestinalen Magenkrebs formen maligne Zellen, die intestinale Kolumnarepithel gleichen, glanduläre Strukturen und weisen expandierendes Wachstum auf. Dieser Typ wird am häufigsten im Antrum beobachtet und ist assoziiert mit intestinaler Metaplasie. Die Entstehung dieses Magenkrebstyp scheint auch durch äußere Einwirkung (Lebens- und Ernährungsgewohnheiten) beeinflussbar zu sein [Bocker et al., 1997].

Neben genetischen Veränderungen gibt es Hinweise darauf, daß proinflammatorische Cytokine an der Entstehung von Magenkrebs beteiligt sind. El-Omar et al. vermuten, daß eine durch Genpolymorphismus verstärkte Produktion von IL1 $\beta$  sowohl mit einer von *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) verursachten Hypochlorhydrie als auch mit

## **Kapitel 1. Einleitung**

---

Magenkrebs assoziiert [El Omar et al., 2000]. Die Arbeitsgruppe um Yamaoka untersuchte ebenfalls Magenkrebsgewebe und stellten fest, daß im Vergleich zu normalem Magengewebe hier höhere IL6 Spiegel zu beobachten waren [Yamaoka et al., 2001].

Durch diese Beobachtungen wird die Hypothese untermauert, daß kontinuierliche IL1 $\beta$  und IL6 Produktion sowohl CED als auch Magenkarzinogenese fördert. Bei der Entstehung, der Manifestation und der Progression dieser Erkrankungen wird die Beteiligung zahlreicher anderer Faktoren diskutiert, unter anderem die der Kleeblattpeptide.

### **1.3 Die Kleeblattpeptid-Familie**

#### **1.3.1 Allgemeines**

Die Kleeblattpeptid-Familie ("Trefoil Factor"; TFF) besteht aus kleinen Proteinen, die im Laufe der letzten zwanzig Jahre identifiziert und beschrieben wurden. Die Kleeblattpeptide besitzen gemeinsame Strukturen, die sie von den meisten anderen Peptidfamilien unterscheidet. Es gibt Hinweise darauf, daß gerade diese Strukturen wenigstens zum Teil eine Schlüsselrolle bei der Funktion der Kleeblattpeptide spielen. In den letzten Jahren wurden immer neue Mitglieder der Kleeblattpeptid Familie in verschiedenen Spezies entdeckt, was zur Erkenntnis führte, daß mindestens ein Mitglied gewebsspezifisch in jeder Region des Gastrointestinaltrakts von Säugetieren exprimiert wird.

#### **1.3.2 Nomenklatur**

Bei den Säugern sind drei Kleeblattpeptide bekannt. Da sie von verschiedenen Arbeitsgruppen entdeckt wurden, bestand seit jeher das Problem einer einheitlichen Namensgebung. Dieses Problem wurde 1996 auf einem Kongreß über Kleeblattpeptide (Philippe Laudat Conference) gelöst. Seither wird das brustkrebsassoziierte pS2 als TFF1, das spasmodische Polypeptid (SP) als TFF2 und der intestinale Kleeblattfaktor (ITF) als TFF3 bezeichnet. Die Zuordnung eines Kleeblattpeptides zu einer Spezies geschieht durch Voranstellung des jeweiligen Anfangsbuchstabens, z.B. human=hTFF1 oder mouse=mTFF1.

#### **1.3.3 Struktur der Kleeblattpeptide-Gene**

Die Gene, die für die drei humanen Kleeblattpeptide kodieren, liegen geklustert innerhalb eines 55kb großen Abschnitts auf Chromosom 21q22.3 [Theisinger et al., 1992, Tomasetto et al., 1992, Gött et al., 1996, Schmitt et al., 1996, Chinery et al., 1996, Seib et al., 1997]. Die Gene sind cen-TFF3-TFF2-TFF1-tel angeordnet (Abbildung 1.2), die Transkription verläuft in Richtung des Centromers [Gött et al., 1996]. Die drei Kleeblattpeptid-Gene weisen eine sehr ähnliche Struktur auf.

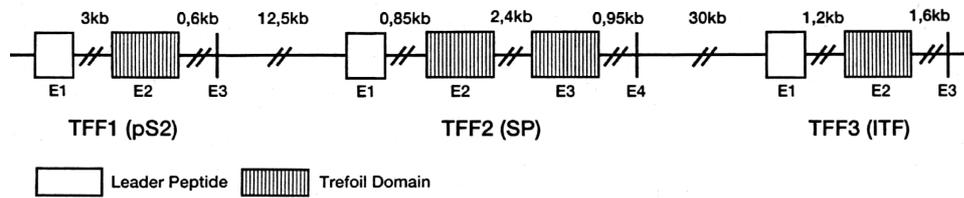


Abbildung 1.2: Kleeblattpeptid Genkluster auf Chromosom 21q22.3.

Das *TFF1* Gen, auch bekannt als “breast cancer estrogen inducible” (BCEI) Gen, besteht aus drei Exons [Rio and Chambon, 1990]. Die Kleeblattdomäne wird von Exon 2 kodiert. Die 5'-flankierende Region von *TFF1* enthält ein “estrogen responsive element” (ERE), sowie Bindestellen für verschiedene andere Kontrollelemente, wie z.B. Phorbol ester, c-H-ras und c-jun [Nunez et al., 1989].

*TFF2* liegt in der Mitte des *TFF*-Klusters und verfügt über vier Exons [Tomasetto et al., 1990], von welchen Exon 2 und 3 für die Kleeblattpeptiddomäne kodieren [Gött et al., 1996]. Sie sind durch ein Intron voneinander getrennt, welches ein einzigartiges 25bp Tandem Repeat Cluster enthält [Kayademir et al., 1998].

Das *TFF3* Gen ist ähnlich wie das für *TFF1* aus drei Exons aufgebaut. Hier kodiert ebenfalls Exon 2 für die Kleeblattpeptiddomäne [Seib et al., 1995].

Die Exons der drei Kleeblattpeptidgene ähneln einander. Exon 1 codiert für die Signalsequenz, Exon 2 (bei *TFF2* Exon 2 und 3) für die Kleeblattpeptiddomäne. Exon 3 (bei *TFF2* Exon 4) besteht aus drei bis vier Aminosäuren, sowie der untranslatierten Region [Gött et al., 1996]. Die genomische Organisation des Maus *TFF* Genklusters ist ähnlich der der humanen *TFF* Gene [Kayademir et al., 2000]. Die drei *TFF* Gene weisen aber noch weitere Gemeinsamkeiten auf. So sind in ihrer 5'-flankierenden Region in Sequenz und Anordnung nahezu identische Motive vorhanden. Deshalb liegt die Vermutung nahe, daß die Peptide einer koordinierten Regulation bzw. einer gemeinsamen Lokuskontrollregion unterliegen [Gött et al., 1996].

### 1.3.4 Struktur der Kleeblattpeptide

Die Kleeblattpeptide bestehen aus bis zu 6 cysteinreichen Domänen. Diese Kleeblattdomäne (auch P-Domäne) wird durch die hochkonservierte Anordnung von sechs Cysteinresten charakterisiert, die durch drei Disulphidbrücken miteinander verbunden sind (Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, Cys3-Cys6). Die entstehende kleeblattähnliche Faltblattstruktur (Abbildung 1.3) gibt den Peptiden ihren Namen [Thim, 1989, Podolsky et al., 1993].

Ein reifes TFF1 Peptid besteht aus 60 Aminosäuren, während die unreife Form 84 Aminosäuren lang ist [Mori et al., 1988]. TFF2 ist im “fertigen” Zustand 106, im unreifen 129 Aminosäuren lang [Tomasetto et al., 1990]. TFF3 beträgt in der ausge-



### 1.3.5.1 TFF1

TFF1 wurde ursprünglich 1982 während des Screenings einer cDNA Bibliothek aus der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF7 entdeckt [Masiakowski et al., 1982, Jakowlew et al., 1984]. Das Molekulargewicht von TFF1 beträgt 6674Da; das Protein kann als Monomer und als Dimer vorliegen. Die Fähigkeit, Dimere zu bilden ist funktionell von großer Wichtigkeit. Eine der Rollen, die für die Kleeblattpeptide vorgeschlagen werden, ist, daß einzelne TFF mit Muzinen assoziieren [Chadwick et al., 1997, Polshakov et al., 1994, Tomasetto et al., 2000].

TFF1 wird vor allem von den Mukosazellen des Magens exprimiert, wo es reichlich in den oberflächlichen und foveolaren Epithelien gebildet wird [Rio et al., 1988, Luqmani et al., 1989]. Es wird auch in den oberen Gängen und an der Oberfläche der Brunnerdrüsen des Duodenums [Hanby et al., 1993] exprimiert. Eine schwache Expression von TFF1 wurde ebenfalls in verschiedenen Teilen des gastrointestinalen Trakts beobachtet, wie in den Mikrovillispitzen des Jejunum und Ileum [Piggott et al., 1991], den Speicheldrüsen [Rio et al., 1988] und des Pankreas [Wright et al., 1990b].

Neben dem gastrointestinalen Trakt wird TFF1 auch in anderen mukösen Epithelien exprimiert, z.B. dem Respirationstrakt [dos Santos et al., 2000], im normalen Brustepithelium [Brown et al., 1984, Piggott et al., 1991, Racca et al., 1995] und verstärkt in fast 50% der Brustkarzinomen, wo es als Marker für eine gute Prognose anzusehen ist [Henry et al., 1991, Poulsom et al., 1997].

Außerdem wurde Expression von TFF1 in Karzinomen verschiedener anderer Organe gefunden, z.B. Pankreas [Welter et al., 1992], Endometrium [Henry et al., 1991], Eierstöcke (Muköses Karzinom) [Dante et al., 1994], Prostata [Bonkhoff et al., 1995], Harnblase [Lipponen and Eskelinen, 1994], Gallentrakt [Seitz et al., 1991], Kolorektum [Welter et al., 1994, Labouvie et al., 1997], Ösophagus [Labouvie et al., 1999] und Haut (Muköses Karzinom) [Hanby et al., 1998].

Die TFF1 Expression im Magenkarzinom wurde von verschiedenen Autoren [Luqmani et al., 1989, Henry et al., 1991, Theisinger et al., 1991, Muller and Borchard, 1993] in einer Häufigkeit beschrieben, die zwischen 48% und 57% liegt [Theisinger et al., 1991]. Es konnte eine Assoziation zwischen der *TFF1* Expression und der diffusen Form des Magenkrebses bezüglich einer Korrelation der *TFF1* Expression und der Ausbreitung des Tumorwachstums [Muller and Borchard, 1993] festgestellt werden.

### 1.3.5.2 TFF2

TFF2 wurde erstmals 1982 von Jorgensen et al. während einer Insulinreinigung aus dem Schweinepankreas isoliert [Jorgensen et al., 1982b], damals unter dem Namen porcines spasmolytisches Polypeptid (pSP). 1990 wurde TFF2 (SP) als das menschliche Homolog von pSP identifiziert [Tomasetto et al., 1990].

Beim Menschen, und auch bei Nagern, ist die foveolare Grube des gastrischen Antrums der Hauptexpressionsort von TFF2. Kleinere Mengen werden auch in den

## Kapitel 1. Einleitung

---

Brunnerdrüsen des Duodenums [Hanby et al., 1993], in den duktalem Epithelien des Pankreas [Wright et al., 1990b] und im Epithelium der Gallenblase [Seitz et al., 1991] beobachtet.

Eine verstärkte TFF2 Expression wird nach Verletzungen der Mukosa gefunden [Rio et al., 1991, Poulsom et al., 1992, Wright et al., 1993], bei einigen Arten von Neoplasien des gastrointestinalen Trakts [Hanby et al., 1993, Taupin et al., 1996], im Pankreaskarzinom [Welter et al., 1992], im Magenkarzinom [Theisinger et al., 1991], bei hyperplastischen Polypen des Kolons [Hanby et al., 1993, Taupin et al., 1996], im Barrettösophagus [Hanby et al., 1994, Labouvie et al., 1999] und im Gallenblasenkarzinom [Seitz et al., 1991].

Auch in anderen Spezies wurde TFF2 Expression gezeigt, z.B. beim Schwein in den Acinarzellen des Pankreas, in den Mukuszellen des Duodenums und den Epithelzellen des Jejunums und Ileums. Bei Ratten wird TFF2 hauptsächlich im Antrum gefunden, aber auch in geringen Mengen im Dünndarm. Mäuse exprimieren TFF2 im Magen und Pankreas [Tomasetto et al., 1990, Hanby et al., 1998, Lefebvre et al., 1993].

### 1.3.5.3 TFF3

1991 wurde das humane TFF3 als bislang letzter Vertreter dieser Peptidgruppe entdeckt [Suemori et al., 1991, Hauser and Hoffmann, 1991]. Beim Menschen tritt, ähnlich wie bei der Ratte, TFF3 Expression vor allem in den Becherzellen des Dünndarms und des Kolons, aber auch in den Brunnerdrüsen auf [Hauser et al., 1993, Podolsky et al., 1993]. Schwache TFF3 Expression wurde im menschlichen Uterus [Hauser et al., 1993], in der Brust [Poulsom et al., 1997] und in der Lunge [Wiede et al., 1999] beobachtet.

Eine verstärkte *TFF3* Genexpression wurde in einigen neoplastischen Geweben wie beispielsweise im mukösem Hautkarzinom [Hanby et al., 1998], im Mammakarzinom [Theisinger et al., 1996, Poulsom et al., 1997, May and Westley, 1997] und im Kolonkarzinom [Taupin et al., 1996, Efstathiou et al., 1998] beschrieben.

### 1.3.6 Funktion der Kleeblattpeptide

Die biologische Funktion der Kleeblattpeptide ist bis heute nicht komplett verstanden. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß die Kleeblattpeptide in Schutz- und Heilprozesse involviert sind.

*TFF1* KO-Mäuse zeigen unangemessene zelluläre Differentiationsmuster, Hyperplasie im distalen Teil des Magens und ein völliges Fehlen der epithelialen Magentumerschicht. Dies spricht für das notwendige Vorhandensein von TFF1 bei der Ausbildung des Magendarmtrakts. Zusätzlich neigt ein Drittel dieser Mäuse zur Bildung von Magentumoren und alle zeigen Neoplasien [Lefebvre et al., 1996]. Dagegen bilden *TFF2* und *TFF3* KO-Mäuse einen normalen Phänotyp aus, zeigen jedoch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oral zugeführten Noxen [Farrell et al., 2002,

Mashimo et al., 1996].

Eine schnelle Regeneration der mukösen Integrität des Gastrointestinaltrakts ist wichtig, um die Progression kleiner Schädigungen hin zu signifikanten Geschwüren zu verhindern. Dieser Reparationsmechanismus ist charakterisiert durch eine schnelle Migration von überlebenden Epithelialzellen über die Begrenzung des Geschwürs hinweg zur geschädigten Basalmembran. Diese Bewegung epithelialer Zellen zur Versiegelung von kleinen Wunden geschieht schnell und ohne die Notwendigkeit von Zellteilungen [Lacy et al., 1993, Pignatelli, 1996]. Anschließend erfolgt die Zellproliferation und -differenzierung um die normale Funktion und Aufbau des Gewebes neu auszubilden [Poulsom et al., 1996].

Wie zuvor schon erwähnt, ist die physiologische Rolle der Kleeblattpeptide noch nicht völlig verstanden. Die Anwesenheit der Peptide im Gastrointestinaltrakt und die Assoziation mit Muzinen, mit welchen große, hoch visköse Komplexe ausgebildet werden, deuten darauf hin, daß die Kleeblattpeptide am Schutz des gastrointestinalen Epitheliums beteiligt sind. Aktivität der *TFF* Gene ist nicht nur in malignen Geweben, sondern auch schon in Magengeschwüren, Entzündungen und intestinalen Metaplasien feststellbar. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit dieser Gene in präkanzerösen Phasen der zellulären Irritation [Rio et al., 1991, Machado et al., 1996, Gött et al., 1999].

Frühere Studien haben gezeigt, daß die Expression von *TFF1* und *TFF2* unter normalen Umständen auf den Magen beschränkt ist, jedoch ist eine verstärkte Expression dieser Gene in Ulzerationen des Verdauungstraktes zu beobachten [Rio et al., 1991]. Diese Überexpression ist ebenfalls in Epithelzellen zu bemerken, die über das Geschwür einwandern ("ulcer associated cell lineage"; UACL) [Wright et al., 1993]. UACL entsteht aus den Drüsen und Krypten, die um eine Läsion herumliegen. UACL wird als prototypische Linie angesehen, welche Proteine sekretiert, die wichtig sind bei der Heilung von endodermal-entstandenen Gewebe. Dazu gehören beispielsweise der "epidermal growth factor" (EGF), der "transforming growth factor" (TGF) und TFF [Wright et al., 1990a, Wright et al., 1990b, Hanby et al., 1997].

Mögliche Interaktionen zwischen den Kleeblattpeptiden und diesen Wachstumsfaktoren wurden diskutiert. Studien der Kleeblattpeptidgene in einem *TGF- $\alpha$*  KO-Mausmodell zeigten, daß die Expression von *TFF2* und *TFF3* in der späten Reparaturphase unterdrückt wird. Dies verweist auf die Rolle von *TGF- $\alpha$*  bei der verstärkten *TFF2* und *TFF3* Expression in späteren Phasen der Restitution der gastrischen Mukosa [Cook et al., 1997].

Die Kleeblattpeptide sind außerdem potentielle Motogene, welche die Migration von Kolonozyten beschleunigen [Dignass et al., 1994]. Sie wirken auch als Chemotaxine für Monozyten [Cook et al., 1997], welche zusammen mit den Kolonozyten an der Reparatur der Schleimhaut des Verdauungstrakts nach entzündlichen Schädigungen beteiligt sind.

In durch Essigsäure induzierter experimenteller Kolitis im Rektum von Ratten konnte eine koordinierte Expression von Kleeblattpeptiden während des Heilungsprozesses gezeigt werden: *TFF1* war in der akuten Phase, *TFF3* in der "Erholungsphase" überexprimiert [Itoh et al., 1996].

## Kapitel 1. Einleitung

---

Der experimentelle Einsatz von rekombinanten TFF2 und TFF3 hat verdeutlicht, daß diese Peptide bei Ratten gegen Verletzungen der Magenschleimhaut durch Ethanol, Indomethacin oder Aspirin schützen [Chinery and Cox, 1995, Cook et al., 1998, Konturek et al., 1998]. In einem anderen etablierten Kolitismodell bei Ratten unterstützt die luminale Applikation von rekombinantem TFF2 eine schnelle Heilung des Epithels und reduziert entzündliche Prozesse [Tran et al., 1999].

Studien an transgenen Mäusen, welche humanes *TFF1* im Jejunum überexprimieren, zeigten eine verstärkte Resistenz gegenüber Schädigungen. Dieser schützende Effekt war in Abschnitten des Darms, die von der Überexpression nicht betroffen waren, nicht vorhanden. Diese Beobachtung legt nahe, daß der Schutz durch *TFF1* Expression durch lokal beschränkte Effekte vermittelt wird [Playford et al., 1996].

Es werden mindestens zwei verschiedene Mechanismen diskutiert, durch welche die Kleeblattpeptide ihre Hauptfunktionen ableiten. Eine Theorie bezieht sich dabei auf die Möglichkeit, daß TFFs und Muzine das epitheliale Gewebe auf synergistische Weise schützen und wieder aufbauen [Dignass et al., 1994, Kindon et al., 1995, Tomasetto et al., 2000]. Gemäß dieser Theorie würden Kleeblattpeptide und Muzine interagieren und so die schützende Funktion der Mukusschicht verstärken [Otto and Wright, 1994]. Diese Hypothese wird unterstützt durch verschiedene Voruntersuchungen, welche zeigten, daß die Applikation von TFF2 und TFF3 die Viskosität von Muzingelen erhöht [Babyatsky et al., 1996]. In anderen Studien konnte die Co-Expression von Kleeblattpeptiden und Muzinen beobachtet werden [Gajhede et al., 1993, Carr et al., 1994]. TFF1 wird in Mukuszellen der gastrischen Oberfläche zusammen mit den Muzinen MUC1 und MUC5AC produziert. *TFF2* wird in den mukösen "neck cells" (MNC) des Magens und in Zellen am Grund der Drüsen des Antrums zusammen mit *MUC6* exprimiert. TFF3 und MUC2 werden beide in intestinalen Becherzellen gebildet [Wright et al., 1993, Sands and Podolsky, 1996].

Betrachtet man die prämaligne und kanzeröse Situation, stellt sich ebenfalls ein spezifisches Muster der *TFF* und der *Muzin* Co-Expression dar. Studien am Barrettösophagus beispielsweise zeigten eine Co-Expression von Kleeblattpeptiden und Muzinen. Es scheint, daß *TFF1*, *MUC1* und *MUC5AC* während früher neoplastischer Prozesse, korrespondierend zur Barrett Metaplasie, hochreguliert sind. Dagegen zeigten alle Fälle von Barrett Metaplasie und Plattenepithelkarzinom des Ösophagus keine Expression von TFF2 und MUC2 [Labouvie et al., 1999].

Eine Hochregulation der *TFF1* Expression wurde in Magenpolypen mit malignen Transformationsherden entdeckt. In der gleichen Studie wurde eine Co-Expression von *TFF1* und *MUC5AC* identifiziert. In allen Fällen von Magenpolypen mit maligner Transformation konnte keine *TFF2* Expression entdeckt werden [Nogueira et al., 1999].

*TFF3* Expression wurde im kolorektalen Karzinom beobachtet, assoziiert mit einem Verlust der Differenzierung und der Co-Lokalisation mit MUC2 [Taupin et al., 1996]. Außerdem wurde Expression von *TFF1*, *TFF3*, *MUC1* und *MUC2* in einzelnen Fällen von Rektumkarzinom gefunden, assoziiert mit einem Ausfall der *TFF2* Expression [Labouvie et al., 1997].

Die zweite Theorie besagt, daß die Kleeblattpeptide an einen putativen Zelloberflächenrezeptor binden und dadurch eine Signalkaskade auslösen, die unter anderem Reparaturenzyme aktiviert. Entsprechend der zweiten Hypothese, konnte gezeigt werden, daß in gastrointestinalen Zellen TFF3 den Rezeptor des EGF modulieren kann [Chinery et al., 1995]. TFF3 induziert eine schnelle Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, welches mit Störungen der funktionellen Integrität des E-Cadherin/Catenin Systems assoziiert ist [Liu et al., 1997].

Ergänzende *in vitro* Studien haben gezeigt, daß die Induktion der Kleeblattpeptid-Transkription nach Verletzungen der Mukosa durch Aktivierung des Ras/MEK/MAP Kinase Signalweges und Aktivierung von EGF-R vermittelt wird [Taupin et al., 1999]. Diese Beteiligung an der zytoplasmatischen Signaltransduktion spricht stark für eine Rezeptor-vermittelte Funktion. Das Vorhandensein eines Rezeptors wird auch aufgrund von *in vitro* Studien an Zellmembranen der intestinalen Mukosa von Ratten und an Gefrierschnitten vermutet. Bindung von  $^{125}\text{I}$ -TFF3 und  $^{125}\text{I}$ -TFF2 konnte an Schnitten der Niere, des Oberflächenepithels des Magens und des Krypteneithels des Dünn- und Dickdarms lokalisiert werden [Chinery and Playford, 1995, Tan et al., 1997, Poulsen et al., 1998]. Diese Ergebnisse unterstützen die These eines spezifischen Rezeptors auf diesen Zellen. Bis zum heutigen Tag wurde jedoch noch kein putativer Kleeblattpeptid Rezeptor kloniert oder charakterisiert.

Kürzlich konnte in einer Studie gezeigt werden, daß aus Kolonkarzinom gewonnene Zelllinien, die das Adhäsionsmolekül E-Cadherin nicht exprimieren, nicht auf den Migrationseffekt von TFF2 reagieren [Efstathiou et al., 1999]. Jedoch erhöht Transfektion von E-Cadherin cDNA die Zellmigration hier signifikant. So scheint der stimulierende Effekt von TFF2 mit E-Cadherin assoziiert zu sein.

Es gibt auch andere Experimente, die eine Interaktion von Kleeblattpeptiden mit den E-Cadherin/Catenin und dem "adenomatous polyposis coli" (APC)-Catenin Komplexen untermauern. Hier wurde gezeigt, daß Stimulation mit Ratten-TFF3 zu einem verminderten Zellrasen und interzellulärer Adhäsion in der Kolonzelllinie HT-29 führte. Zusätzlich war eine gestörte Regulation der Expression und der zellulären Lokalisation von E-Cadherin, Catenin und APC zu erkennen. Die funktionelle Wiederherstellung des E-Cadherin Komplexes erfolgte durch die Applikation von Tryphostin. Dies spricht dafür, daß Tyrosinphosphorylierung durch Ratten-TFF3 vermittelte Veränderungen reguliert [Efstathiou et al., 1998].

Schließlich weist einiges auf die tumorsuppressive Wirkung von TFF *in vitro* und *in vivo* [Calnan et al., 1999, Uchino et al., 2000]. Es wurde beobachtet, daß die Kleeblattpeptid Expression in Kolon- und Magenkarzinomen vermindert ist [Uchino et al., 1997, Nogueira et al., 1999]. Außerdem zeigt sowohl der genetische Beweis als auch die Abwesenheit von TFF1 in 43% der Magenkarzinome, daß zumindest dieses als Tumorsuppressor zu wirken vermag [Luqmani et al., 1989, Park et al., 2000b, Park et al., 2000a].

### 1.4 An der Regulation der *TFF* Gene beteiligte Transkriptionsfaktoren

Die *TFF* Genexpression wird in der Embryonalentwicklung kontrolliert reguliert und tritt schon vor der Differenzierung von Mukuszellen auf [Otto and Patel, 1999]. Es ist anzunehmen, daß ihre Regulation von Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird. Einige Faktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Verdauungstraktes und der Regulation darmspezifischer Gene wie *HNF-1*, *HNF-3*, *HNF-4*, *COUP-TF* und *Cdx-2* [Gao et al., 1998]. Kürzlich konnten Al azzeh et al. zeigen, daß der Transkriptionsfaktor GATA-6 die Expression von *TFF1* und *TFF2* aktiviert [Al azzeh et al., 2000]. Eine Aktivierung von *TFF1* kann außerdem durch die Bindung von "hepatocyte nuclear factor" (HNF) 3 an die TATA-Box des *TFF1* Promotors [Beck et al., 1999], von *TFF2* durch Bindung von "upstream stimulating factor" (USF) an ein E-Boxelement im *TFF2* Promotor erzielt werden (Al azzeh et al., Gut, 2002, in press). Desweiteren konnte die *TFF* Expression durch osmotische Schwankungen und Ethanol in gastrointestinalen Zelllinien induziert bzw. modifiziert werden [Lüdeking et al., 1998].

Bei der Untersuchung der Regulationsmechanismen der *TFF* Gene im Gastrointestinaltrakt, konnten einige neue DNA Motive in der 5'-flankierenden Kontrollregion der drei humanen *TFF* gefunden werden. Ein Transkriptionsfaktor, dem möglicherweise Bedeutung bei der *TFF* Regulation zukommt, ist der Nuklear Faktor kappa B ( $\text{NF}\kappa\text{-B}$ ), der eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Immunantwort und der Entstehung von Entzündungen spielt. Alle drei *TFF* Promotoren besitzen putative Bindestellen für  $\text{NF}\kappa\text{-B}$ . Dieser Faktor wird unter anderem von  $\text{IL1}\beta$  aktiviert, welches (neben anderen Faktoren, wie  $\text{TNF}\alpha$ , freie Sauerstoffradikale oder UV-Licht) nach Rezeptorbindung eine Signalkaskade in Gang setzt, die die Degradation des Inhibitors ( $\text{I}\kappa\text{B}$ ) des Nuklear Faktors  $\kappa\text{B}$  verursacht. Dadurch kommt es zu einer Loslösung von  $\text{NF}\kappa\text{-B}$ , das an  $\text{I}\kappa\text{B}$  gebunden im Zytoplasma vorliegt, und zu einer Wanderung in den Zellkern [Ghosh et al., 1998]. Dort wiederum aktiviert  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  die Transkription verschiedener Komponenten der Immunantwort und es kommt zu einer weiteren  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  Aktivierung [Jobin and Sartor, 2000, Schmid and Adler, 2000]. Meist liegt  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  als Heterodimer der Untereinheiten p50 und p65 vor [Ballard et al., 1992].

Ein anderer Transkriptionsfaktor, dessen putative Bindestellen in der 5'-flankierenden Region der drei *TFF* Gene gefunden wurden, ist das "CCAAT enhancer binding" Protein (C/EBP)  $\beta$ . Dieser Faktor wird (neben STAT3) von  $\text{IL6}$  aktiviert. Die C/EBP Transkriptionsfaktor Familie gehört zu einer Klasse von DNA Bindungsproteinen mit Namen bZIP Proteine [Vinson et al., 1989]. Diese Proteine sind durch ihre Leuzinzipper-Struktur und der danebenliegende DNA-Bindungsregion, beides am C-Terminus des Proteins, charakterisiert. Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) stimuliert die Phosphorylierung und die Translokation von C/EBP $\beta$  in den Nukleus und somit die Bindung von C/EBP $\beta$  an DNA und die anschließende Aktivierung der Genexpression.

Interessanterweise können Mitglieder der  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  und der  $\text{C/EBP}$  Familien miteinander interagieren [Stein et al., 1993]. So konnten Begbie et al. zeigen, daß der Faktor VIII der Akutphase-Antwort die Beteiligung beider Transkriptionsfaktoren,  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  und  $\text{C/EBP}$  benötigt [Begbie et al., 2000].

### 1.5 Ziel der Arbeit

Obwohl die konkrete physiologische Funktion der Kleeblattpeptide im großen und ganzen noch weitgehend ungeklärt ist, scheinen sie doch einerseits eine wichtige Rolle beim Schutz und bei der Heilung der gastrointestinalen Mukosa zu spielen und andererseits Tumorwachstum zu unterdrücken. Da die Kleeblattpeptid Expression auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, würde ein besseres Verständnis der Signalwege und der Faktoren, die an der Regelung der Transkription der *TFF* Gene beteiligt sind, eine Möglichkeit zur Therapie gastrointestianler Krankheiten bieten.

Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob die proinflammatorischen Cytokine  $\text{IL1}\beta$  und  $\text{IL6}$  Einfluß auf die *TFF* Transkription ausüben. Zu diesem Zweck wurde die *TFF* Reporter gen Aktivität nach Stimulation mit  $\text{IL1}\beta$  und  $\text{IL6}$  bei verschiedenen gastrointestinalen Zelllinien mittels Luziferaseassay gemessen. Die endogene *TFF* Expression wurde mittels Multiplex-RT-PCR und Realtime-PCR untersucht.

In Co-Transfektionsexperimenten wurde die Wirkung der beiden Transkriptionsfaktoren  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  und der  $\text{C/EBP}\beta$  auf die *TFF* Reporter gen Expression untersucht.

Der zweite Ansatz, der in dieser Arbeit untersucht werden sollte, war die Frage, ob die Kleeblattpeptide Einfluß auf die Cytokinexpression von Immunzellen haben. Rekombinante *TFF* Peptide schützen bei Ratten die Magenschleimhaut vor Verletzungen durch Ethanol, Indomethacin oder Aspirin [Chinery and Cox, 1995, Cook et al., 1998, Konturek et al., 1998], unterstützten eine schnelle Heilung des Darmepithels und reduzieren entzündliche Prozesse bei induzierter Kolitis [Tran et al., 1999]. Dafür wurden die promyeloische Zelllinie HL-60 und frisch isolierte polymorphkernige neutrophile Granulozyten mit rekombinanten Kleeblattpeptiden stimuliert und anschließend mittels Multiplex-PCR (RT-PCR) untersucht.



# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verwendete Puffer und Reagenzien

##### **Agarosegel (1%)**

Agarose	1,0g
TAE Puffer (1×)	100ml

##### **Dextran 5% in NaCl 0,9%**

Dextran T 500	50g
NaCl (0,9%)	950ml

##### **Ethidiumbromid**

Ethidiumbromid	1µg/ml in 1× TAE
----------------	------------------

##### **NaCl 1,8%**

NaCl	9g
H <sub>2</sub> O dd	500ml

##### **20× PBS**

NaCl	85,0g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	14,23g
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,35g
H <sub>2</sub> O dd	500ml

Sterilisation

## Kapitel 2. Material und Methoden

---

### **PMN-Puffer**

1 × PBS steril pH=7,4

50% Glucose

1% Glucose in PBS

Sterilfiltration (0,22 $\mu$ m)

### **Polyacrylamidgel (6%)**

H<sub>2</sub>O 21ml

TBE Puffer (1 ×) 4,5ml

Bis-Polyacrylamid (19:1) 4,5ml

APS 250 $\mu$ l

Temed 30 $\mu$ l

### **6 × Probenpuffer**

Bromphenolblau 0,25%

Xylencyanol 0,25%

Ficoll 0,15%

### **2 × RNA Ladepuffer**

Bromphenolblau 0,05g

99% Formamid 100ml

### **10 × TAE Puffer**

Tri-HCl 400mM

Natriumacetat 50mM

EDTA 10mM

pH=8,0

### **10 × TBE Puffer**

Tri-Base 890mM

Borsäure 890mM

EDTA 25mM

pH=8,0

### 2.1.2 Zelllinien

Zelllinie	Art	Kultur	Referenz
HT-29	Adenokarzinom des Kolons	Waymouth, 10% FCS	ATCC # HTB 38
LS 174 T	Adenokarzinom des Kolons	DMEM 4500, 10% FCS	G. Stamp, London, ATCC # HTB 188
KATO III	Adenokarzinom des Magens	DMEM 4500, 10% FCS	G. Stamp, London, ATCC # HTB 103
MKN-45	Adenokarzinom des Magens	RPMI 1640, 20% FCS	Machado, Porto
HL-60	Promyeloische Leukämie	RPMI 1640, 10% FCS, 1% AB	Bühring, Tübingen

**Tabelle 2.1:** Liste der getesteten Zelllinien.

### 2.1.3 Primer

Methode	Name	Lokalisation	Sequenz	Zweck
TFF-Multipl.-u. Realtime-PCR	PS1	pos. 21, exon 1	TTTGGAGCAGAG AGGAGGCAATG	Testen der TFF1-Expression
	PS2	pos. 166, exon 2	ACCACAATTCTGT CTTTCACGGGGG	
TFF-Multiplex-PCR	TFF2 F	pos. 158, exon 2	GTGTTTTGACAAT GGATGCTG	Testen der TFF2-Expression
	TFF2 R	pos. 258, exon 3	CCTCCATGACGCA CTGATC	
Realtime-PCR	RTF2 F	pos. 112, exon 2	CCCATAACAGGAC GAACTGC	Testen der TFF2-Expression
	RTF2 R	pos. 247, exon 3	GCACTGATCCGAC TCTTGCT	
TFF-Multiplex-PCR	ITF F	pos. 140, exon 2	AACCGGGGCTGC TGCTTTG	Testen der TFF3-Expression
	ITF R	pos. 234, exon 3	GAGGTGCCTCAG AAGGTGC	

## Kapitel 2. Material und Methoden

Realtime-PCR	RTF3 F RTF3 R	pos. 22, exon 1 pos. 128, exon 2	CTTGCTGTCCTCC AGCTCT CCGGTTGTTGCAC TCCTT	Testen der TFF3-Expression
TFF-Multiplex-PCR	GAPDH F GAPDH R	pos. 610 pos. 724	ACCCAGAAGACT GTGGATGG GGATGACCTTGCC CACAG	Kontrolle
Realtime-PCR	GAPDH 2F GAPDH 2R		TGCACCACCAACT GCTTAG GATGCAGGGATG ATGTTC	Kontrolle
Cytokin-Multiplex-PCR	IL1 $\beta$ F IL1 $\beta$ R	pos. 179 pos. 401	TGTGGCGTTGGG CCTCAAG GGTACCACCCAGG AAGAC	Testen der IL1 $\beta$ Expression
Cytokin-Multiplex-PCR	IL6 F IL6 R	pos. 450 pos. 647	GAGAGTAGTGAG GAACAAGCC GCTGGACTGCAGG AACTCC	Testen der IL6 Expression
Cytokin-Multiplex-PCR	IL8 F IL8 R		CTTCCAAGCTGGC CGTGGC CAGCCCTCTTCAA AAACTTCTT	Testen der IL8 Expression
Cytokin-Multiplex-PCR	TNF $\alpha$ F TNF $\alpha$ R		CGTGGAGCTGGC CGAGGA CCAGCTGGTTATC TCTCAGC	Testen der TNF $\alpha$ Expression
Cytokin-Multiplex-PCR	TGF $\beta$ F TGF $\beta$ R		CCCTGGACACCA CATATTGCT CTCCAAATGTAGG GGCAGG	Testen der TGF $\beta$ Expression

**Tabelle 2.2:** Liste der verwendeten Primerpaare. F und R bezeichnen die jeweiligen Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer.

### 2.1.4 Plasmide und Reporter-gen Konstrukte

Plasmid-name	Beschreibung	Vektor	Referenz	Plasmid-größe	Resis-tenz
pRL-CMV	Renilla Luciferase mit CMV-Promotor	pRL	Promega	4,079kb	amp
pGL3-TFF1	TFF1-Promotor 1100 bp	pGL3-basic	Beck, Gött	6,100kb	amp
pGL3-TFF2	TFF2-Promotor 821 bp	pGL3-basic	Beck, Gött	5,690kb	amp
pGL3-TFF3	TFF3-Promotor 867 bp	pGL3-basic	Beck, Gött	5,700kb	amp
pMT2T-p50	Expressionsplasmid	PMT2T	Bours, Burd	~6,5kb	amp
pMT2T-p65	Expressionsplasmid	PMT2T	Bours, Burd	~6,5kb	amp
MSV/EBP $\beta$	Expressionsplasmid	pBlue-script	Lüscher	~4,5kb	amp

**Tabelle 2.3:** Liste der verwendeten Plasmide und Reporter-gen Konstrukte. amp: Ampicillin.

## 2.2 Methoden I

Um die Wirkung proinflammatorischer Cytokine auf die *TFF* Expression zu untersuchen, wurden die Kolonkarzinom Zelllinien HT-29 und LS 174 T, sowie die Magenkarzinom Zelllinien KATO III und MKN-45 verwendet.

### 2.2.1 Zellkultur

Die verschiedenen Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden und ihre jeweiligen Kulturmedien sind in Tabelle 2.1 dargestellt. Die Zellen wurden bei 37°C, 6,9% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in 25cm<sup>2</sup> Kulturflaschen kultiviert. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums wurde die semi-adhärende Zelllinie KATO III mit Hilfe eines Zellschabers, die adhären den Zellen HT-29, LS 174 T und MKN 45 mittels Trypsinierung vom Boden der Kulturflasche gelöst. Um das im Medium enthaltene Serum, welches die Trypsinierung behindert, zu entfernen, wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde eine Trypsin/EDTA Lösung auf die Zellen gegeben und diese bei 37°C inkubiert. Um die Trypsinierung zu stoppen, wurde dann das jeweilige Medium mit Serum zupipettiert. Nach Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets wurden die gelösten

## Kapitel 2. Material und Methoden

Zellen mit dem jeweiligen Medium verdünnt und in einer Dichte von 40% Konfluenz auf 96-well Platten (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) für die Transfektionsexperimente und auf 24-well Platten (Costar, Corning Incorporated, NY, U.S.A.) für die RT-PCR-Experimente gebracht.

### 2.2.2 Reportergentechnologie

Als Reportergene werden Gene bezeichnet, die für gut detektierbare bzw. quantifizierbare Produkte kodieren. Vor das Reportergen werden Promotor- oder Enhancersequenzen kloniert, um Informationen über deren regulatorische Effekte auf die Genexpression zu erhalten. In dieser Arbeit wurde der Reportergenvektor pGL3-basic (Promega, Madison, WI, U.S.A.) (Abbildung 2.1) verwendet. Er ist gut geeignet, um cis-aktive Sequenzen wie z.B. Promotoren oder Enhancer einzuklonieren und deren Zusammenspiel mit trans-aktiven Faktoren zu analysieren. Für die Studien dieser Arbeit war dies von besonderer Bedeutung, da es ermöglichte, den Einfluß externer Stimulantien auf die Expression eines bestimmten Gens zu untersuchen.

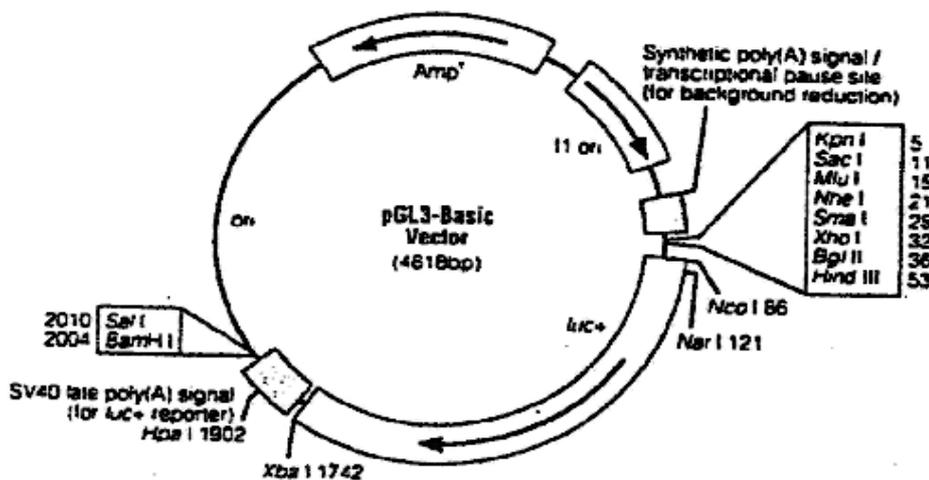


Abbildung 2.1: Vektor für Reportergenstudien pGL3-Basic.

Dem pGL3-Basic Vektor fehlen ein eukaryotischer Promotor sowie Enhancersequenzen. Er enthält als Reportergen das Luziferasegen. Zur Herstellung der rekombinanten TFF Konstrukte wurden vor das Luziferasegen jeweils Fragmente der 5'-flankierenden Region der drei humanen TFF-Gene kloniert (TFF1: -1100 bis +38, TFF2: -821 bis +61, TFF3: -867 bis +63) [Beck et al., 1998].

### 2.2.3 Transfektion

Mittels Transfektion wird Fremd-DNA in eukaryotische Zellen eingeschleußt. Dadurch können z.B. Effekte putativer Promotoren von Zielgruppen oder anderer regula-

torischer Elemente untersucht oder Mutationsanalysen durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde die transiente Transfektion angewendet. Bei der transienten Transfektion wird die Fremd-DNA zwar in den Zellkern der Zellen eingebracht, aber im Gegensatz zur stabilen Transfektion nicht in das Genom integriert. Die Transfektionseffizienz ist von verschiedenen Parametern abhängig. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Transfektion ist eine gesunde Zellkultur mit optimalen Kulturbedingungen. Dabei spielen das Medium und eventuelle Zusätze, wie Serum oder Antibiotika eine wichtige Rolle. Die Zellen sollten 24Std vor der Transfektion gesplittet, das heißt vom Boden der Kulturflasche gelöst und ausgedünnt werden. Auf keinen Fall sollten sie sich zum Zeitpunkt der Transfektion in der konfluenten oder stationären Phase befinden. Die Art des zu transfizierenden Vektors beeinflusst ebenfalls die Effizienz der Transfektion, hier sind vor allem die Konfiguration und die Größe des Vektors zu nennen. Die Transfektion ist mit supercoiled Plasmid-DNA am effektivsten. Außerdem sollte die Plasmid-DNA einen hohen Reinheitsgrad besitzen, das heißt möglichst RNA- und proteinfrei sein. Ein wichtiger Aspekt zur Erzielung einer optimalen Transfektionseffizienz ist die Wahl der Transfektionsmethode.

### 2.2.3.1 Transfektion mittels kationischer Polymere

In dieser Arbeit wurde die Transfektion mit ExGene 500 (MBI, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) durchgeführt. Hierbei beruht die Fremd-DNA-Einschleuung auf dem Prinzip der Transfektion mit kationischen Polymeren. Daneben existieren noch weitere Methoden wie die Calcium-Phosphat Transfektion, die Elektroporation oder die liposomale und die nicht-liposomale Lipid-Transfektion. Bei der ExGene 500 Methode interagiert das Makromolekül Polyethylenimin (PEI), welches eine sehr hohe kationische Ladungsdichte besitzt, mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrad der DNA. Dies führt zur Kondensation der DNA. Dieser kondensierte DNA-PEI-Komplex wird von den Zellen durch Endozytose aufgenommen. Für den Reporterassay wurden für ein Well einer 96-well Platte mit 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension folgende Transfektionsgemische in zwei Reaktionsgefäßen angesetzt:

1. 4,2 $\mu\text{l}$  150mM NaCl  
325ng Reporterplasmid  
37,5ng pRL-CMV Kontrollplasmid
2. 4 $\mu\text{l}$  150mM NaCl  
1 $\mu\text{l}$  ExGene 500

Für die Co-Transfektionsexperimente wurde 320ng des Reporterplasmids und 96ng der in Tabelle 2.3 dargestellten Expressionsplasmide verwendet. Die beiden Lösungen wurden gemischt und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde in jedes Well 10 $\mu\text{l}$  des Transfektionsgemischs pipettiert, die Platten bei Raumtemperatur für 5min bei 300g (ca. 1200rpm) zentrifugiert und dann im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Nach 6Std wurde das komplette Medium mitsamt

## Kapitel 2. Material und Methoden

---

Transfektat entfernt und durch frisches Medium ohne Serum ersetzt. Anschließend wurden die transfizierten Zellen stimuliert.

### 2.2.4 Stimulation

Um zu untersuchen, ob Cytokine Wirkung auf die exogene TFF Expression zeigen, wurden die Kolonzelllinien HT-29 und LS 174 T, sowie die Magenzelllinien KATO III und MKN-45 nach der Transfektion bzw. der Co-Transfektion mit 2ng (Endkonzentration) IL1 $\beta$ , bzw. IL6 (Biomol, Hamburg) und der Kombination beider Cytokine stimuliert. Nicht transfizierte Zellen wurden ebenso stimuliert, um die endogene Expression der *TFF* Gene zu untersuchen.

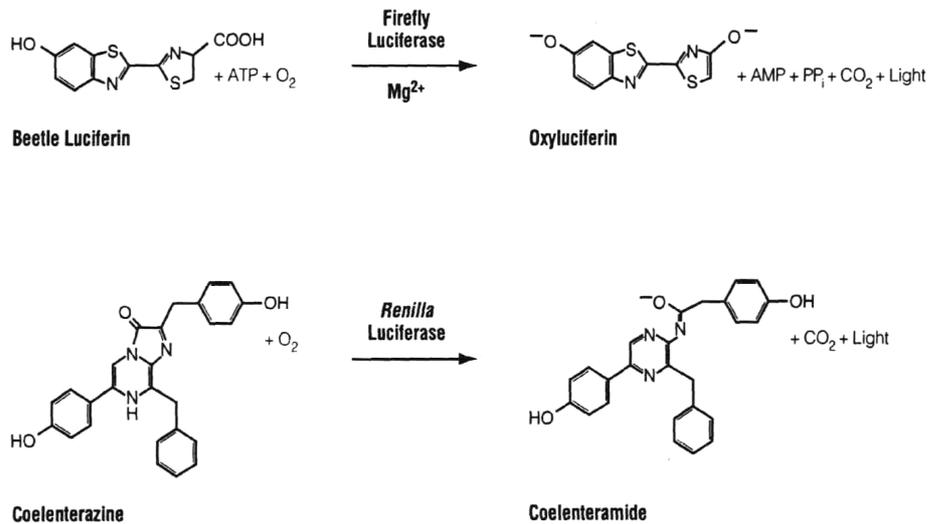
### 2.2.5 Luminiszenznachweis der enzymatischen Luziferaseaktivität

Die Reporterexpression wurde 48Std nach der Transfektion (42Std nach Stimulation) mittels Dual-Luciferase Reporter Assay<sup>TM</sup> (DLR-Assay) (Promega) nachgewiesen. Hierbei werden zwei Reporter verwendet. Zur Standardisierung der Transfektionseffizienz und zur Berechnung der Transkriptionsaktivität wird die Renilla Luziferase (pRL-CMV, Promega) verwendet. Das Verhältnis des Reporters Firefly Luziferase zur internen Kontrolle Renilla Luziferase minimiert experimentelle Schwankungen, denen die Meßwerte sonst ausgesetzt sind. Experimentelle Schwankungen entstehen durch unterschiedliche Zahl und Vitalität der Zellen, Transfektionseffizienz und Lysiseffizienz. Der Kontrollvektor der Renilla Luziferase wird zusammen mit dem Reporter-genvektor transfiziert. Die unterschiedlichen Substratanforderungen der Luziferasen, die durch deren jeweilige enzymatische Struktur zustandekommen, ermöglichen es, beide Enzymaktivitäten nacheinander selektiv in einem Reaktionsgefäß zu messen. Die Photonenemission von Firefly Luziferase entsteht durch die Oxidation von Beetle Luciferin. Diese Oxidation wird katalysiert durch das Translationsprodukt Firefly Luziferase und findet in Gegenwart von ATP, Mg<sup>2+</sup> und O<sub>2</sub> statt (Abbildung 2.2). Bei der von Renilla Luziferase katalysierten Lumineszenzreaktion wird nur O<sub>2</sub> und Coelentrizin benötigt (Abbildung 2.2).

Vor der Luminiszenzmessung wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 20 $\mu$ l Passive-lysis Puffer 20min lang lysiert. Je 5 $\mu$ l Zellysat wurden mit 20 $\mu$ l Firefly Luziferase in einem Messröhrchen vermischt und sofort in einen Luminometer (Lumat LB 9501, Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad) gestellt. Dort wurde die Photonenemission in einem Zeitraum von 10sek gemessen. Nach Messung der Firefly Luziferase Aktivität wurde die Luminiszenz der Renilla Luziferase nach Zugabe des entsprechenden Substrats gemessen. Die relative transkriptionelle Aktivität gibt folgender automatisch berechneter Quotient an:

$$\frac{\text{EA1 Firefly Luziferase}}{\text{EA2 Renilla Luziferase}}$$

EA1: Enzymaktivität der Firefly Luziferase  
EA2: Enzymaktivität der Renilla Luziferase.



**Abbildung 2.2:** Die durch Firefly und Renilla Luziferase katalysierten Biolumineszenzreaktionen.

Bei der Versuchsauswertung wurde dieses Verhältnis Firefly Luziferase zu Renilla Luziferase mit dem gleichen Verhältnis einer unstimulierten Kontrolle verglichen. Der Luziferase-Assay wurde jeweils in Triplets an mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt. Daraus wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

## 2.2.6 RT-PCR

### 2.2.6.1 RNA-Isolation

Die nicht transfizierten stimulierten Zellen wurden nach 5, 24, 48 und 72Std Inkubation im Brutschrank mit RNA-pure (Peqlap, Erlangen) abgeerntet. Pro Well wurden 200 $\mu$ l RNA-pure auf die Zellen gegeben und bei Raumtemperatur 5min auf einem Cellshaker inkubiert. Anschließend wurden die in RNA-pure lysierten Zellen in sterile EppendorfgefäÙe (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) überführt. Die RNA wurde mittels Chloroform-Extraktion gewonnen. Dazu wurde in jedes ReaktionsgefäÙ 30 $\mu$ l Chloroform pipettiert, 15sek gevortext und 5min auf Eis inkubiert. Danach wurde bei 14000rpm und 4°C 30min zentrifugiert. Der wäÙrige Überstand wurde in neue ReaktionsgefäÙe überführt. Zur Fällung der RNA wurde die gleiche Menge Isopropanol zugegeben. Anschließend wurde bei 14000rpm und 4°C 15min zentrifugiert,

## Kapitel 2. Material und Methoden

---

der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 $\mu$ l 75% Ethanol gewaschen. Nach der Lufttrocknung wurde das Pellet in 20 $\mu$ l RNase-freiem Wasser gelöst. Die Qualität der RNA wurde mittels eines Konzentrationsgels überprüft. Dazu wurde 2 $\mu$ l RNA mit 2 $\mu$ l RNA-Ladepuffer gemischt, 15min bei 65°C inkubiert und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (Laufbedingungen: 250mA, 100V, 1,5Std).

### 2.2.6.2 Reverse Transkription

Anschließend wurde die RNA unter folgenden Bedingungen in cDNA umgeschrieben:

- a) 37°C für 60min,
- b) 94°C für 2min.

RT-Reaktionansatz:

RNA	1,0 $\mu$ g
Oligo(dt) <sub>15</sub> (50 $\mu$ M)	1,0 $\mu$ l
5 $\times$ RT-Puffer	5,0 $\mu$ l
dNTP-Mix (je 5mM)	5,0 $\mu$ l (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ l
MMLV-RT (50U/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ l
DTT 500mM	0,3 $\mu$ l
RNase-freies H <sub>2</sub> O dd	ad 25,0 $\mu$ l

Die gewonnene cDNA wurde desweiteren bei der Multiplex- und der Realtime-PCR eingesetzt.

### 2.2.6.3 Multiplex-PCR

Die Multiplex-PCR ist eine semi-quantitative Nachweismethode. Hierbei wird die Expression eines zu untersuchenden Gens immer mit der Expression eines co-amplifizierten Standardgens, in dieser Arbeit des Haushaltsgens Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), verglichen. Die TFF-Multiplex-PCR wurde mit einer Menge an cDNA durchgeführt, die 0,2 $\mu$ g RNA entsprach. Die Primerpools enthielten TFF1 (146 bp)/TFF2 (101bp)/GAPDH (115 bp) oder TFF1/ TFF3 (92 bp)/GAPDH. Die Oligonukleotide wurden anhand der cDNA oder der genomischen Sequenz der drei TFF Gene designt. Dabei wurden die Primer so gewählt, daß vergleichbar große PCR-Produkte amplifiziert wurden.

TFF-Multiplex-PCR Reaktionsansatz:

cDNA	4,0 $\mu$ l
10 $\times$ PCR-Puffer	4,0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25mM	2,0 $\mu$ l
dNTP-Mix (je 5mM)	2,0 $\mu$ l
Primerpool (je 3,3 $\mu$ M)	4,0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O dd	23,0 $\mu$ l
Taq-Polymerase (5U/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ l
Endvolumen	40,0 $\mu$ l

Schritt	Status	Temperatur	Dauer
Schritt I	Denaturierung	94°C	4min
Schritt II (27 bzw. 30 Zyklen)	Denaturierung	94°C	45sek
	Annealing	57°C	1min
	Extension	72°C	1min
Schritt III	Extension	72°C	5min
	Ende	4°C	

**Tabelle 2.4:** Laufbedingungen der TFF-Multiplex-PCR.

Die entstandenen Genprodukte wurden zur Analyse auf ein 6%iges Polyacrylamid-TBE-Gel aufgetragen (Laufbedingungen 160V, 250mA, 1,5Std) und mit Ethidiumbromid angefärbt. Anschließend wurden die Bandenintensitäten mittels einer Charged Coupled Device (CCD) Kamera (L.T.F., Wasserburg) bestimmt und als Prozent der GAPDH Kontrolle dargestellt.

#### 2.2.6.4 Realtime-PCR

Die Methode der Realtime-PCR bietet, im Gegensatz zur herkömmlichen PCR, die Möglichkeit, eine exakte Quantifizierung von PCR-Produkten über einen sehr großen dynamischen Bereich zu erhalten. Die Realtime-PCR-Systeme detektieren Fluoreszenzsignale, die mit der PCR-Produktbildung durch die Taq-Polymerase einhergehen. Voraussetzung ist dabei, daß die Reaktionen Hybridisierungs-sonden oder an Doppelstrang-DNA bindende Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR Green I enthalten. Im einfachsten Fall erfolgt die Detektion mit SYBR Green I, wenn es an Doppelstrang-DNA bindet und dadurch die Fluoreszenzintensität ansteigt. Die Quantifizierung basiert auf der Software-gestützten Berechnung eines Fluoreszenzschwellenwertes. Der Zyklus, in dem eine zu untersuchende Probe diesen berechneten Fluoreszenzschwellenwert signifikant überschreitet, wird als Schwellenwertzyklus (Threshold Cycle) der jeweiligen Probe zugewiesen. Der Schwellenwert wird umso eher erreicht je mehr Zielsequenzen sich in der zu untersuchenden Probe befinden. Die Quantifizierung erfolgt durch den Vergleich des der Probe zugewiesenen Schwellenwertzyklus (Ct) mit den ermittelten Schwellenwertzyklen der im gleichen Lauf parallel amplifizierten DNA-Standards (des gleichen Gens) bekannter Kopienzahl und mittels einer daraus abgeleiteten Korrelationsgeraden. Erfolgt der Display der Realtime-PCR-Reaktion online, kann der Prozeß der PCR-Produktbildung während jedes Temperaturschrittes aller PCR-Zyklen kontinuierlich und zu jedem Zeitpunkt mitverfolgt werden. Einige Realtime-PCR Systeme bieten die Möglichkeit der Schmelzkurvenanalyse, um unterschiedliche mit SYBR Green I gefärbte PCR-Produkte voneinander zu unterscheiden. Dabei wird als Indikator für die Bildung von Einzelsträngen aus den PCR-Doppelstrangprodukten die Fluoreszenzabnahme

## Kapitel 2. Material und Methoden

---

bei einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung in der Reaktion gemessen. Eine Unterscheidung ist dann möglich, wenn der Schmelzpunkt der spezifischen Sequenz sich wesentlich vom Schmelzpunkt der unspezifischen Sequenz unterscheidet. Das ist der Fall, wenn die Homologien der Doppelstränge und deren GC-Gehalt verschieden sind.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 2.2 dargestellt. Die Realtime-PCR Reaktionen fanden alle in einem iCycler iQ Real Time PCR System (Bio-Rad Laboratories, München) statt. Es wurden mindestens drei voneinander unabhängige Experimente jeweils in Triplets durchgeführt. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR Green I (Roche Diagnostics) in einer 1:10000 Verdünnung eingesetzt. Eine Stammlösung in DMSO war vorher hergestellt worden. Zur Kalibrierung des Gerätes wurde das vom Hersteller empfohlene Fluoreszein in einer 1:250 Verdünnung verwendet.

Realtime-PCR Reaktionansatz (für 1000 Ansätze):

H <sub>2</sub> O dd steril	17,5ml
10× PCR-Puffer	2,5ml
inkl. MgCl <sub>2</sub> (24mM)	
dNTP-Mix (je 5mM)	1,0ml
Taq-Polymerase (5U/μl)	1,0ml
SYBR Green I	2μl
Floureszein	88μl
Endvolumen	~22ml

Der Realtime-PCR-Mastermix wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Pro Ansatz:

Mastermix	22,0μl
Primer (je 3,3μM)	1,0μl
cDNA	2,0μl

Schritt	Status	Temperatur	Dauer	Temperaturerhöhung
Schritt I	Denaturierung	95°C	3min	
Schritt II (40 Zyklen)	Denaturierung	94°C	25sek	
	Annealing	57°C	40sek	
	Extension	72°C	10sek	
Schritt III	Denaturierung	95°C	1min	
Schritt IV	Schmelzanalyse	55°C	10sek	0,5°C
	Ende	4°C		

**Tabelle 2.5:** Laufbedingungen der TFF-Realtime-PCR.

Die Reaktionen wurden mit der iCycler-Software (Bio-Rad) und Excel 97 (Microsoft) ausgewertet. Die  $\Delta Ct$  (Threshold cycle) Werte wurden durch Substraktion der gemittelten GAPDH-Ct Werte von den gemittelten TFF-Ct Werten erhalten. Die *TFF* Expression in % wurde wie folgt gebildet:  $2^{-(IL1\beta/IL6/IL1\beta+IL6\Delta Ct - Kontrolle\Delta Ct)} \times 100$ . Anschließend wurde die Signifikanz mittels Studentischen T-Tests ermittelt.

## 2.3 Methoden II

Um die Wirkung von TFF-Proteinen auf die Expression von Cytokinen zu untersuchen, wurden die promyeloische Zelllinie HL-60 und frisch isolierte polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) verwendet.

### 2.3.1 Zellkultur

Das Kulturmedium von HL-60 ist in Tabelle 2.1 dargestellt. Die Kulturbedingungen sind im wesentlichen dieselben wie in 2.2.1. beschrieben. HL-60 ist eine nicht-adhärende Zelllinie und liegt in Suspensionskultur vor. Deshalb mußten die Zellen vor dem Aufbringen auf Kulturplatten nicht trypsiniert werden. Die promyeloische Zelllinie HL-60 kann durch Zugabe bestimmter Substanzen zum Kulturmedium in eine granulozytäre oder in eine monozytäre Linie ausdifferenzieren. Die Differenzierung zu Granulozyten wurde erreicht, indem nach dem Splitten 1,3% Dimethyl Sulfoxid (DMSO) zum Medium zugesetzt wurde, Zugabe von 5nM Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) dagegen induzierte die Differenzierung zu Monozyten [Collins, 1987]. Die Ausdifferenzierung der Zelllinie nahm jeweils drei bis vier Tage in Anspruch. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die ausdifferenzierten Zellen, ebenso wie die PMN, auf 96-well Platten (100 $\mu$ l pro Well, ca.  $1 \times 10^5$  Zellen) gebracht.

### 2.3.2 PMN-Isolation

Zur Gewinnung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten wurde verschiedenen Probanden 10ml Blut entnommen und mit Heparin versetzt. Dieses wurde in eine Spritze mit 2ml 5% Dextran T 500 Lösung (Amersham Pharmacia Biotech AG, Uppsala, Schweden) überführt. Zur Erythrozytensedimentation wurde die Spritze mit dem Heparinblut und der Dextran Lösung verkehrt herum in einem Reagenzständer befestigt und 45min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die obere Phase vorsichtig durch eine Butterfly-Kanüle in ein neues Röhrchen mit 4ml Ficoll (Amersham) überführt. Dieses wurde zur Ausbildung eines Gradienten 30min bei 2000rpm und RT ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurden die oberen drei Phasen verworfen und das Pellet, welches die PMN enthielt, in 1ml PMN-Puffer gelöst. Um die übriggebliebenen Erythrozyten zu lysieren, wurde 2ml steriles Aqua dest. zugegeben und das Röhrchen vorsichtig invertiert. Nach 30sek erfolgte der Stop der Lyse durch Zugabe von 2ml steriler 1,8%iger NaCl-Lösung. Anschließend wurde bei 1000rpm 10min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Erythrozytenlyse wurde zweimal wiederholt. Danach wurde das Pellet in 1-2ml PMN-Puffer gelöst und die Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Die PMN-Ausbeute betrug zwischen  $2 \times 10^6$  und  $2 \times 10^8$  Zellen. Durch Analyse der Zellmorphologie konnte gezeigt werden, daß 90-95% der Zellen im Pellet Neutrophile waren.

### 2.3.3 Stimulation

Granulozytäre und monozytäre HL-60 Zellen und PMN wurden mit Phytohämagglutinin (PHA) ( $1 \mu\text{g}$ ), Bovinem Serumalbumin (BSA) ( $30 \mu\text{g}$ ), rekombinantem, glykosyliertem TFF2 ( $30 \mu\text{g}$ ) und rekombinantem TFF3 ( $30 \mu\text{g}$ ) stimuliert (Die Werte bezeichnen die Endkonzentrationen in  $100 \mu\text{l}$ ). Anschließend wurden die Zellen für 2, 4 und 24Std im Brutschrank inkubiert.

### 2.3.4 RT-PCR

Die RNA-Isolation und die reverse Transkription erfolgten wie unter 2.2.6.1. und 2.2.6.2. dargestellt.

#### 2.3.4.1 Cytokin-Multiplex-PCR

Für die Cytokin-Multiplex-PCR wurde ein Primerpool aus sechs Primerpaaren zusammengestellt,  $\text{TNF}\alpha$  (355bp), IL8 (282bp),  $\text{IL}1\beta$  (241bp), IL6 (216bp),  $\text{TGF}\beta$  (161bp) und GAPDH als Standardgen (Tabelle 2.2).

Cytokin-Multiplex-PCR Reaktionsansatz:

cDNA	2,0 $\mu$ l
10 $\times$ PCR-Puffer	4,0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25mM	2,0 $\mu$ l
dNTP-Mix (je 5mM)	2,0 $\mu$ l
Primerpool (je 3,3 $\mu$ M)	4,0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O dd	25,0 $\mu$ l
Taq-Polymerase (5U/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ l
Endvolumen	ad 40,0 $\mu$ l

Schritt	Status	Temperatur	Dauer
Schritt I	Denaturierung	94°C	4min
Schritt II (27 bzw. 30 Zyklen)	Denaturierung	94°C	45sek
	Annealing	57°C	1min
	Extension	72°C	1min
Schritt III	Extension	72°C	5min
	Ende	4°C	

**Tabelle 2.6:** Laufbedingungen der Cytokin-Multiplex-PCR.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden auf einem 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (Laufbedingungen 160V, 250mA, 1,5Std), mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht ausgewertet.



# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Auswirkung von proinflammatorischen Cytokinen auf die Transkription der *TFF* Gene in gastrointestinalen Zelllinien

Die Kleeblattpeptide, die von den *TFF* Genen kodiert werden, werden zur Reparatur und Heilung der gastrointestinalen Mukosa gebildet. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die proinflammatorischen Cytokine  $IL1\beta$  und  $IL6$  die Expression der *TFF* Gene beeinflussen. Dazu wurden verschiedene gastrointestinale Zellen mit *TFF* Promotorkonstrukten transfiziert und anschließend mit  $IL1\beta$  und  $IL6$  stimuliert. In Co-Transfektionsexperimenten wurde die Wirkung der Transkriptionsfaktoren  $NF\kappa-B$  und  $C/EBP\beta$  untersucht. Um die endogene *TFF* Expression zu untersuchen, wurden die stimulierten Zellen mittels RT-PCR getestet.

#### 3.1.1 Stimulation der exogenen *TFF* Expression durch $IL1\beta$ und $IL6$

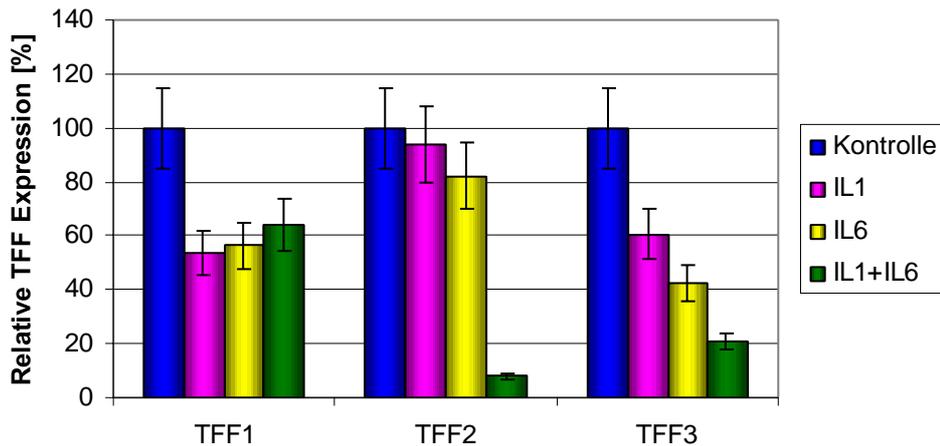
Zur Untersuchung der exogenen *TFF* Expression wurden die intestinalen Zelllinien HT-29 und LS 174 T, sowie die Magenzelllinien KATO III und MKN-45 ausgewählt. Nach transients Transfektion mit Promotorsequenzen der 5'-flankierenden Region der *TFF* Gene und anschließender Stimulation mit  $IL1\beta$ ,  $IL6$  und der Kombination beider Cytokine wurde die Reporterexpression mittels Luziferase Assay bestimmt. In den folgenden Diagrammen ist die relative *TFF* Reporterexpression der verschiedenen Zelllinien dargestellt. Die Prozentangaben in Klammern bezeichnen die *TFF* Expression als Restaktivität.

##### 3.1.1.1 Herabregulation der *TFF* Reporterexpression bei HT-29

Bei der Zelllinie HT-29 (Abbildung 3.1) ist eine Reduktion der *TFF1* Expression auf 54% bzw. 56% mit  $IL1\beta$  bzw. mit  $IL6$  bemerkbar. Nach der Kombinationsstimulation

## Kapitel 3. Ergebnisse

mit beiden Cytokinen ist keine weitere Reduktion der *TFF1* Expression zu erkennen; sie bewegt sich im gleichen Bereich wie nach der Einzelstimulation. Im Gegensatz dazu erniedrigt die Kombinationsstimulation die *TFF2* (8%) und *TFF3* (21%) Expression deutlich. Dieser synergistische Effekt ist vor allem bei *TFF2* bemerkenswert, wo

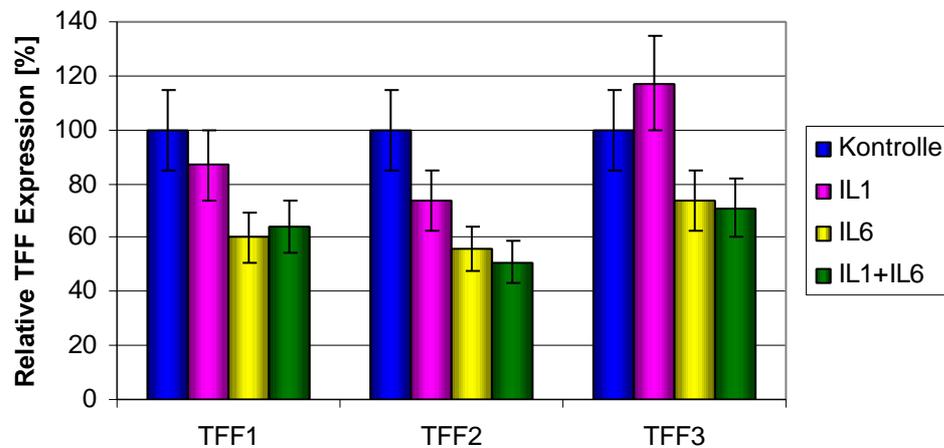


**Abbildung 3.1:** Herabregulation der *TFF* Reporterogenaktivität durch  $IL1\beta$  und  $IL6$  in der intestinalen Zelllinie HT-29. Die Werte sind in Prozent der unstimulierten Kontrolle dargestellt.

die Einzelstimulationen mit  $IL1\beta$  und  $IL6$  nur geringen Effekt (94% bzw. 82%) zeigt. Bei *TFF3* erzielt die Einzelstimulation bereits einen deutlicheren, herabregulierenden Effekt ( $IL1\beta$  60%,  $IL6$  42%), die synergistische Wirkung beider Cytokine ist nicht ganz so stark wie bei *TFF2*.

### 3.1.1.2 Herabregulation der *TFF* Reporterexpression bei LS 174 T

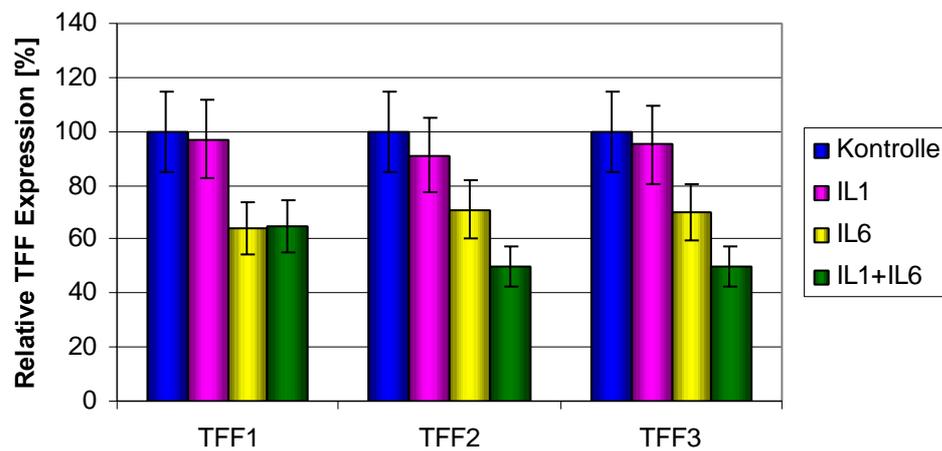
In Abbildung 3.2 ist die relative *TFF* Expression der anderen intestinalen Zelllinie LS 174 T dargestellt. Hier ist nach  $IL1\beta$  Gabe die *TFF1* Expression gegenüber der unstimulierten Kontrolle nur sehr leicht erniedrigt (87%). Stimulation mit  $IL6$  allein und zusammen mit  $IL1\beta$  führen zu etwas stärkerer Reduktion der *TFF1* Expression (60% bzw. 64%). Die *TFF2* Expression wird ebenfalls durch  $IL6$  stärker als durch  $IL1\beta$  inhibiert (56% bzw. 74%), *TFF3* zeigt nach  $IL1\beta$  Stimulation sogar einen leichten Expressionsanstieg gegenüber der Kontrolle (117%).  $IL6$ , auch in Kombination mit  $IL1\beta$ , erwirkt dagegen wieder eine Reduktion (74% bzw. 71%). Ein synergistischer Effekt nach Kombinationsstimulation mit  $IL1\beta$  und  $IL6$  ist bei LS 174 T nicht zu bemerken.



**Abbildung 3.2:** Herabregulation der *TFF* Reporterogenaktivität durch  $IL1\beta$  und  $IL6$  in der intestinalen Zelllinie LS 174 T. Die Werte sind in Prozent der unstimulierten Kontrolle dargestellt.

### 3.1.1.3 Herabregulation der *TFF* Reporterexpression bei KATO III

Bei der Magenzelllinie KATO III zeigt die Stimulation mit  $IL1\beta$  kaum Wirkung auf die Expression der *TFF* Gene (97% *TFF1*, 91% *TFF2*, 95% *TFF3*) (Abbildung 3.3). Dagegen erzielt  $IL6$  allein und zusammen mit  $IL1\beta$  eine deutlichere Herabregulation



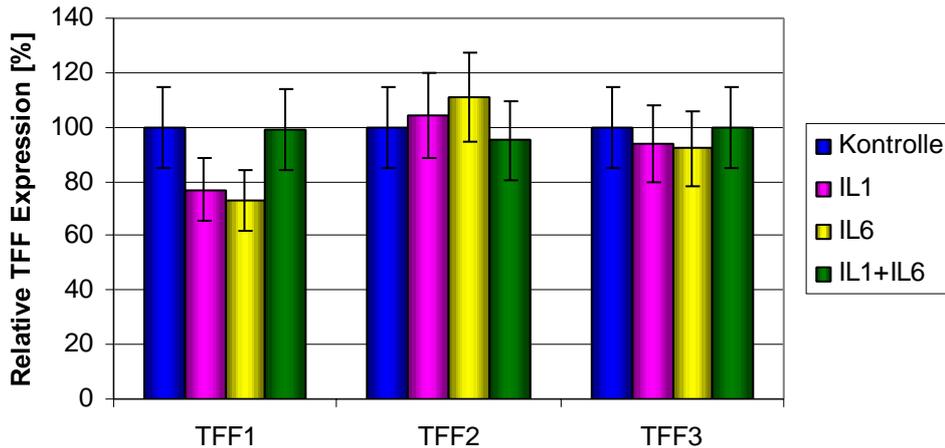
**Abbildung 3.3:** Herabregulation der *TFF* Reporterogenaktivität durch  $IL1\beta$  und  $IL6$  in der Magenzelllinie KATO III. Die Werte sind in Prozent der unstimulierten Kontrolle dargestellt.

(64% *TFF1*, 71% *TFF2*, 70% *TFF3*). Bei *TFF2* und *TFF3* ist sogar noch eine weitere Reduktion nach Kombinationsstimulation (50%) gegenüber der Einzelstimulation mit  $IL6$  sichtbar.

## Kapitel 3. Ergebnisse

### 3.1.1.4 Herabregulation der *TFF* Reporterexpression bei MKN-45

Die relative *TFF* Expression der zweiten Magenlinie MKN-45 ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Nur bei *TFF1* ist eine Reduktion nach Stimulation mit IL1 $\beta$  (77%) und IL6



**Abbildung 3.4:** Herabregulation der *TFF* Reporterexpression durch IL1 $\beta$  und IL6 in der Magenlinie MKN-45. Die Werte sind in Prozent der unstimulierten Kontrolle dargestellt.

(73%) bemerkbar. Werden beide Cytokine jedoch in Kombination eingesetzt, wird die *TFF1* Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nicht herunterreguliert. Bei *TFF2* und *TFF3* liegt die relative Expression zwischen 92% und 111% und somit im Schwankungsbereich.

### 3.1.1.5 Zusammenfassung

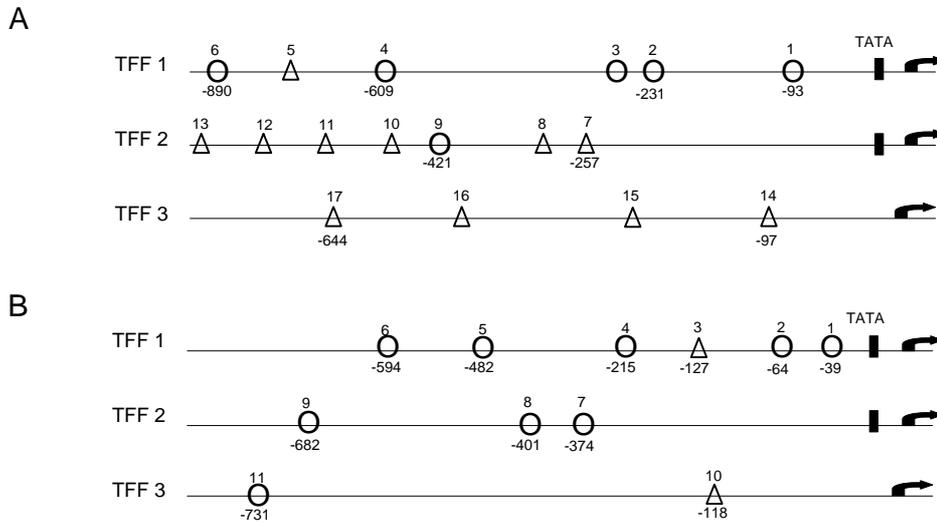
In Tabelle 3.1 sind alle Ergebnisse der transienten Transfektion mit Konstrukten der 5'-flankierenden Region der drei *TFF* Gene in Prozent der unstimulierten Kontrolle dargestellt. Zusammenfassend kann bemerkt werden, daß die Cytokine IL1 $\beta$  und IL6 auf die Magenlinie MKN-45 sehr wenig Effekt zeigen. MKN-45 wurde deshalb in den weiteren Versuchen nicht mehr verwendet. Es ist auch auffällig, daß generell die *TFF* Expression nach IL6 Stimulation stärker reduziert wird als nach Stimulation mit IL1 $\beta$ . Dies konnte in allen Zelllinien beobachtet werden, mit Ausnahme der *TFF1* Expression bei HT-29. Hier regulierte IL1 $\beta$  etwas stärker herab als IL6. Der Effekt ist jedoch minimal (2%).

Zelllinie	TFF1			
	Kontrolle (%)	IL1 $\beta$ (%)	IL6 (%)	IL1 $\beta$ +IL6 (%)
HT-29	100 $\pm$ 10	54 $\pm$ 12	56 $\pm$ 13	64 $\pm$ 11
LS 174 T	100 $\pm$ 14	87 $\pm$ 11	60 $\pm$ 8	64 $\pm$ 21
KATO III	100 $\pm$ 9	97 $\pm$ 11	64 $\pm$ 14	65 $\pm$ 13
MKN-45	100 $\pm$ 7	77 $\pm$ 2	73 $\pm$ 5	99 $\pm$ 24
	TFF2			
	Kontrolle (%)	IL1 $\beta$ (%)	IL6 (%)	IL1 $\beta$ +IL6 (%)
HT-29	100 $\pm$ 15	94 $\pm$ 11	82 $\pm$ 10	8 $\pm$ 1
LS 174 T	100 $\pm$ 12	74 $\pm$ 10	56 $\pm$ 13	51 $\pm$ 8
KATO III	100 $\pm$ 13	91 $\pm$ 13	71 $\pm$ 7	50 $\pm$ 4
MKN-45	100 $\pm$ 8	104 $\pm$ 5	111 $\pm$ 15	95 $\pm$ 8
	TFF3			
	Kontrolle (%)	IL1 $\beta$ (%)	IL6 (%)	IL1 $\beta$ +IL6 (%)
HT-29	100 $\pm$ 9	61 $\pm$ 12	42 $\pm$ 6	21 $\pm$ 2
LS 174 T	100 $\pm$ 16	117 $\pm$ 9	74 $\pm$ 15	72 $\pm$ 33
KATO III	100 $\pm$ 8	95 $\pm$ 9	70 $\pm$ 5	50 $\pm$ 5
MKN-45	100 $\pm$ 17	94 $\pm$ 23	92 $\pm$ 4	100 $\pm$ 8

**Tabelle 3.1:** Relative *TFF* Expression nach transients Transfektion mit Konstrukten der 5'-flankierenden Region der *TFF* Gene und anschließender Cytokinapplikation. Die Prozentwerte sind Mittelwerte mit Standardabweichung.

### 3.1.2 Stimulation der exogenen *TFF* Expression durch NF $\kappa$ -B und C/EBP $\beta$

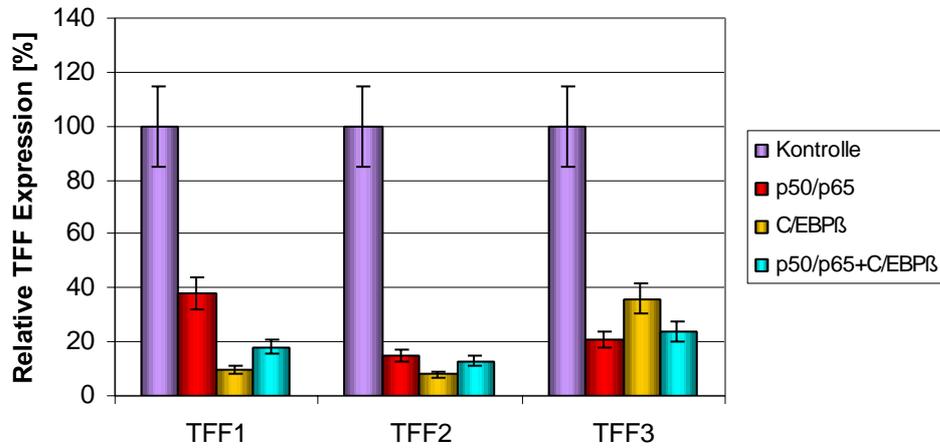
Die Herabregulation der *TFF* Expression durch IL1 $\beta$  und IL6 führte zur Frage, welche Transkriptionsfaktoren, die von diesen Cytokinen aktiviert werden, an dieser Reaktion beteiligt sein könnten. Datenbankrecherche im Internet (Transfac) ergab, daß alle drei *TFF* Gene putative NF $\kappa$ -B und C/EBP $\beta$  Bindestellen in der Promotorregion besitzen. Diese Bindestellen weisen zum Teil hohe Homologie mit der jeweiligen Konsensussequenz auf (Abbildung 3.5). Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ -B wird unter anderem von IL1 $\beta$  aktiviert, C/EBP $\beta$  von IL6. Diese Faktoren wurden als Expressionsvektoren in den Zelllinien HT-29, LS 174 T und KATO III co-transfiziert. Für NF $\kappa$ -B wurden in dieser Studie die beiden Untereinheiten p50 und p65 kombiniert. Für STAT3, einem Transkriptionsfaktor, der ebenfalls von IL6 über den gp130/JAK-Weg rekrutiert wird, weisen die Promotorregionen der *TFF* Gene keine Bindestellensequenzen auf. Deshalb wurde dieser Aktivierungsweg in der Arbeit nicht weiter verfolgt.



**Abbildung 3.5:** (A) Putative  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  Bindestellen in der 5'-flankierenden Region der drei *TFF* Gene. Die Bindestellen sind 90% (O) bzw. 80% ( $\Delta$ ) mit der Konsensus  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  Bindestelle (GGR(A/T/C)TYGCC) wie folgt identisch: *TFF1*: 1: GGGGATCCIC; 2: GGGACTTTCTI; 3: GGGAGTCTCC; 4: GGGGTTTCGC; 5: AGTGATTCTC; 6: GGGGCTCCCT. *TFF2*: 7: CCGGTTTTCC; 8: GGGTCACACC; 9: GGGACTTTIC; 10: GGGGCTGCIC; 11: GGGAATGCTC; 12: GGGAACTCG; 13: GGGGGTTGCC. *TFF3*: 14: AAGGCTCTCC; 15: GCGGATTCCA; 16: GGGGTGTTC; 17: GAGCCTTTCC. (B) Putative  $\text{C/EBP}\beta$  Bindestellen in der 5'-flankierenden Region der drei *TFF* Gene. Die Bindestellen sind 100% (O) bzw. 85% ( $\Delta$ ) mit der Konsensus  $\text{C/EBP}\beta$  Bindestelle (R(A/G/T/C)NR(A/G/C/T)TK(T/G/A)NNGM(C/A/T)AAK(T/G/C)NN) wie folgt identisch: *TFF1*: 1: TCTTTAAGCAAACA; 2: TCCTTAGGCAAATG; 3: ATGTCTAGGAAACA; 4: AGATTCAGAAAGTC; 5: TAATAATGAAATTG; 6: ACATGGCGAAACCC. *TFF2*: 7: GCATTCTGCAAGCC; 8: GAATTTAGAAAATA; 9: TACTGGGGAAAATG. *TFF3*: 10: TGCTTGGGGAAAGGC; 11: AAATTCTGAAAGGA.

### 3.1.2.1 Herabregulation der *TFF* Reporterexpression bei HT-29

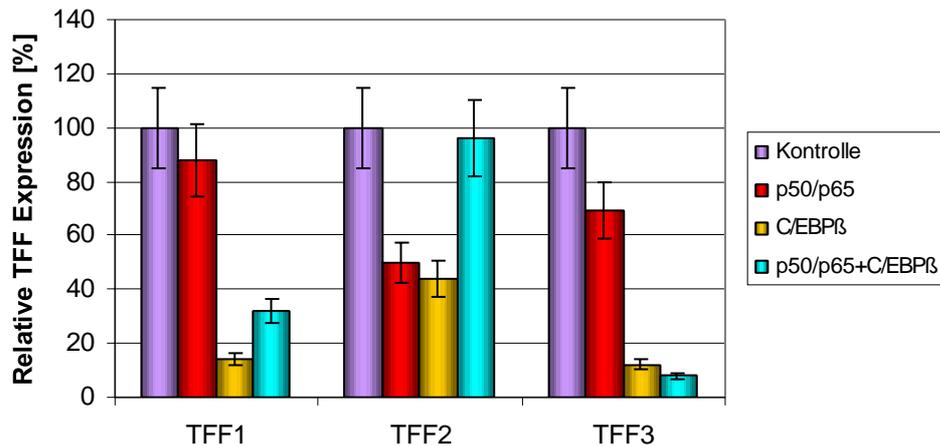
In Abbildung 3.6 ist zu erkennen, daß in der Zelllinie HT-29 die Reporterexpression aller drei *TFF* stark reduziert ist. Bei *TFF1* und *TFF2* hat  $\text{C/EBP}\beta$  den stärksten Effekt (10% bzw. 8%). Co-Transfektion von p50/p65 ( $\text{NF}\kappa\text{-B}$ ) und kombinierte Transfektion von  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  und  $\text{C/EBP}\beta$  wirken ebenfalls herabregulierend (38% bzw. 18% bei *TFF1*, 15% bzw. 13% bei *TFF2*). Bei *TFF3* ist die Reporterexpression durch  $\text{C/EBP}\beta$  nicht ganz so stark (36%) betroffen, wie durch  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  und  $\text{NF}\kappa\text{-B/C/EBP}\beta$ . Ein Synergismus nach kombinierter Co-Transfektion der Expressionsvektoren ist bei HT-29 nicht zu erkennen.



**Abbildung 3.6:** Herabregulation der *TFF* Reporterexpression nach Co-Transfektion von p50/p65 (NF $\kappa$ -B) und C/EBP $\beta$  in der intestinalen Zelllinie HT-29. Die Kontrolle wurde nur mit den *TFF* Reporterexpressionkonstrukten (ohne NF $\kappa$ -B- und C/EBP $\beta$ -Expressionsvektoren) transfiziert. Die Werte sind in Prozent dieser Kontrolle dargestellt.

### 3.1.2.2 Herabregulation der *TFF* Reporterexpression bei LS 174 T

Bei der anderen intestinalen Zelllinie LS 174 T (Abbildung 3.7) ist zu erkennen, daß auch hier NF $\kappa$ -B die Expression der drei *TFF* Gene nicht so stark herabregelt wie



**Abbildung 3.7:** Herabregulation der *TFF* Reporterexpression nach Co-Transfektion von p50/p65 (NF $\kappa$ -B) und C/EBP $\beta$  in der intestinalen Zelllinie LS 174 T. Die Kontrolle wurde nur mit den *TFF* Reporterexpressionkonstrukten (ohne NF $\kappa$ -B- und C/EBP $\beta$ -Expressionsvektoren) transfiziert. Die Werte sind in Prozent dieser Kontrolle dargestellt.

C/EBP $\beta$ . Besonders offensichtlich ist dies bei *TFF1* und *TFF3*. Die Restexpression beträgt hier nach Transfektion mit NF $\kappa$ -B noch 88% bzw. 69%, während sie mit

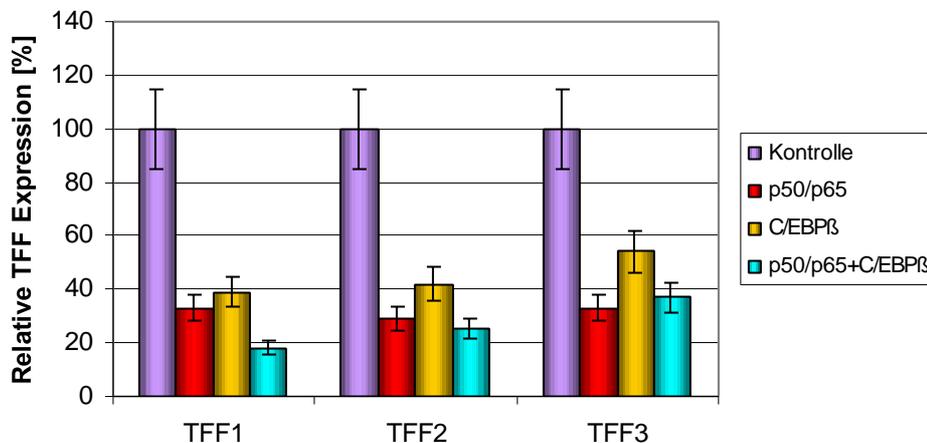
## Kapitel 3. Ergebnisse

---

C/EBP $\beta$  auf 14% bzw. 12% sinkt. Eine Auffälligkeit ist die hohe *TFF2* Expression nach kombinierter Co-Transfektion mit NF $\kappa$ -B und C/EBP $\beta$  (96%).

### 3.1.2.3 Herabregulation der *TFF* Reporterexpression bei KATO III

In der Magenzelllinie KATO III (Abbildung 3.8) ist generell zu beobachten, daß hier NF $\kappa$ -B etwas stärker herabreguliert als C/EBP $\beta$ . Die *TFF* Expression ist in jedem



**Abbildung 3.8:** Herabregulation der *TFF* Reporterexpression nach Co-Transfektion von p50/p65 (NF $\kappa$ -B) und C/EBP $\beta$  in der Magenzelllinie KATO III. Die Kontrolle wurde nur mit den *TFF* Reportergenkonstrukten (ohne NF $\kappa$ -B- und C/EBP $\beta$ - Expressionsvektoren) transfiziert. Die Werte sind in Prozent dieser Kontrolle dargestellt.

Fall immer um mindestens die Hälfte reduziert. Nur die *TFF1* Expression ist durch Kombination von NF $\kappa$ -B und C/EBP $\beta$  stärker (18%) herunterreguliert, als durch die Co-Transfektion der einzelnen Transkriptionsfaktoren.

### 3.1.2.4 Zusammenfassung

In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse der Co-Transfektion von NF $\kappa$ -B- und C/EBP $\beta$ - Expressionsvektoren in den Zelllinien HT-29, LS 174 T und KATO III zusammengefaßt. In den intestinalen Zelllinien hat NF $\kappa$ -B eine stärker herabregulierende Wirkung, in der Magenzelllinie dagegen C/EBP $\beta$ .

Zelllinie	TFF1			
	Kontrolle (%)	NF $\kappa$ -B (%)	C/EBP $\beta$ (%)	NF $\kappa$ -B+C/EBP $\beta$ (%)
HT-29	100±12	38±8	10±8	18±5
LS 174 T	100±24	88±17	14±4	32±9
KATO III	100±11	33±7	39±13	18±7
	TFF2			
	Kontrolle (%)	NF $\kappa$ -B (%)	C/EBP $\beta$ (%)	NF $\kappa$ -B+C/EBP $\beta$ (%)
HT-29	100±10	15±7	8±2	13±5
LS 174 T	100±19	50±25	44±21	96±24
KATO III	100±9	29±4	42±8	25±4
	TFF3			
	Kontrolle (%)	NF $\kappa$ -B (%)	C/EBP $\beta$ (%)	NF $\kappa$ -B+C/EBP $\beta$ (%)
HT-29	100±7	21±9	36±13	21±9
LS 174 T	100±17	69±16	12±8	8±4
KATO III	100±12	33±8	54±10	37±5

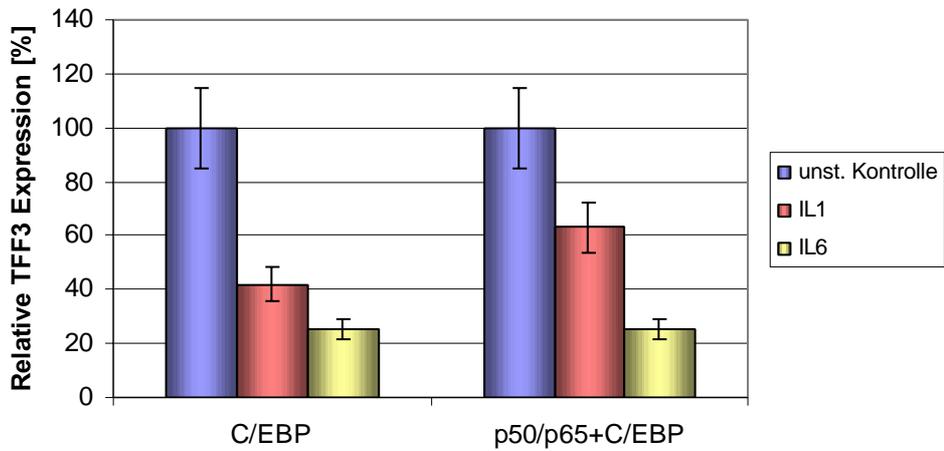
**Tabelle 3.2:** Relative *TFF* Expression nach Co-Transfektion mit NF $\kappa$ -B- und C/EBP $\beta$ -Expressionsvektoren. Die Prozentwerte sind Mittelwerte mit Standardabweichung.

### 3.1.3 Stimulation mit IL1 $\beta$ und IL6 nach Co-Transfektion mit NF $\kappa$ -B und C/EBP $\beta$

Nachdem in den vorherigen Abschnitten gezeigt werden konnte, daß sowohl die proinflammatorischen Cytokine IL1 $\beta$  und IL6, als auch die Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ -B und C/EBP $\beta$  auf die *TFF* Reporterogenaktivität reduzierend wirken, sollte im folgenden ein Zusammenspiel der Cytokine und der Transkriptionsfaktoren untersucht werden.

#### 3.1.3.1 Herabregulation der *TFF3* Reporterexpression bei HT-29

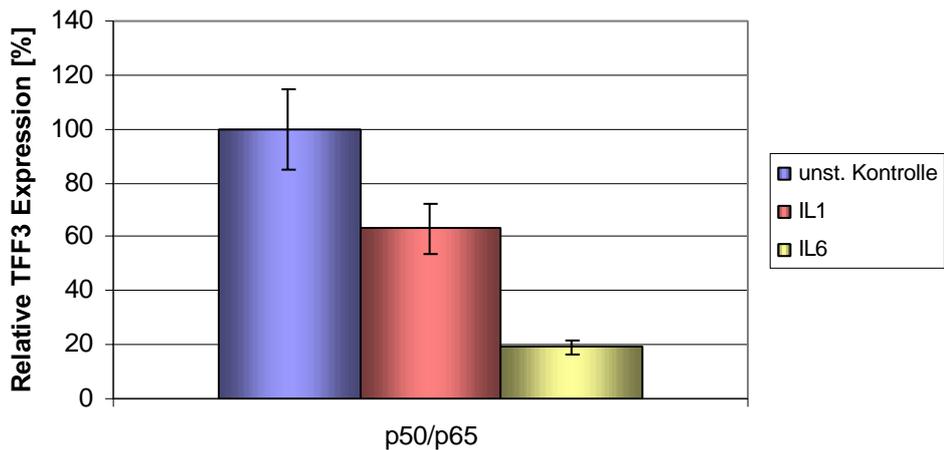
Nach Co-Transfektion mit C/EBP $\beta$  konnte nach anschließender Stimulation mit IL1 $\beta$  eine weitere Herabregulierung der *TFF3* Reporterexpression auf 42%, mit IL6 auf 25% erreicht werden (Abbildung 3.9). Dasselbe Expressionslevel konnte nach IL6 Stimulation und kombinierter Co-Transfektion mit NF $\kappa$ -B und C/EBP $\beta$  beobachtet werden. IL1 $\beta$  Stimulation erzielte hier noch eine Reduktion auf 63%.



**Abbildung 3.9:** Herabregulation der *TFF* Reporterexpression nach Co-Transfektion von p50/p65 ( $\text{NF}\kappa\text{-B}$ ) und *C/EBP* $\beta$  und anschließender Stimulation mit  $\text{IL1}\beta$  und  $\text{IL6}$  in der intestinalen Zelllinie HT-29. Die Kontrolle wurde ebenfalls mit  $\text{NF}\kappa\text{-B}$ - und *C/EBP* $\beta$ -Expressionsvektoren co-transfiziert, aber nicht stimuliert. Die Werte sind in Prozent dieser Kontrolle dargestellt.

#### 3.1.3.2 Herabregulation der *TFF3* Reporterexpression bei LS 174 T

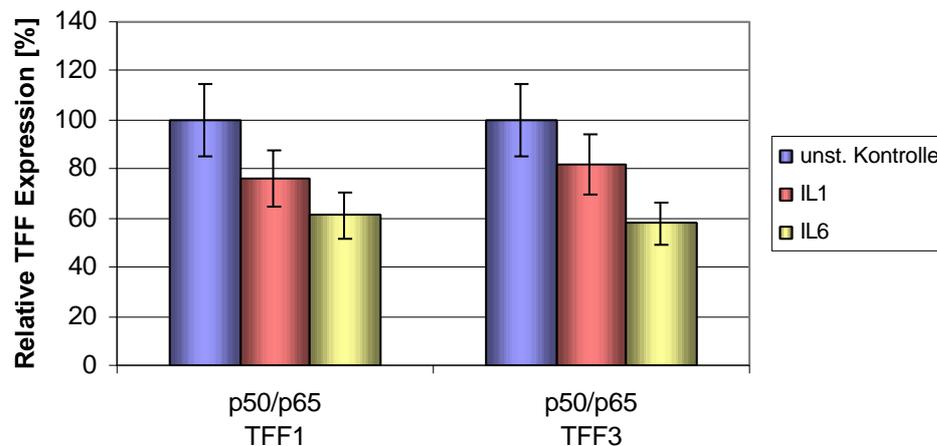
Bei der Zelllinie LS 174 T erbrachte  $\text{IL1}\beta$  Stimulation nach Co-Transfektion mit  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  eine Reduktion der *TFF3* Reporterexpression auf 63% (Abbildung 3.10). Stimulation mit  $\text{IL6}$  reduzierte die Expression weiter auf ein Level von 19%.



**Abbildung 3.10:** Herabregulation der *TFF* Reporterexpression nach Co-Transfektion von p50/p65 ( $\text{NF}\kappa\text{-B}$ ) und anschließender Stimulation mit  $\text{IL1}\beta$  und  $\text{IL6}$  in der intestinalen Zelllinie LS 174 T. Die Kontrolle wurde ebenfalls mit dem  $\text{NF}\kappa\text{-B}$ -Expressionsvektor co-transfiziert, aber nicht stimuliert. Die Werte sind in Prozent dieser Kontrolle dargestellt.

### 3.1.3.3 Herabregulation der *TFF1* und *TFF3* Reporterexpression bei KATO III

Bei KATO III war nach Co-Transfektion mit  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  und anschließender Cytokinstimulation ein relativ geringer Effekt bei *TFF1* und *TFF3* zu sehen (Abbildung 3.11). Durch  $\text{IL1}\beta$  Stimulation konnte eine weitere Herabregulation auf 71% (*TFF1*) bzw. 82% (*TFF3*), mit  $\text{IL6}$  auf 61% (*TFF1*) bzw. 58% (*TFF3*) erzielt werden.



**Abbildung 3.11:** Herabregulation der *TFF* Reporterexpression nach Co-Transfektion von p50/p65 ( $\text{NF}\kappa\text{-B}$ ) und anschließender Stimulation mit  $\text{IL1}\beta$  und  $\text{IL6}$  in der Magenlinie KATO III. Die Kontrolle wurde ebenfalls mit dem  $\text{NF}\kappa\text{-B}$ -Expressionsvektor co-transfiziert, aber nicht stimuliert. Die Werte sind in Prozent dieser Kontrolle dargestellt.

### 3.1.4 Abnahme der endogenen *TFF* Expression unter Einfluß von $\text{IL1}\beta$ und $\text{IL6}$

Transiente Transfektion mit *TFF* Promotorkonstrukten und anschließender Stimulation mit  $\text{IL1}\beta$  und  $\text{IL6}$ , sowie Co-Transfektion mit  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  und  $\text{C/EBP}\beta$  erzielte eine Herabregulation der *TFF* Reporterexpression. Analog zu dieser exogenen Expression sollte auch die endogene Expression untersucht werden.

Dazu wurden die Zelllinien HT-29, LS 174 T und KATO III mit  $\text{IL1}\beta$  und  $\text{IL6}$ , sowie der Kombination aus beiden Cytokinen stimuliert. Die *TFF* Expression wurde nach 5, 24, 48 und 72Std Stimulation mittels Multiplex-PCR und Realtime-PCR gemessen.

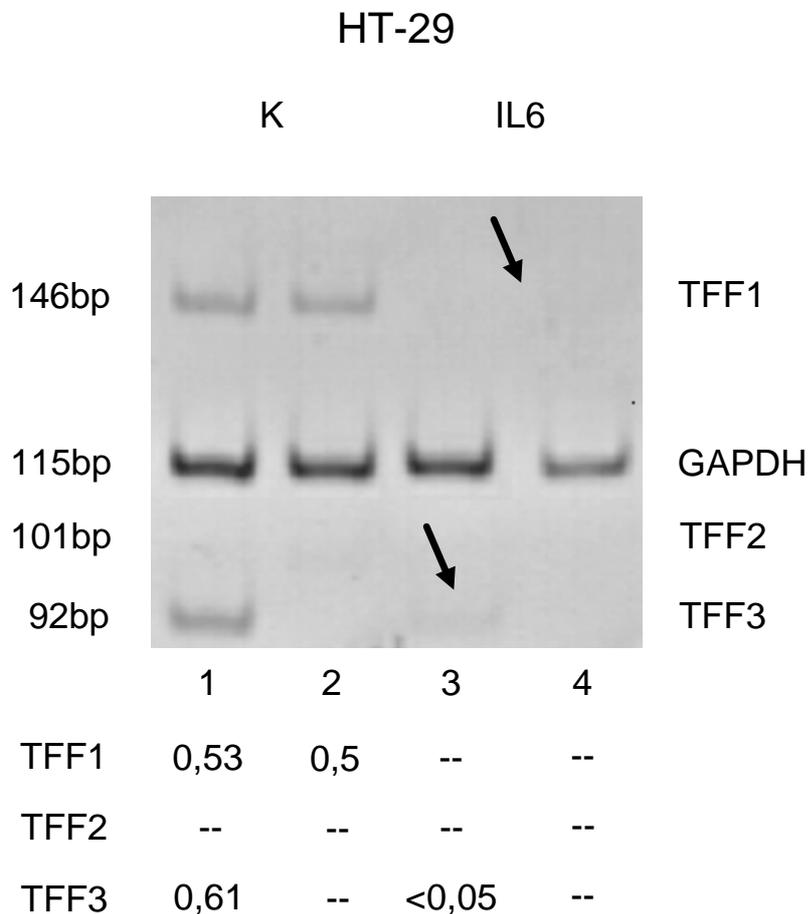
## Kapitel 3. Ergebnisse

### 3.1.4.1 TFF-Multiplex-PCR

Durch die semiquantitative Multiplex-PCR konnte eine deutliche Reduktion der *TFF* Expression bei HT-29, LS 174 T und KATO III nach 48Std Cytokininduktion gezeigt werden. Während nach 5 und 24Std keine Änderung der *TFF* Expression zu erkennen war, war nach 72Std ebenfalls eine Herabregulierung zu sehen (ohne Abbildung).

Nach Anfärben der Gelbanden wurden diese densitometrisch vermessen. Die *TFF* Expression wurde in Relation zur Expression des Haushaltsgens *GAPDH* gesetzt. Daraus ergaben sich die Werte, die in Abbildung 3.12- 3.14 dargestellt sind. Die relative *TFF* Expression wurde auf die unstimulierte Kontrolle bezogen.

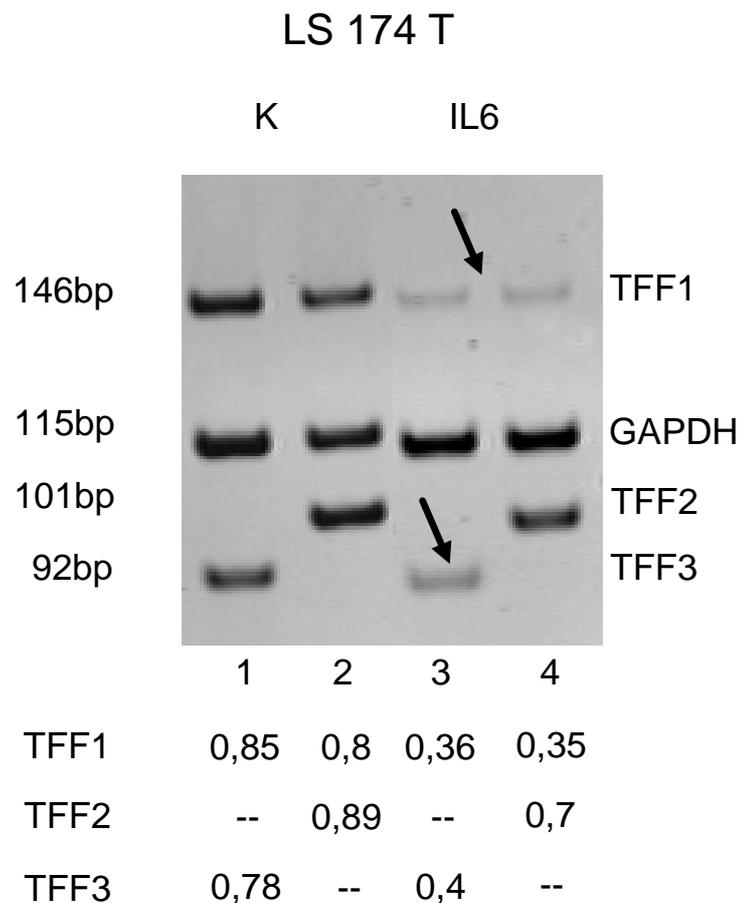
Bei HT-29 ist nach IL6 Stimulation eine *TFF1* Expression nicht mehr meßbar (Abbildung 3.12). Die *TFF3* Expression beträgt im Vergleich zur unstimulierten Kon-



**Abbildung 3.12:** Endogene *TFF* Expression nach 48Std Stimulation mit IL6 und anschließender Multiplex-RT-PCR in HT-29. Ungerade Zahlen bezeichnen *TFF1*, *GAPDH* und *TFF3*, gerade *TFF1*, *GAPDH* und *TFF2* Amplifikationen. Die densitometrische Analyse der Bandenintensitäten sind als Verhältnis *TFF* zu *GAPDH* dargestellt. K=unstimulierte Kontrolle.

trolle nur noch 8%. Nach IL1 $\beta$  Stimulation ist die *TFF1* und *TFF3* Expression ebenfalls leicht reduziert (85% bzw. 79%, ohne Abbildung).

LS 174 T zeigte nach IL6 Stimulation eine Reduktion der *TFF1* Expression auf 43% (Abbildung 3.13, Reihen 1-4) in Bezug auf die unstimulierte Kontrolle, die *TFF3* Expression wurde auf 51% (Abbildung 3.13, Reihen 1+3) herabreguliert. Stimulation mit IL1 $\beta$  erzielte nur eine leichte Reduktion der *TFF1* (89%) und der *TFF3* (81%) Expression (ohne Abbildung).

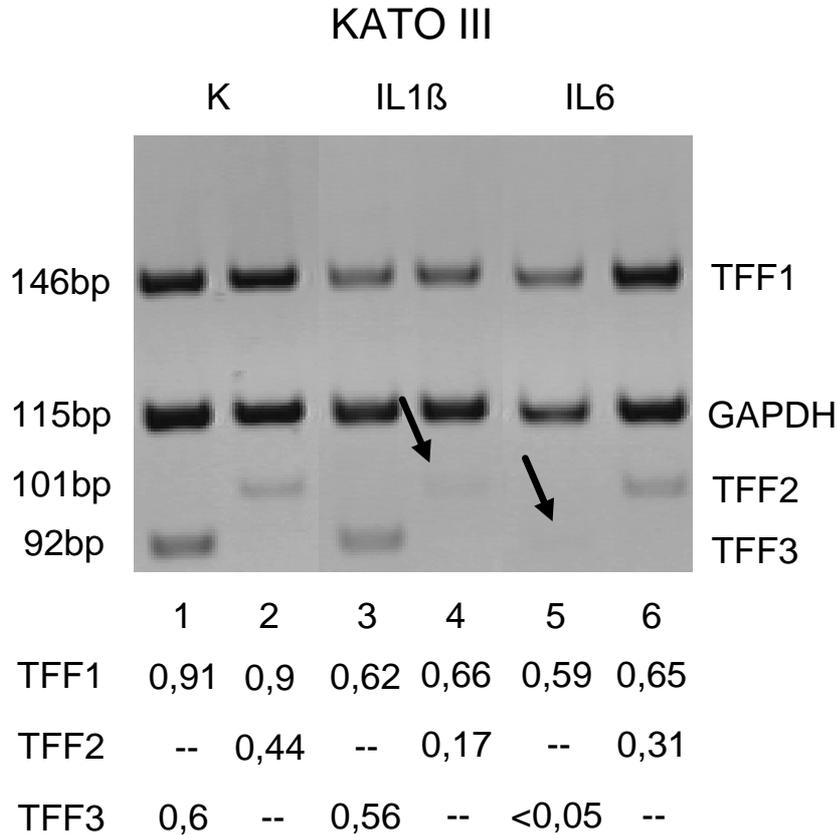


**Abbildung 3.13:** Endogene *TFF* Expression nach 48Std Stimulation mit IL6 und anschließender Multiplex-RT-PCR in LS 174 T. Ungerade Zahlen bezeichnen *TFF1*, *GAPDH* und *TFF3*, gerade *TFF1*, *GAPDH* und *TFF2* Amplifikationen. Die densitometrische Analyse der Bandenintensitäten sind als Verhältnis *TFF* zu *GAPDH* dargestellt. K=unstimulierte Kontrolle.

Abbildung 3.14 zeigt die *TFF* Expression von KATO III nach IL1 $\beta$  und IL6 Stimulation. Nach IL1 $\beta$  Induktion war eine Reduktion der *TFF2* Expression auf 39% (Reihen 3 und 4) bemerkbar. IL6 führte zu einer starken Herabregulierung von *TFF3* auf

### Kapitel 3. Ergebnisse

8% (Reihen 5 und 6) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Zusätzlich war eine leicht Reduktion der *TFF1* Expression sowohl nach Stimulation mit  $IL1\beta$  (68-73%, Reihen 1-4) als auch mit  $IL6$  (64-72%, Reihen 1, 2, 5 und 6) bemerkbar.



**Abbildung 3.14:** Endogene *TFF* Expression nach 48Std Stimulation mit  $IL1\beta$  und  $IL6$  und anschließender Multiplex-RT-PCR in KATO III. Ungerade Zahlen bezeichnen *TFF1*, *GAPDH* und *TFF3*, gerade *TFF1*, *GAPDH* und *TFF2* Amplifikationen. Die densitometrische Analyse der Bandenintensitäten sind als Verhältnis *TFF* zu *GAPDH* dargestellt. K=unstimulierte Kontrolle.

#### 3.1.4.2 TFF-Realtime-PCR

Wie die Ergebnisse der Multiplex-PCR zeigten, konnte durch Stimulation mit den proinflammatorischen Cytokinen  $IL1\beta$  und  $IL6$  eine Reduktion der endogenen *TFF* Expression in den Zelllinien HT-29, LS 174 T und KATO III nachgewiesen werden. Jedoch läßt diese Methode keine exakte Quantifizierung der Expressionsstärke zu, da immer Bandenintensitäten miteinander verglichen werden müssen. Ein anderes Problem der konventionellen PCR ist die Abgreifung der Kinetik. Wird die PCR-Reaktion über

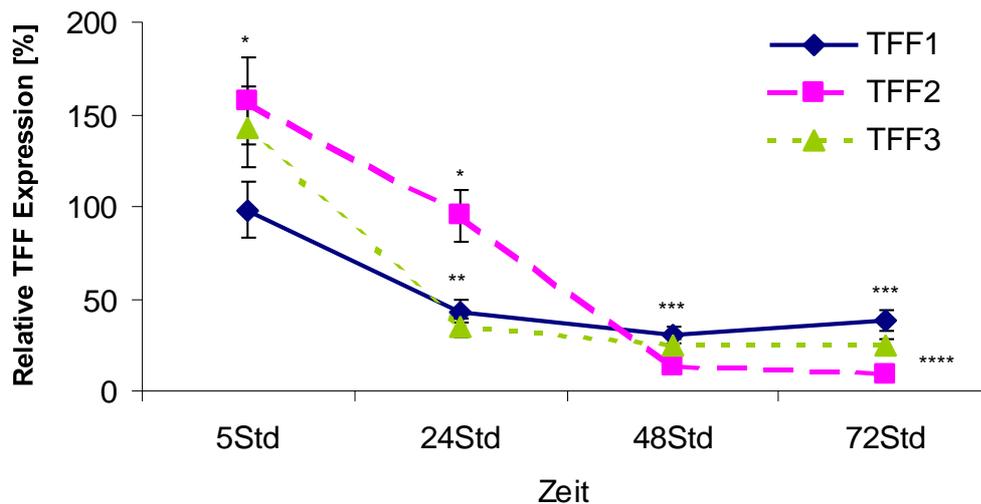
zu viele Zyklen gefahren, besteht die Möglichkeit, daß das PCR-Endprodukt in der stationären Phase abgegriffen wird. In diesem Fall kann keine Aussage über Expressionsstärken getroffen werden, da sich alle Banden in Dicke und Intensität gleichen.

Aus diesem Grund wurde zusätzlich zur konventionellen Multiplex-PCR die Methode der Realtime-PCR angewendet. Hier geschieht die Quantifizierung mittels Bestimmung von Fluoreszenzschwellenwerten (siehe Kapitel 2, Material und Methoden).

Aus Gründen der Etablierung des neuen Systems wurden nur HT-29, als Vertreter einer Darmzelllinie, und die Magenzelllinie KATO III in der Realtime-PCR eingesetzt. Die Auswertung der Daten ist in Kapitel 2, Material und Methoden, beschrieben. Die Signifikanzwerte nach Studentischem T-Test sind in den Abbildungen als \* dargestellt: Hochsignifikante Werte sind mit \*\*\* und \*\*\*\* bezeichnet.

### 3.1.4.2.1 HT

In Abbildung 3.15 ist der Verlauf der *TFF* Expression von 5-72Std nach  $IL1\beta$  Stimulation dargestellt. Während nach 5Std Stimulation die *TFF2* und *TFF3* Expression



**Abbildung 3.15:** Endogene *TFF* Expression nach Stimulation mit  $IL1\beta$  und anschließender Realtime-PCR bei HT-29. Die Kurvenpunkte zum jeweiligen Zeitpunkt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanzwerte sind mit \* bezeichnet: \* $p > 0,1$ ; \*\* $0,1 < p > 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,01$ .

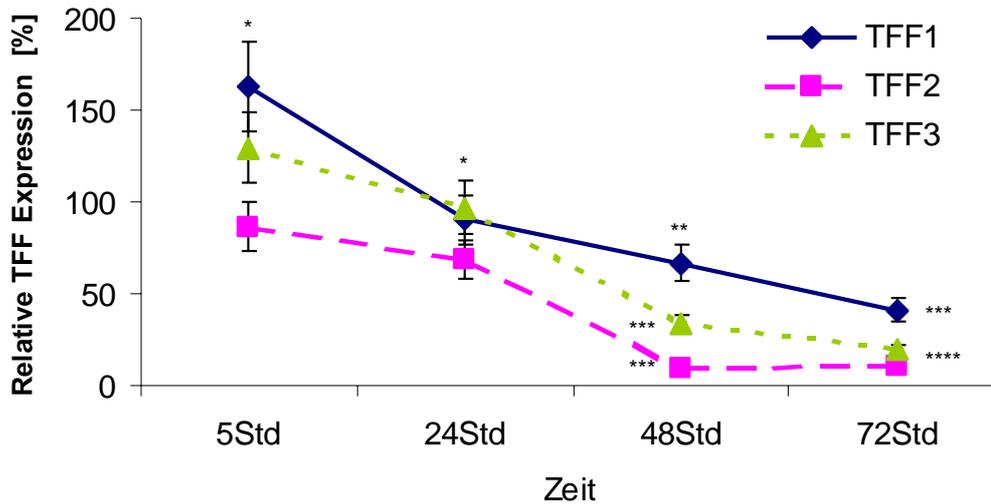
sogar noch ansteigt (*TFF1* Expression liegt bei 98%), ist nach 24Std bereits ein Abfall zu bemerken: *TFF1* und *TFF3* zeigen noch 43% bzw. 34% Expression. Bei *TFF2* ist ebenfalls eine Reduktion zusehen, jedoch fällt die Expression nach vorherigem Anstieg nur auf 95%.

Nach 48Std Stimulation ist die Expression aller *TFF* Gene signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ). Während die *TFF2* und *TFF3* Expression nach 72Std noch weiter reduziert

### Kapitel 3. Ergebnisse

wird bzw. gleich bleibt, ist bei *TFF1* bereits wieder ein leichter Anstieg bemerkbar.

Auch nach 5Std Stimulation mit IL6 ist ein Anstieg der Expression von *TFF3* bemerkbar (Abbildung 3.16). Ebenso steigt hier die Expression von *TFF1*, während bei

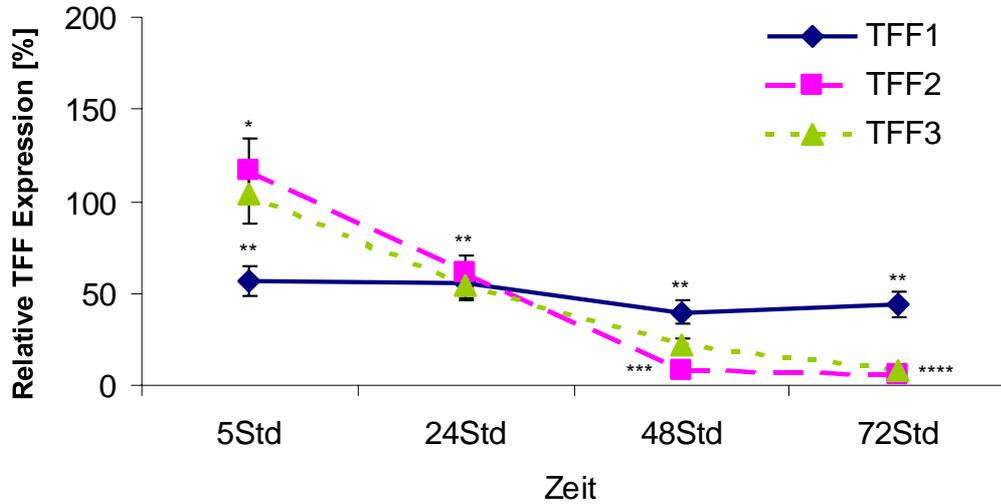


**Abbildung 3.16:** Endogene *TFF* Expression nach Stimulation mit IL6 und anschließender Realtime-PCR bei HT-29. Die Kurvenpunkte zum jeweiligen Zeitpunkt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanzwerte sind mit \* bezeichnet: \* $p > 0,1$ ; \*\* $0,1 < p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,01$ .

*TFF2* kein Anstieg, aber auch kein extremer Abfall zu sehen ist. Analog zur  $IL1\beta$  Stimulation fällt auch nach 24Std IL6 Induktion die Expression der drei *TFF* Gene bereits ab, allerdings ist eine Reduktion an sich noch nicht sichtbar.

Die Herabregulierung der *TFF* Gene setzt sich nach 48Std und auch nach 72Std IL6 Stimulation fort. *TFF1* scheint durch IL6 nicht so stark betroffen zu sein, wie *TFF2* und *TFF3*, die nach 48Std auf 10% bzw. 34% Aktivität reduziert sind. Die Transkription von *TFF3* fällt nach 72Std noch weiter auf 20%.

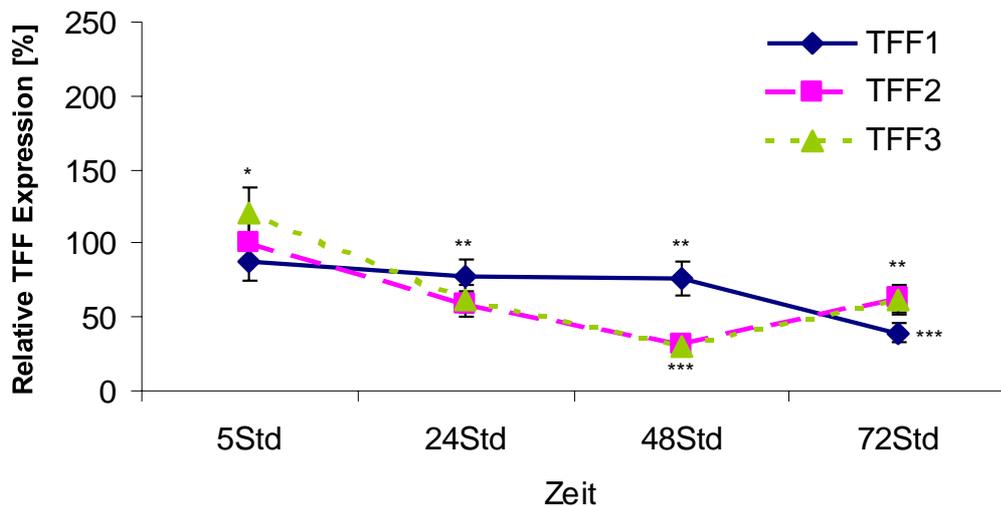
In Abbildung 3.17 sind die Ergebnisse im Zeitverlauf nach kombinierter  $IL1\beta$  und IL6 Stimulation dargestellt. Während die *TFF2* und *TFF3* Aktivität nach 5Std leicht ansteigt bzw. im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle gleich bleibt, sinkt die *TFF1* Expression hier bereits um etwa die Hälfte. Auffällig ist, daß dieses Level auch zu den anderen abgegriffenen Zeitpunkten ungefähr gleich bleibt. Die Aktivität von *TFF2* und *TFF3* fällt analog zu den Einzelstimulationen kontinuierlich ab, bis sie nach 72Std Werte von 6% bzw. 9% Restexpression erreicht. Die kombinierte Stimulation mit  $IL1\beta$  und IL6 erniedrigt die *TFF2* und *TFF3* Expression in HT-29 vor allem nach 48 und 72Std stärker, als die Einzelstimulationen.



**Abbildung 3.17:** Endogene *TFF* Expression nach Stimulation mit  $IL1\beta$  und  $IL6$  und anschließender Realtime-PCR bei HT-29. Die Kurvenpunkte zum jeweiligen Zeitpunkt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanzwerte sind mit \* bezeichnet: \* $p > 0,1$ ; \*\* $0,1 < p > 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,01$ .

### 3.1.4.2.2 KATO III

In diesem Abschnitt sind die Realtime-PCR Ergebnisse der Magenzelllinie KATO III dargestellt. In Abbildung 3.18 ist die *TFF* Expression nach Stimulation mit  $IL1\beta$  zu

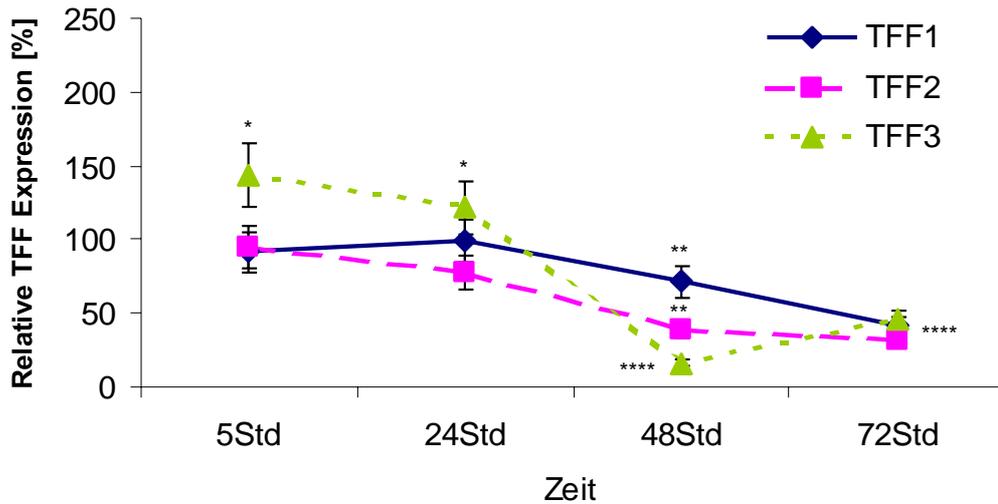


**Abbildung 3.18:** Endogene *TFF* Expression nach Stimulation mit  $IL1\beta$  und anschließender Realtime-PCR bei KATO III. Die Kurvenpunkte zum jeweiligen Zeitpunkt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanzwerte sind mit \* bezeichnet: \* $p > 0,1$ ; \*\* $0,1 < p > 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,01$ .

### Kapitel 3. Ergebnisse

sehen. Die Aktivität von *TFF1* ist nach 5-48Std Stimulation nur leicht reduziert. Erst nach 72Std fällt sie deutlich auf 40% ab. Die Expressionskurven von *TFF2* und *TFF3* sind fast deckungsgleich: nach Abfall bis auf 31% Aktivität nach 48Std, beginnen sie nach 72Std wieder anzusteigen.

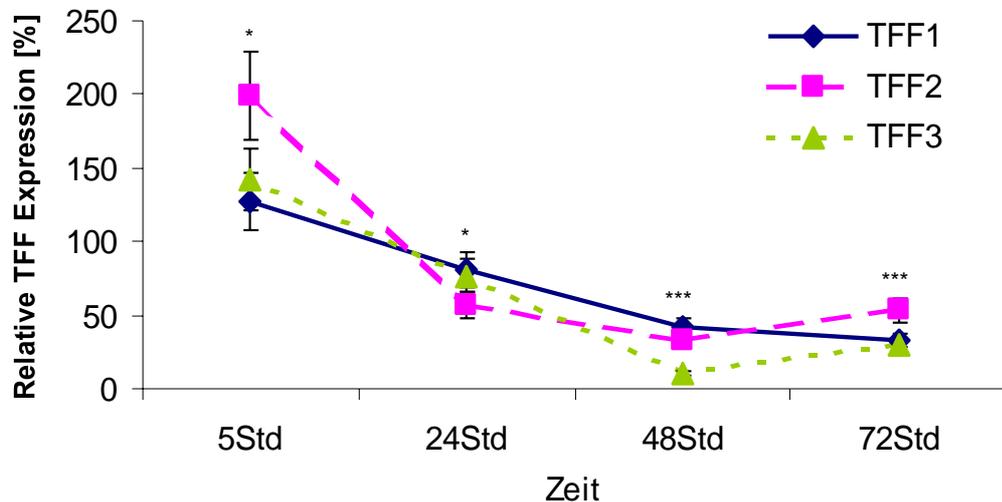
In Abbildung 3.19 ist der Zeitverlauf der *TFF* Expression nach IL6 Induktion zu sehen. Während *TFF1* und *TFF2* Aktivität im Vergleich zur nicht stimulierten Kon-



**Abbildung 3.19:** Endogene *TFF* Expression nach Stimulation mit IL6 und anschließender Realtime-PCR bei KATO III. Die Kurvenpunkte zum jeweiligen Zeitpunkt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanzwerte sind mit \* bezeichnet: \* $p > 0,1$ ; \*\* $0,1 < p > 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,01$ .

trolle nach 5 und 24Std ungefähr gleich bleibt bzw. leicht absinkt, steigt die von *TFF3* um fast 50% nach 5Std und beträgt nach 24Std immer noch 112%. Nach 48Std ist dagegen bei *TFF3* ein starker Abfall auf 17% Restaktivität zu bemerken, wohingegen *TFF1* weiterhin nur leicht (72%), *TFF2* immerhin auf 39% Aktivität reduziert werden. Bei *TFF1* und *TFF2* setzt sich die Reduktion auch nach 72Std weiter fort. Dagegen zeigt die *TFF3* Expression nach einem starken Abfall nach 48Std (17%), nach 72Std bereits wieder einen leichten Anstieg (46%).

Auch bei KATO III erfolgte eine kombinierte Stimulation mit IL1 $\beta$  und IL6 (Abbildung 3.20). Hier ist nach 5Std Stimulation ein Aktivitätsanstieg von allen drei *TFF*



**Abbildung 3.20:** Endogene *TFF* Expression nach Stimulation mit IL1 $\beta$  und IL6 und anschließender Realtime-PCR bei KATO III. Die Kurvenpunkte zum jeweiligen Zeitpunkt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanzwerte sind mit \* bezeichnet: \* $p > 0,1$ ; \*\* $0,1 < p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,01$ .

Genen zu verzeichnen. *TFF2* erreicht einen Höchstwert von fast 200%. Hier ist jedoch schon nach 24Std ein Abfall um 150% zu bemerken. Die *TFF1* und *TFF3* Expression wird nach 24Std weniger stark reduziert.

Nach 48Std erreicht die Aktivität von *TFF2* und *TFF3* jeweils ihren tiefsten Wert (34% *TFF2*, 11% *TFF3*) und steigt nach 72Std wieder an. Die *TFF1* Expression sinkt von 41% nach 48Std noch leicht weiter auf 33% nach 72Std.

## Kapitel 3. Ergebnisse

---

### 3.1.4.3 Zusammenfassung

In Tabelle 3.3 sind die gesamten Ergebnisse der Realtime-PCR tabellarisch in Prozent der nicht stimulierten Kontrolle dargestellt.

Zelllinie	Zeit		TFF1 [%]	TFF2 [%]	TFF3 [%]
HT-29	5Std	IL1 $\beta$	98 $\pm$ 14	157 $\pm$ 20	143 $\pm$ 19
		IL6	163 $\pm$ 21	87 $\pm$ 15	130 $\pm$ 14
		IL1 $\beta$ +IL6	57 $\pm$ 11	117 $\pm$ 13	103 $\pm$ 13
	24Std	IL1 $\beta$	43 $\pm$ 4	95 $\pm$ 9	34 $\pm$ 3
		IL6	90 $\pm$ 9	69 $\pm$ 5	97 $\pm$ 8
		IL1 $\beta$ +IL6	56 $\pm$ 3	61 $\pm$ 6	55 $\pm$ 7
	48Std	IL1 $\beta$	<b>30</b> $\pm$ 2	<b>14</b> $\pm$ 1	<b>25</b> $\pm$ 2
		IL6	67 $\pm$ 4	<b>10</b> $\pm$ 1	<b>34</b> $\pm$ 3
		IL1 $\beta$ +IL6	40 $\pm$ 3	<b>8</b> $\pm$ 1	<b>23</b> $\pm$ 1
72Std	IL1 $\beta$	<b>38</b> $\pm$ 4	<b>9</b> $\pm$ 2	<b>25</b> $\pm$ 3	
	IL6	<b>41</b> $\pm$ 7	<b>11</b> $\pm$ 4	<b>20</b> $\pm$ 4	
	IL1 $\beta$ +IL6	44 $\pm$ 10	<b>6</b> $\pm$ 1	<b>9</b> $\pm$ 2	
KATO III	5Std	IL1 $\beta$	87 $\pm$ 14	101 $\pm$ 12	120 $\pm$ 14
		IL6	92 $\pm$ 15	95 $\pm$ 14	144 $\pm$ 14
		IL1 $\beta$ +IL6	128 $\pm$ 16	199 $\pm$ 22	143 $\pm$ 10
	24Std	IL1 $\beta$	78 $\pm$ 10	59 $\pm$ 9	62 $\pm$ 9
		IL6	99 $\pm$ 8	78 $\pm$ 8	112 $\pm$ 12
		IL1 $\beta$ +IL6	80 $\pm$ 11	57 $\pm$ 8	77 $\pm$ 9
	48Std	IL1 $\beta$	<b>77</b> $\pm$ 6	<b>31</b> $\pm$ 4	31 $\pm$ 3
		IL6	72 $\pm$ 8	39 $\pm$ 7	<b>17</b> $\pm$ 5
		IL1 $\beta$ +IL6	<b>41</b> $\pm$ 5	<b>34</b> $\pm$ 3	<b>11</b> $\pm$ 1
	72Std	IL1 $\beta$	<b>40</b> $\pm$ 5	63 $\pm$ 7	61 $\pm$ 6
		IL6	<b>41</b> $\pm$ 6	<b>32</b> $\pm$ 2	<b>46</b> $\pm$ 5
		IL1 $\beta$ +IL6	<b>33</b> $\pm$ 3	<b>53</b> $\pm$ 4	<b>30</b> $\pm$ 3

**Tabelle 3.3:** Relative endogene *TFF* Expression nach 5, 24, 48 und 72Std Stimulation mit IL1 $\beta$  und IL6 nach Realtime-RT-PCR. Die Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung und als Prozent relativ zur nicht stimulierten Kontrolle dargestellt. Hochsignifikante Werte sind hervorgehoben.

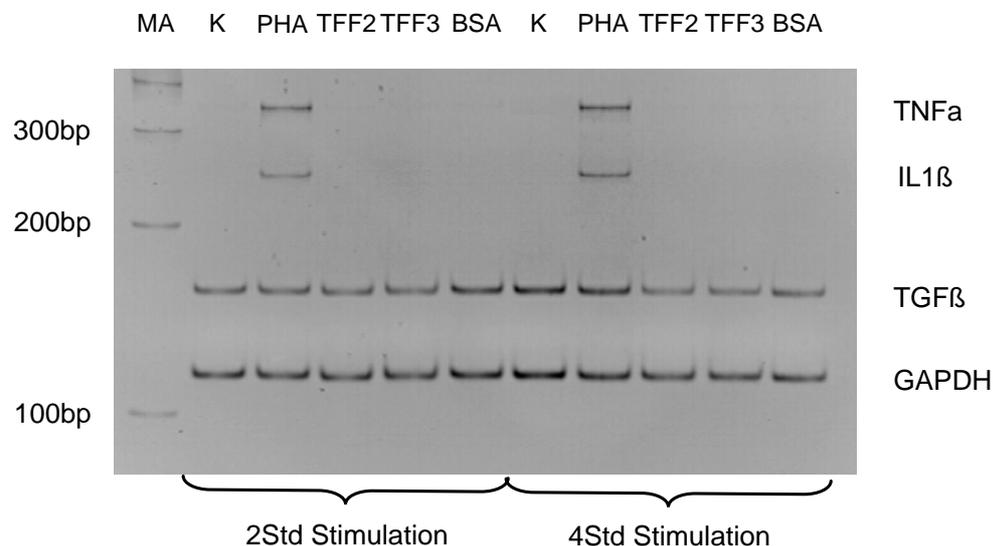
## 3.2 Wirkung von TFF Peptiden auf die Cytokinexpression in Immunzellen

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, daß die proinflammatorischen Cytokine IL1 $\beta$  und IL6 die Expression der *TFF* Gene in Magen- und Darmzelllinien herabregulieren, war eine andere interessante Fragestellung, ob TFF Peptide ihrerseits immunmodulierende Wirkung besitzen. An der promyeloischen Leukämiezelllinie HL-60 und an frisch isolierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) sollte untersucht werden, ob die Kleeblattpeptide die Cytokinexpression beeinflussen.

### 3.2.1 Cytokinexpression nach TFF Peptid Induktion bei HL-60

Nach der Ausdifferenzierung zur granulozytären (durch DMSO) und zur monozytären Linie (durch PMA), wurden die HL-60 Zellen jeweils 2, 4 und 24Std mit TFF2 und TFF3 stimuliert. Phytohämagglutinin (PHA) wurde als Positivkontrolle verwendet, Bovines Serumalbumin wurde eingesetzt, um zu überprüfen, ob eventuell zu beobachtende Effekte, kleeblattpeptid-spezifisch sind.

In Abbildung 3.21 ist zu erkennen, daß die Cytokinexpression in der granulozytären Linie nur durch PHA stimuliert werden kann. Nach 2 bzw. 4Std ist im



**Abbildung 3.21:** Cytokinexpression nach 2 und 4Std Stimulation mit PHA=Phytohämagglutinin, TFF2, TFF3 und BSA=Bovines Serumalbumin und anschließender RT-PCR bei HL60 (granulozytär). MA=Marker, K=unstimulierte Kontrolle.

## Kapitel 3. Ergebnisse

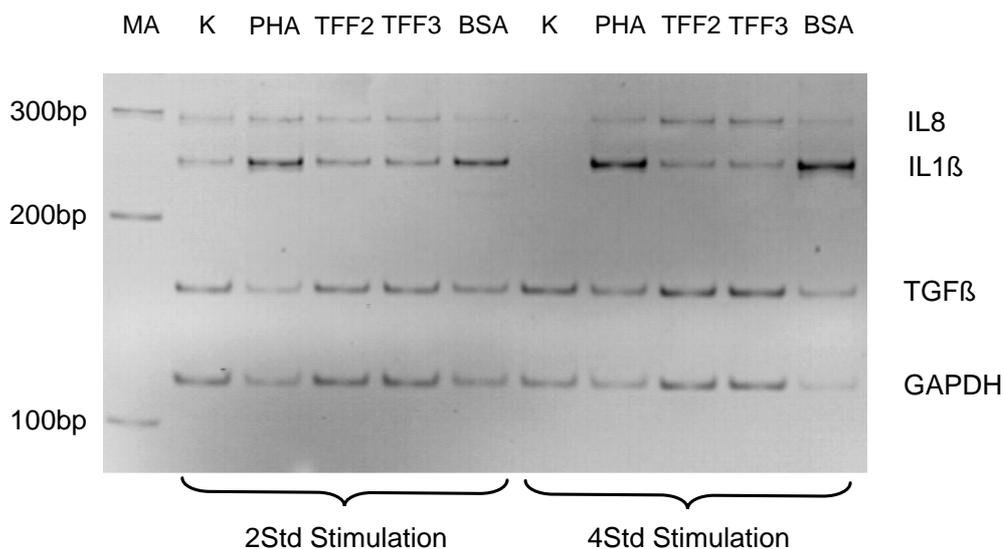
---

Vergleich zur unstimulierten Kontrolle Expression von Tumor Nekrose Faktor (TNF) $\alpha$  und IL1 $\beta$  zu bemerken. Die verwendeten Kleeblattpeptide scheinen hier, genau wie BSA, keine immunmodulierende Wirkung zu besitzen. Transforming Growth Factor (TGF) $\beta$  wird in allen Versuchsansätzen gebildet. Nach 24Std Stimulation konnten ebenfalls nur mit PHA Expression von TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$  induziert werden (ohne Abbildung).

In der monozytären Linie konnte zu keinem Zeitpunkt Cytokinexpression, auch nicht mit PHA, stimuliert werden, GAPDH und TGF $\beta$  waren bei allen Proben vorhanden (ohne Abbildung).

### 3.2.2 Cytokinexpression nach TFF Peptid Induktion bei PMN

Auch die PMN wurden mit PHA, TFF2, TFF3 und BSA stimuliert. In Abbildung 3.22 ist das Ergebnis nach 2 und 4Std Stimulation zu sehen. Nach 2Std sind neben GAPDH



**Abbildung 3.22:** Cytokinexpression nach 2 und 4Std Stimulation mit PHA=Phytohämagglutinin, TFF2, TFF3 und BSA=Bovines Serumalbumin und anschließender RT-PCR bei PMN. MA=Marker, K=unstimulierte Kontrolle.

und TGF $\beta$  noch IL8 und IL1 $\beta$  aktiviert. Da die unstimulierte Kontrolle dasselbe Expressionsmuster zeigt, ist davon auszugehen, daß die Expression von IL8 und IL1 $\beta$ , ebenso wie die von TGF $\beta$ , nicht durch eine der zugegebenen Substanzen hervorgerufen wurde. Diese Cytokine werden von den PMN zu diesem Zeitpunkt von vornherein gebildet.

Nach 4Std kommt es zu einer Veränderung des Expressionsmusters bei PMN. Die unstimulierte Kontrolle exprimiert nun neben der GAPDH nur noch TGF $\beta$ , aber weder

IL8 noch IL1 $\beta$  wie noch 2 Std zuvor. Dagegen induzierten alle Stimulantien, PHA, TFF2, TFF3 und BSA eine Expression dieser Cytokine (Abbildung 3.22). Da PMN außerhalb des Körpers nur kurze Zeit lebensfähig sind, überlebten sie eine 24stündige Stimulation nicht.



# Kapitel 4

## Diskussion

Die Familie der Kleeblattpeptide (TFF), die erst seit einigen Jahren bekannt ist, ist durch ein gemeinsames Merkmal, der Kleeblattdomäne, charakterisiert. Seit ihrer Entdeckung 1982 wird die Aufgabe der TFF Peptide im Organismus nach und nach erforscht. Sie scheinen, in Assoziation mit den Muzinen, eine zentrale Rolle beim Schutz der Mukosa des Magen-Darmtraktes zu spielen und am Heilungsprozeß von Ulzerationen beteiligt zu sein. Die TFF sind hochkonserviert und gegen Hitze, Säure und Enzyme resistent. Die Expression der Kleeblattpeptide ist eng assoziiert mit der Kontrolle durch Hormone und Stimulation durch Wachstumsfaktoren. Der zugrundeliegende molekulare Funktionsmechanismus der TFF Peptide ist noch unbekannt, aber ihre biologischen Eigenschaften als Motogene mag sich als nützlich bei der Therapie von ulzerativen Erkrankungen z.B. chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erweisen. Außerdem wird zumindest TFF1 als Tumorsuppressor angesehen. Die Untersuchung dieses Kleeblattpeptides in malignen Entartungen im Magen wäre in Hinblick auf die Magenkrebsentstehung sehr interessant.

### 4.1 Der herabregulierende Effekt von IL1 $\beta$ und IL6

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß IL1 $\beta$  und IL6 die endogene Expression der drei *TFF* und auch die Reporterexpression, vermittelt durch ca. 1000bp der entsprechenden 5'-flankierenden Promotorregion, in den gastrointestinalen Zelllinien HT-29, LS 174 T und KATO III inhibieren. Bei der Magenzelllinie MKN-45 war keine nennenswerte Herabregulierung der Reporter- und der endogenen Expression feststellbar; darum wurde diese Zelllinie für diesen Versuchsansatz als ungeeignet befunden und in die weiteren Studien nicht mehr einbezogen.

Die Herabregulation der endogenen *TFF* Expression bei HT-29 und KATO III konnte mittels quantitativer Realtime-PCR bestätigt werden. Aus Zeitgründen konnte die andere Darmzelllinie LS 174 T nicht in der Realtime-PCR untersucht werden. Aufgrund des hohen Materialbedarfs wurde der erschwinglichsten "Fluoreszenzvariante" mit SYBR Green gegenüber z.B. TaqMan Sonden der Vorzug gegeben. Dafür mußte jedoch jedes Gen (drei TFF und GAPDH) kloniert werden, um mittels externer

## Kapitel 4. Diskussion

---

Standards die Effizienz der jeweiligen Reaktionskinetik bestimmen zu können. Die Entscheidung, HT-29 als Vertreter der intestinalen Zelllinien in der Realtime-PCR einzusetzen, begründete sich durch die deutlichere Inhibierung der Reportergenaktivität in den Transfektionsexperimenten im Vergleich zu LS 174 T.

In der Realtime-PCR trat eine signifikante Herabregulation der *TFF* Expression erst nach 48Std Cytokinstimulation auf. Dies läßt sich aber durch den experimentellen Versuchsaufbau erklären: durch die Methode der RT-PCR wird der “Steady State Level” der mRNA, nicht aber der kinetische Verlauf der Transkriptionsrate, untersucht. Das bedeutet, daß eine Herabregulation der *TFF* Gentranskription, entsprechend der Halbwertszeit der vor der Stimulation schon vorhandenen mRNA, erst später zu beobachten ist, als z.B. eine Hochregulation, bei der eine Änderung der mRNA Menge sofort zu bemerken wäre. Wollte man eine frühe Herabregulation der Transkription beobachten, wäre eine Puls-Markierung der mRNA notwendig.

Die Expression von *TFF2* und *TFF3* scheint durch eine kombinierte Applikation von *IL1 $\beta$*  und *IL6* zumindest additiv herabreguliert zu werden. Da sowohl *IL1 $\beta$*  als auch *IL6* Rezeptoren auf intestinalen Epithelzellen exprimiert werden, ist es höchstwahrscheinlich, daß diese Zellen durch proinflammatorische Cytokine, wie *TNF $\alpha$*  und auch *IL1 $\beta$*  und *IL6*, welche von den Epithelzellen selbst, aber auch von anderen Zellen der intestinalen Mukosa gebildet werden, beeinflußt werden [Panja et al., 1998]. Proinflammatorische Cytokine können den Phänotyp, das Wachstum und die Funktion von Epithelzellen verändern. Deshalb ist es eine interessante Überlegung, ob die *TFF* Transkription möglicherweise auch *in vivo* von diesen Cytokinen beeinflußt wird.

Es gibt viele Hinweise darauf, daß die Kleeblattpeptide eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der epithelialen Unversehrtheit, des Schutzes und bei der Wundheilung spielen. Sie gehören zu den frühesten Markern der gastrointestinalen Differenzierung und scheinen als Morphogene zu wirken [Familarì et al., 1998, Otto and Patel, 1999]. *TFF2* und *TFF3* KO-Mäuse zeigen zwar einen unauffälligen Phänotyp, sind aber gegenüber oral zugeführten Noxen empfindlicher [Farrell et al., 2002, Mashimo et al., 1996]. Bei einer experimentellen Mukositis ist der temporäre Wandel der *TFF3* mRNA mit der Differenzierung der Epithelzellen in Becherzellen assoziiert [Xian et al., 1999]. Zusätzlich gewährt *TFF3* eine epitheliale Resistenz gegen Apoptose und stimuliert die Zellmigration [Taupin et al., 2000]. Schließlich wird in einigen Arbeiten gezeigt, daß sowohl die Applikation von rekombinanten Kleeblattpeptiden als auch eine transgene *TFF3* Überexpression in Ratten die mukosale Verteidigung fördert und zur Heilung experimenteller Kolitis beiträgt [Marchbank et al., 2001, Mashimo et al., 1996, Tran et al., 1999, Kindon et al., 1995]. Deshalb scheint es offensichtlich, daß eine stark reduzierte Expression des “Heil”peptides *TFF3* zu epithelialen Dysmorphien und Ulzerationen führen kann. Im Einklang mit diesen Beobachtungen konnte in dieser Studie gezeigt werden, daß die *TFF3* Genexpression durch *IL1 $\beta$*  und *IL6* in den intestinalen Zelllinien HT-29 (bis auf 6%) und LS 174 T (bis auf 72%) herabreguliert ist.

Neben der Herabregulierung von *TFF3* konnte in dieser Arbeit auch eine Inhibierung der *TFF1* und *TFF2* Expression in der Magenzelllinie KATO III gezeigt

werden. Diese Tatsache *in vitro* könnte *in vivo* Folgen in Bezug auf die Entstehung von Magenkrebs haben. Neuere Studien haben gezeigt, daß die proinflammatorischen Cytokine IL1 $\beta$  und IL6 bei der Magenkrebsentwicklung eine Rolle spielen [El Omar et al., 2000, Yamaoka et al., 2001]. So geht eine verstärkte IL1 $\beta$  Produktion, verursacht durch IL1 $\beta$  Genpolymorphismen, einher mit einem erhöhtem Risiko von *H. pylori* induzierter Magenkrebsentwicklung [El Omar et al., 2000]. Das Ergebnis in der vorliegenden Untersuchung schlägt die Annahme einer neuen Hypothese vor: ein erhöhter IL1 $\beta$  Spiegel, der entweder durch IL1 $\beta$  Genpolymorphismus oder durch bakterielle Infektion verursacht wurde, würde die *TFF1* Aktivierung inhibieren und demzufolge eine Reduktion dieses "Heil-" und Tumorsuppressorpeptides verursachen. Dies könnte ein wesentlicher kausaler Faktor der Karzinogenese sein.

In Anbetracht der verstärkten IL1 $\beta$  Produktion bei *H. pylori* Präsenz, ist die Beobachtung interessant, daß dieses Bakterium auch den IL6 Spiegel erhöht: dieser ist in Magenkrebsgeweben im frühen Stadium mit gleichzeitiger *H. pylori* Infektion sehr viel höher als normal und fällt nach der *H. pylori* Eradikation [Yamaoka et al., 2001]. Demzufolge ist die Produktion beider Cytokine, IL1 $\beta$  und IL6, in Anwesenheit von *H. pylori*, dessen Verwicklung in der Magenkrebsentstehung schon seit längerem vermutet wird, erhöht. Allerdings konnte bisher der Mechanismus der *H. pylori* induzierten Karzinogenese noch nicht geklärt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu der Annahme, daß die verstärkte IL1 $\beta$  und IL6 Produktion in mit *H. pylori* infizierter Magenschleimhaut eine Herabregulation von TFF1 und TFF2 vermittelt. Es gibt einige Hinweise darauf, daß zumindest TFF1 als Tumorsuppressor wirkt. Im *TFF1* KO-Mausmodell war die Entwicklung von Adenokarzinomen zu beobachten [Lefebvre et al., 1996]. Diese Mäuse zeigten alle eine stark dysplastische Epithelschicht und waren deshalb sehr anfällig gegenüber bösartigen Neubildungen. Zusätzlich ist die *TFF1* Expression in Geweben von Patienten mit Magentumoren reduziert im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen [Luqmani et al., 1989]. In "loss of heterozygosity" (LOH) Studien konnte gezeigt werden, daß die Hälfte der untersuchten Magenkarzinome eine Deletion auf Chromosom 21q22.3 aufwies [Park et al., 2000b]. *TFF1*, das in diesem Bereich lokalisiert ist, wird als wahrscheinlichstes Kandidatengen für eine Beteiligung bei der Magenkrebsentstehung betrachtet [Park et al., 2000b]. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß Promotormethylierung von *TFF1* der für die Krebsentwicklung erforderliche "second hit" [Knudson, 1996] sein könnte (J. C. Machado, submitted).

TFF2 könnte ebenfalls die Tumorentwicklung supprimieren, da rekombinantes TFF2 die zytoprotektive Wirkung von TFF1 und TFF3 unterstützt [Tran et al., 1999, Kindon et al., 1995, Playford et al., 1996, Babyatsky et al., 1996], doch sind bis dato keine somatischen Mutationen oder epigenetische Methylierungen bekannt, welche als "second hit" neben der LOH auftreten müßten.

### 4.2 Der herabregulierende Effekt von NF $\kappa$ -B und C/EBP $\beta$

Nachdem die *TFF* Expression durch IL1 $\beta$  und IL6 reduziert wurde, lag die Vermutung nahe, daß die von diesen Cytokinen aktivierten Transkriptionsfaktoren ebenfalls einen Effekt auf die *TFF* Expression zeigen müßten. Tatsächlich war auch nach Co-Transfektion mit NF $\kappa$ -B und C/EBP $\beta$  eine deutliche Reduktion der *TFF* Reportergenaktivität zu sehen. Da in der *TFF* Promotorregion keine putativen Bindestellen für den Transkriptionsfaktor STAT3, der neben C/EBP $\beta$  von IL6 aktiviert wird, entdeckt wurden, konzentriert sich diese Arbeit, neben NF $\kappa$ -B, auf C/EBP $\beta$ .

Es gibt einige Hinweise darauf, daß durch Cytokine (z.B. durch IL1 $\beta$ ) aktivierte NF $\kappa$ -B eine wichtige Rolle in der Pathogenese von CED spielt; und eine verstärkte Expression von C/EBP $\beta$  korreliert mit der Invasivität von Kolorektalkrebs [Rask et al., 2000]. Alle drei humane *TFF* Gene besitzen einige putative NF $\kappa$ -B und C/EBP $\beta$  Bindestellen innerhalb eines 900bp großen Abschnitts in der 5'-flankierenden Region, die sich nur in einer oder zwei Basen von den Konsensussequenzen unterscheiden. Um eine (oder mehrere) Bindestellen, die eine funktionelle Aktivität vermitteln, identifizieren zu können, müßten Mutationsstudien an allen Bindungsstellen und in verschiedenen Kombinationen durchgeführt werden. Als andere Nachweismethoden würden sich auch der "Electrophoretic mobility shift assay" (EMSA) oder das "Chromatin crosslinking and immunoprecipitation" (ChIP) Verfahren anbieten.

NF $\kappa$ -B ist bekanntermaßen der Aktivator einer Vielzahl von Genen, die an der frühen Immunantwort beteiligt sind [Jobin and Sartor, 2000]. Es gibt aber auch einige Beispiele für die Wirkung von NF $\kappa$ -B als Repressor der Transkription [Fontaine et al., 2000]. So ist es z.B. an der negativen Regulierung des Androgenrezeptors in Ratten [Supakar et al., 1995] und des Glukokortikoidrezeptors [Wissink et al., 1997] *in vitro* beteiligt. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, daß Wirkstoffe, die NF $\kappa$ -B direkt oder indirekt inhibieren, vielversprechende Mittel bei der Behandlung von CED sind [Segain et al., 2000, Jobin and Sartor, 2000, Kaiser et al., 1999]. In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, daß NF $\kappa$ -B Inhibitoren, wie 5-Aminosallylsäure (Mesalamin) und Caffeinsäure Phenethylester (CAPE) (S.Braun, Diplomarbeit) die *TFF* Genaktivität erhöhen. Darüber hinaus wirkt TNF $\alpha$ , ein Aktivator von NF $\kappa$ -B, inhibierend auf die *TFF in vitro*; aktivierte NF $\kappa$ -B zusammen mit einer reduzierten TFF3 Peptidexpression findet sich auch in Darmgewebe von Ratten mit experimentell induzierter Kolitis (M. Baus-Loncar et al., submitted).

Der zweite Transkriptionsfaktor, C/EBP $\beta$ , ist ein direkter Mediator des Akutphase Antwort bei Epithelzellen [Desilets et al., 2000]. C/EBP $\beta$  kann ebenfalls sowohl als Aktivator als auch als Repressor der Transkription fungieren [Pei and Shih, 1990].

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten an, daß durch IL1 $\beta$  hervorgerufene NF $\kappa$ -B- und durch IL6 hervorgerufene C/EBP $\beta$ -vermittelte *TFF* Transkriptionssuppression auch den TFF3 Spiegel reduziert. Dadurch kann dieses "Heil"peptid seine Schutz-

funktion nicht mehr ausüben, was teilweise die Beeinträchtigung der Wundheilung bei CED erklären könnte.

### 4.3 Der immunmodulierende Effekt von rekombinanten TFF2 und TFF3 Peptiden

Die Immunelimination von Antigenen, die den Mukosablock im Darm penetriert haben, wird unter anderem von den phagozytierenden Zellen des Immunsystems, den PMN und den Makrophagen, getragen. Geht man nun von der Überexpression der Kleeblattpeptide (vor allem von TFF3) bei infektiösen Störsituationen im Darm aus, so stellt sich die Frage, ob diese Peptide aufgrund ihrer Schutzfunktion nicht auch Zellen des Immunsystems beeinflussen könnten. In einer Studie von Cook et al. konnte gezeigt werden, daß TFF2 und TFF3 im Lymphgewebe von Ratten exprimiert werden und außerdem als potentielle Stimulatoren der Monozytenmigration wirken können [Cook et al., 1999]. Es konnte auch beobachtet werden, daß humanes TFF2 in experimentell induzierter Kolitis bei Ratten die Entzündung um 50% reduzierte [Tran et al., 1999]. Eine weitere denkbare Möglichkeit der immunologischen Wirkung der Kleeblattpeptide wäre, daß sie die Ausschüttung von Cytokinen modulieren.

Um diese Annahme zu untersuchen, wurde die promyeloische Zelllinie HL-60 zur Ausdifferenzierung gebracht, zum einen zur granulozytären (durch DMSO), zum anderen zur monozytären (durch PMA) Linie. HL-60 Zellen eignen sich gut, die Funktion von Granulozyten, Monozyten und auch Makrophagen *in vitro* zu betrachten, da aufgrund der unlimitierten Proliferation dieser Zelllinie und der Möglichkeit zur Differenzierung [Collins, 1987] immer ausreichend Material zur Verfügung steht. Nach der Ausdifferenzierung wurde versucht, die Cytokinexpression zu aktivieren, sowohl mit dem Mitogen Phytohämagglutinin (PHA), welches die Produktion inflammatorischer Cytokine induziert [Jablonska et al., 1999], als auch mit den rekombinanten Kleeblattpeptiden TFF2 und TFF3.

Die granulozytäre Linie zeigte zu jedem Zeitpunkt (2, 4 und 24Std Stimulation) nur mit PHA eine Induktion von  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL1}\beta$ . Eine stimulierende Wirkung von TFF2 oder TFF3 konnte bei der granulozytären HL-60 Linie nicht gezeigt werden.

Bei der monozytär-ausdifferenzierten Linie konnte weder mit PHA noch mit den rekombinanten TFF eine Cytokininduktion beobachtet werden. Ob nun aber hier die TFF stimulierend wirken, kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da das als Positivkontrolle verwendete PHA auch keine Wirkung zeigte. Um die Möglichkeit der Stimulanz durch TFF bei der monozytären Linie vollständig auszuschließen, müßte die Cytokinexpression durch eine wirksamere Stimulanz, eventuell Zymosan oder Concavalin A [Jablonska et al., 1999] induziert werden.

Nachdem in der granulozytären Linie von HL-60 Cytokinexpression ( $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL1}\beta$ ) nur mit PHA erzeugt werden konnte, sollte die Situation *in vivo* untersucht werden. Dafür wurden frisch isolierte PMN verwendet. PMN gehören zu den wichtigsten akzessorischen Zellen der humoralen Immunantwort. Sie zählen zu den Pha-

## Kapitel 4. Diskussion

---

gozyten, deren Aufgabe die Aufnahme und Zerstörung von Fremdantigenen ist. PMN sind zur Ausschüttung verschiedener Cytokine fähig, unter anderem von proinflammatorischen, wie  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL1}\beta$  und  $\text{IL6}$ , aber auch von Chemokinen, wie  $\text{IL8}$  [Grenier et al., 1999].

In dieser Arbeit war nach zwei Stunden Stimulation mit PHA, TFF2, TFF3 und BSA keine Cytokininduktion im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle zu beobachten. Nach vier Stunden stellte sich die Situation jedoch anders dar: es konnte mit allen Stimulanzen eine  $\text{IL1}\beta$  und  $\text{IL8}$  Expression aufrechterhalten werden; diese Cytokine waren nach zwei Stunden bei der unstimulierten Kontrolle ebenfalls aktiviert. Dieser Umstand ist möglicherweise dadurch zu erklären, daß der Vorgang der PMN-Isolierung aus dem Blut an sich "Streß" für die Zellen bedeutet, auf den von vornherein mit vermehrter Cytokinausschüttung reagiert wird. Nach einer gewissen "Erholungsphase" (vier Stunden) wird diese reduziert. Es ist jedoch zu beobachten, daß auch dann keine spezifische Aktivierung durch TFF erzielt wird. Eine Erklärung hierfür ist die Funktion der PMN an sich: sie sind unter den ersten Effektorzellen bei der humoralen Immunantwort. Sie benötigen keine speziellen Auslösefaktoren, um unspezifisch Antigene zu phagozytieren. So ist auch verständlich, daß BSA dieselbe Reaktion wie PHA und TFF auslöst.

Eine Wirkungsweise der TFF im Zusammenhang mit PMN könnte jedoch sein, daß diese Peptide als Opsonine fungieren. In diesem Fall wäre es denkbar, daß die Kleeblattpeptide Antigene, wie z.B. Bakterien, durch Agglomeration den phagozytierenden PMN präsentieren. Diesem Ansatz wurde in unserer Arbeitsgruppe schon nachgegangen (E. dos Santos, Dissertationsarbeit) und es konnte gezeigt werden, daß mit TFF3 "bestückte" Bakterien besser von PMN aufgenommen wurden, als Kontrollbakterien ohne TFF3. Jedoch ist in diesem Ansatz nicht geklärt worden, ob diese verbesserte Phagozytose wirklich TFF3-spezifisch ist, oder ob dies nur im Rahmen der allgemeinen Opsonisierung wirkt.

Daß die Kleeblattpeptide unter Umständen immunmodulierend wirken können, wurde kürzlich beobachtet [Graness et al., 2002]. Hier konnte in der Bronchialepithel Zelllinie BEAS-2B gezeigt werden, daß TFF2 die  $\text{TNF}\alpha$  induzierte  $\text{IL6}$  und  $\text{IL8}$  Sekretion reguliert. Jedoch scheint dieser Effekt eher indirekt zu sein, da TFF2 die  $\text{IL6}$  und  $\text{IL8}$  Produktion nur in Kombination mit  $\text{TNF}\alpha$ , nicht aber allein, verstärkt.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Die drei humanen Kleeblattpeptide (TFF) gehören zu den Akutphase Peptiden. Sie werden vor allem im Verdauungstrakt exprimiert und ihnen wird zum einen eine Schutz- und Heilfunktion des gastrointestinalen Epithels, zum anderen im Fall von TFF1 eine tumorsuppressive Wirkung zugesprochen. Jedoch konnte bis zum heutigen Tag die molekulare Funktionsweise der Kleeblattpeptide nicht geklärt werden. Aufgrund ihrer verdauungstrakt-spezifischen Expression und Wundheilungswirkung, wird ihre Beteiligung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), wie z.B. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, und bei der Genese von Magenkrebs diskutiert.

In der vorliegenden Studie sollte das Zusammenspiel der TFF und der proinflammatorischen Cytokine IL1 $\beta$  und IL6 untersucht werden. In Reporterexperimenten, bei denen Promotorkonstrukte aus ca. 1000bp der 5'-flankierenden Region der *TFF* in verschiedene gastrointestinale Zellen transfiziert wurden, konnte nach anschließender Stimulation mit IL1 $\beta$  und IL6 gezeigt werden, daß diese Cytokine die *TFF* Expression z.T. bis auf 8% herabregulieren. Dieses Ergebnis wurde auf endogener mRNA-Ebene mittels Multiplex- und Realtime-PCR bestätigt.

Weiterhin sollte die Auswirkung der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ -B (unter anderem aktiviert durch IL1 $\beta$ ) und C/EBP $\beta$  (aktiviert durch IL6) auf die *TFF* Transkription studiert werden. Hier konnte in Co-Transfektionsexperimenten beobachtet werden, daß ebenfalls eine Reduktion der *TFF* Expression eintrat.

Es konnte gezeigt werden, daß sowohl die Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ -B und C/EBP $\beta$ , als auch die korrespondierenden Cytokine IL1 $\beta$  und IL6 die *TFF* Expression in gastrointestinalen Zelllinien durch transkriptionelle Repression vermindern. Da diese beiden Cytokine in CED und einigen Magenkarzinomen verstärkt produziert werden, könnte eine reduzierte Expression der gastro- und intestinalprotektiven Kleeblattpeptide wesentlich zur Entwicklung dieser pathologischen Situationen beitragen.

Desweiteren wurde der umgekehrten Fragestellung nachgegangen: besitzen die Kleeblattpeptide immunmodulierende Eigenschaften? Hierfür wurde die promyeloiische Leukämiezelllinie HL-60 und isolierte polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) unter anderem mit rekombinanten TFF2 und TFF3 stimuliert. Bei der granulozytären Linie von HL-60 konnte eine Beteiligung der TFF bei der Cytokin-

## Kapitel 5. Zusammenfassung

---

expression ausgeschlossen werden, bei der monozytären Linie waren die durchweg negativen Ergebnisse, auch die Positivkontrolle erzielt keine Cytokinstimulation, nicht aussagekräftig. Bei den PMN konnte zwar eine Stimulation der Cytokinexpression beobachtet werden, jedoch keine TFF spezifische.

Die vorliegenden Ergebnisse geben Anlaß zur Hypothese, daß es in entzündlichen Situationen (CED, Gastritis, *H. pylori* Infektionen) durch eine verstärkte IL1 $\beta$  und IL6 Expression kausal zu einer reduzierten Sekretion der TFF-”Heil”-peptide kommt, und damit die Krebsentstehung im Magen-Darm-Bereich begünstigt wird.

# Kapitel 6

## Abstract

Trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) are acute phase proteins up-regulated in response to gastrointestinal mucosal damage. They promote cell migration, protect, and heal the mucosa and may function as tumorsuppressors. They are assumed to be regulated by the proinflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL6), which trigger the transcriptional factors NF- $\kappa$ B and C/EBP $\beta$ .

Following IL1 $\beta$  and IL6 stimulation, expression of TFF genes was analyzed in gastrointestinal cell lines by reporter gene assays using TFF promoter constructs and by semi-quantitative multiplex-RT-PCR and quantitative real-time PCR. NF- $\kappa$ B and C/EBP $\beta$  were transiently co-expressed.

In this study, the transcription factors NF- $\kappa$ B and C/EBP $\beta$  were functionally identified to inhibit transcription of human TFF genes. Down-regulation of TFF transcription was also observed by IL1 $\beta$  and IL6, suggesting crosstalk with or in response to the immune system. IL1 $\beta$  and IL6 caused a 3- to 11-fold reduction in TFF mRNA expression, displayed in real-time PCR.

Down-regulation of intestinal trefoil factor TFF3 due to transcriptional repression by IL1 $\beta$  through NF- $\kappa$ B, as well as by IL6 through C/EBP $\beta$  activation *in vitro*, may reflect the situation *in vivo* and may contribute to ulceration and decreased wound healing during inflammatory bowel disease. Additionally, IL1 and IL6 over-expression in chronic gastritis may lead to mucosal damage and gastric carcinogenesis through transcriptional repression of TFF1 and TFF2.

Furthermore, the reversed question has been investigated: are TFF able to act in an immunomodulatory manner? Therefore, the promyelocytic leukemia cell line HL-60 and isolated polymorphonuclear neutrophils (PMN) have been stimulated with recombinant TFF2 and TFF3 peptides and cytokine expression has been determined by multiplex-RT-PCR.

In HL-60 cells differentiated to granulocytes, the involvement of TFF2 and TFF3 in cytokine expression could be answered in the negative. HL-60 cells differentiated to monocytes did not show cytokine induction at all, even when stimulated with PHA as a positive control. PMN stimulated with TFF2 and TFF3 showed induced cytokine expression, however, the effect was not TFF specific. In this study, the question whether TFF act as mediators of the immune response could not be answered unequivocally.



# Literaturverzeichnis

- [Abbas et al., 1996] Abbas, A. K., A. H. Lichtman, and J. S. Pober: 1996. *Immunologie*. Verlag Hans Huber.
- [Al azzeh et al., 2000] Al azzeh, E. D., P. Fegert, N. Blin, and P. Gött: 2000. Transcription factor GATA-6 activates expression of gastroprotective trefoil genes TFF1 and TFF2. *Biochim.Biophys.Acta*, **1490**(3), 324–332.
- [Babyatsky et al., 1996] Babyatsky, M. W., M. deBeaumont, L. Thim, and D. K. Podolsky: 1996. Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats. *Gastroenterology*, **110**(2), 489–497.
- [Ballard et al., 1992] Ballard, D. W., E. P. Dixon, N. J. Pfeffer, H. Bogerd, S. Doerre, B. Stein, and W. C. Greene: 1992. The 65-kDa subunit of human NF-kappa B functions as a potent transcriptional activator and a target for v-Rel-mediated repression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **89**, 1875–1879.
- [Beck et al., 1998] Beck, S., P. Sommer, N. Blin, and P. Gött: 1998. 5'-flanking motifs control cell-specific expression of trefoil factor genes (TFF). *Int.J.Mol.Med.*, **2**(3), 353–361.
- [Beck et al., 1999] Beck, S., P. Sommer, S. E. dos Santos, N. Blin, and P. Gött: 1999. Hepatocyte nuclear factor 3 (winged helix domain) activates trefoil factor gene TFF1 through a binding motif adjacent to the TATA box. *DNA Cell Biol.*, **18**(2), 157–164.
- [Begbie et al., 2000] Begbie, M., C. Notley, S. Tinlin, L. Sawyer, and D. Lillicrap: 2000. The Factor VIII acute phase response requires the participation of NFkappaB and C/EBP. *Thromb.Haemost.*, **84**(2), 216–222.
- [Bocker et al., 1997] Bocker, W., T. Decker, M. Ruhnke, and E. Schneider: 1997. Ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ. Definition– classification–differential diagnosis. *Pathologe*, **18**, 3–18.
- [Bonkhoff et al., 1995] Bonkhoff, H., U. Stein, C. Welter, and K. Remberger: 1995. Differential expression of the pS2 protein in the human prostate and prostate cancer: association with premalignant changes and neuroendocrine differentiation. *Hum.Pathol.*, **26**, 824–828.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [Brown et al., 1984] Brown, A. M., J. M. Jeltsch, M. Roberts, and P. Chambon: 1984. Activation of pS2 gene transcription is a primary response to estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **81**(20), 6344–8.
- [Brynskov et al., 1994] Brynskov, J., O. H. Nielsen, I. Ahnfelt-Ronne, and K. Bendtzen: 1994. Cytokines (immunoinflammatory hormones) and their natural regulation in inflammatory bowel disease (Crohn's disease and ulcerative colitis): a review. *Dig.Dis.*, **12**(5), 290–304.
- [Calnan et al., 1999] Calnan, D. P., B. R. Westley, F. E. May, D. N. Floyd, T. Marchbank, and R. J. Playford: 1999. The trefoil peptide TFF1 inhibits the growth of the human gastric adenocarcinoma cell line AGS. *J.Pathol.*, **188**, 312–317.
- [Carneiro, 1997] Carneiro, F.: 1997. Classification of gastric carcinomas. *Current Diagnostic Pathol.*, **4**, 51–59.
- [Carr et al., 1994] Carr, M. D., C. J. Bauer, M. J. Gradwell, and J. Feeney: 1994. Solution structure of a trefoil-motif-containing cell growth factor, porcine spasmodic protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **91**(6), 2206–10.
- [Cattan et al., 2000] Cattan, D., C. Notarnicola, N. Molinari, and I. Touitou: 2000. Inflammatory bowel disease in non-Ashkenazi Jews with familial Mediterranean fever. *Lancet*, **355**, 378–379.
- [Chadwick et al., 1995] Chadwick, M. P., F. E. May, and B. R. Westley: 1995. Production and comparison of mature single-domain 'trefoil' peptides pNR-2/pS2 Cys58 and pNR-2/pS2 Ser58. *Biochem.J.*, **308** ( Pt 3), 1001–7.
- [Chadwick et al., 1997] Chadwick, M. P., B. R. Westley, and F. E. May: 1997. Homodimerization and hetero-oligomerization of the single-domain trefoil protein pNR-2/pS2 through cysteine 58. *Biochem.J.*, **327** ( Pt 1), 117–23.
- [Chinery et al., 1995] Chinery, R., P. A. Bates, A. De, and P. S. Freemont: 1995. Characterisation of the single copy trefoil peptides intestinal trefoil factor and pS2 and their ability to form covalent dimers. *FEBS Lett.*, **357**(1), 50–4.
- [Chinery and Cox, 1995] Chinery, R. and H. M. Cox: 1995. Modulation of epidermal growth factor effects on epithelial ion transport by intestinal trefoil factor. *Br.J. Pharmacol.*, **115**(1), 77–80.
- [Chinery and Playford, 1995] Chinery, R. and R. J. Playford: 1995. Combined intestinal trefoil factor and epidermal growth factor is prophylactic against indomethacin-induced gastric damage in the rat. *Clin.Sci.(Lond.)*, **88**(4), 401–3.
- [Chinery et al., 1996] Chinery, R., R. Poulson, and H. M. Cox: 1996. The gene encoding mouse intestinal trefoil factor: structural organization, partial sequence analysis and mapping to murine chromosome 17q. *Gene*, **171**(2), 249–53.

- [Collins, 1987] Collins, S. J.: 1987. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood*, **70**(5), 1233–1244.
- [Consortium, 2001] Consortium, I. I. G.: 2001. International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn's disease and chromosome 16. *Am.J.Hum.Genet.*, **68**, 1165–1171.
- [Cook et al., 1999] Cook, G. A., M. Familiari, L. Thim, and A. S. Giraud: 1999. The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *FEBS Lett.*, **456**(1), 155–159.
- [Cook et al., 1998] Cook, G. A., L. Thim, N. D. Yeomans, and A. S. Giraud: 1998. Oral human spasmolytic polypeptide protects against aspirin-induced gastric injury in rats. *J.Gastroenterol.Hepatol.*, **13**(4), 363–70.
- [Cook et al., 1997] Cook, G. A., N. D. Yeomans, and A. S. Giraud: 1997. Temporal expression of trefoil peptides in the TGF-alpha knockout mouse after gastric ulceration. *Am.J.Physiol.*, **272**(6 Pt 1), G1540–9.
- [Correa, 1992] Correa, P.: 1992. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. *Cancer Res.*, **52**, 6735–6740.
- [Dante et al., 1994] Dante, R., S. Ribieras, S. Baldassini, V. Martin, O. Benzerara, C. Bouteille, A. Bremond, L. Frappart, M. C. Rio, and Y. Lasne: 1994. Expression of an estrogen-induced breast cancer-associated protein (pS2) in benign and malignant human ovarian cysts. *Lab.Invest.*, **71**(2), 188–92.
- [Desilets et al., 2000] Desilets, A., I. Gheorghiu, S. J. Yu, E. G. Seidman, and C. Asselin: 2000. Inhibition by deacetylase inhibitors of IL-1-dependent induction of haptoglobin involves CCAAT/Enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **276**(2), 673–679.
- [Dignass et al., 1994] Dignass, A., K. Lynch-Devaney, H. Kindon, L. Thim, and D. K. Podolsky: 1994. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J.Clin.Invest.*, **94**(1), 376–383.
- [dos Santos et al., 2000] dos Santos, S. E., M. Ulrich, G. Döring, K. Botzenhart, and P. Gött: 2000. Trefoil factor family domain peptides in the human respiratory tract. *J.Pathol.*, **190**(2), 133–142.
- [Efstathiou et al., 1999] Efstathiou, J. A., D. Liu, J. M. Wheeler, H. C. Kim, N. E. Beck, M. Ilyas, A. J. Karayiannakis, N. J. Mortensen, W. Kmiot, R. J. Playford, M. Pignatelli, and W. F. Bodmer: 1999. Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **96**(5), 2316–2321.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [Efstathiou et al., 1998] Efstathiou, J. A., M. Noda, A. Rowan, C. Dixon, R. Chinery, A. Jawhari, T. Hattori, N. A. Wright, W. F. Bodmer, and M. Pignatelli: 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.
- [El Omar et al., 2000] El Omar, E. M., M. Carrington, W. H. Chow, K. E. McColl, J. H. Bream, H. A. Young, J. Herrera, J. Lissowska, C. C. Yuan, N. Rothman, G. Lanyon, M. Martin, J. F. Fraumeni, Jr., and C. S. Rabkin: 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, **404**(6776), 398–402.
- [Familarì et al., 1998] Familarì, M., G. A. Cook, D. R. Taupin, G. Marryatt, N. D. Yeomans, and A. S. Giraud: 1998. Trefoil peptides are early markers of gastrointestinal maturation in the rat. *Int.J.Dev.Biol.*, **42**(6), 783–789.
- [Fantuzzi and Dinarello, 1996] Fantuzzi, G. and C. A. Dinarello: 1996. The inflammatory response in interleukin-1 beta-deficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. *J.Leukoc.Biol.*, **59**(4), 489–493.
- [Farrell et al., 2002] Farrell, J. J., D. Taupin, T. J. Koh, D. Chen, C. M. Zhao, D. K. Podolsky, and T. C. Wang: 2002. TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury. *J.Clin.Invest.*, **109**(2), 193–204.
- [Fattori et al., 1994] Fattori, E., M. Cappelletti, P. Costa, C. Sellitto, L. Cantoni, M. Carelli, R. Faggioni, G. Fantuzzi, P. Ghezzi, and V. Poli: 1994. Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J.Exp.Med.*, **180**(4), 1243–1250.
- [Fontaine et al., 2000] Fontaine, V., E. van der Meijden, J. de Graaf, J. ter Schegget, and L. Struyk: 2000. A functional NF-kappaB binding site in the human papillomavirus type 16 long control region. *Virology*, **272**(1), 40–49.
- [Gajhede et al., 1993] Gajhede, M., T. N. Petersen, A. Henriksen, J. F. Petersen, Z. Dauter, K. S. Wilson, and L. Thim: 1993. Pancreatic spasmodic polypeptide: first three-dimensional structure of a member of the mammalian trefoil family of peptides. *Structure*, **1**(4), 253–62.
- [Gao et al., 1998] Gao, X., T. Sedgwick, Y.-B. Shi, and T. Evans: 1998. Distinct functions are implicated for the GATA-4, -5, and -6 transcription factors in the regulation of intestine epithelial cell differentiation. *Mol.Cell.Biol.*, **18**, 2901–2911.
- [Gemsa et al., 1991] Gemsa, D., R. J. Kalden, and K. Resch: 1991. *Immunologie*. Georg Thieme Verlag.

- [Ghosh et al., 1998] Ghosh, S., M. J. May, and E. B. Kopp: 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.*, **16**, 225–260.
- [Gött et al., 1996] Gött, P., S. Beck, J. C. Machado, F. Carneiro, H. Schmitt, and N. Blin: 1996. Human trefoil peptides: genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression. *Eur.J.Hum.Genet.*, **4**(6), 308–315.
- [Gött et al., 1999] Gött, P., E. D. S. Silva, T. Kayademir, F. Regateiro, T. Dobosz, and N. Blin: 1999. Tumor-associated trefoil peptides exert their protective function in premalignant conditions. *Nowotwory*, **49**, 308–31526–29.
- [Graness et al., 2002] Graness, A., C. E. Chwieralski, D. Reinhold, L. Thim, and W. Hoffmann: 2002. PKC and ERK activation are required for TFF-peptide-stimulated bronchial epithelial migration and TNF- $\alpha$ -induced IL-6 and IL-8 secretion. *J.Biol.Chem.*, **277**(21), 18440–18446.
- [Grenier et al., 1999] Grenier, A., M. Dehoux, A. Boutten, M. Arce-Vicioso, G. Durand, M. A. Gougerot-Pocidalo, and S. Chollet-Martin: 1999. Oncostatin M production and regulation by human polymorphonuclear neutrophils. *Blood*, **93**(4), 1413–1421.
- [Gross et al., 1991] Gross, V., H. G. Jeser, M. Ruth, and J. Scholmerich: 1991. Inflammatory mediators in chronic inflammatory bowel diseases (IBD) of unknown etiology. *Klin.Wochenschr.*, **69**, 981.
- [Hanby et al., 1994] Hanby, A. M., J. A. Jankowski, G. Elia, R. Poulsom, and N. A. Wright: 1994. Expression of the trefoil peptides pS2 and human spasmolytic polypeptide (hSP) in barrett's metaplasia and the native oesophageal epithelium: delineation of epithelial phenotype. *J.Pathol.*, **173**(3), 213–9.
- [Hanby et al., 1998] Hanby, A. M., P. McKee, M. Jeffery, W. Grayson, E. Dublin, R. Poulsom, and B. Maguire: 1998. Primary mucinous carcinomas of the skin express TFF1, TFF3, estrogen receptor, and progesterone receptors. *Am.J.Surg.Pathol.*, **22**(9), 1125–31.
- [Hanby et al., 1997] Hanby, A. M., M. Pera, I. Filipe, A. Duranceau, N. A. Wright, M. Pera, L. Grande, and R. Poulsom: 1997. Duodenal content reflux esophagitis in the rat: an animal model for the ulcer-associated cell lineage (UACL)? *Am.J.Pathol.*, **151**(6), 1819–24.
- [Hanby et al., 1993] Hanby, A. M., R. Poulsom, S. Singh, G. Elia, R. E. Jeffery, and N. A. Wright: 1993. Spasmolytic polypeptide is a major antral peptide: distribution of the trefoil peptides human spasmolytic polypeptide and pS2 in the stomach. *Gastroenterology*, **105**(4), 1110–6.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [Hauser and Hoffmann, 1991] Hauser, F. and W. Hoffmann: 1991. xP1 and xP4. P-domain peptides expressed in *Xenopus laevis* stomach mucosa. *J.Biol.Chem.*, **266**, 21306–21309.
- [Hauser et al., 1993] Hauser, F., R. Poulson, R. Chinery, L. A. Rogers, A. M. Hanby, N. A. Wright, and W. Hoffmann: 1993. hP1.B, a human P-domain peptide homologous with rat intestinal trefoil factor, is expressed also in the ulcer-associated cell lineage and the uterus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **90**(15), 6961–6965.
- [Henry et al., 1991] Henry, J. A., M. K. Bennett, N. H. Piggott, D. L. Levett, F. E. May, and B. R. Westley: 1991. Expression of the pNR-2/pS2 protein in diverse human epithelial tumours. *Br.J.Cancer*, **64**(4), 677–82.
- [Itoh et al., 1996] Itoh, H., M. Tomita, H. Uchino, T. Kobayashi, H. Kataoka, R. Sekiya, and Y. Nawa: 1996. cDNA cloning of rat pS2 peptide and expression of trefoil peptides in acetic acid-induced colitis. *Biochem.J.*, **318**(Pt 3), 939–944.
- [Jablonska et al., 1999] Jablonska, E., J. Jablonski, and A. Holownia: 1999. Role of neutrophils in release of some cytokines and their soluble receptors. *Immunol. Letters*, **70**, 191–197.
- [Jakowlew et al., 1984] Jakowlew, S. B., R. Breathnach, J. M. Jeltsch, P. Masiakowski, and P. Chambon: 1984. Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2861–2878.
- [Janeway and Travers, 1997] Janeway, C. A. and P. Travers: 1997. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- [Jobin and Sartor, 2000] Jobin, C. and R. B. Sartor: 2000. The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **278**(3), C451–C462.
- [Jorgensen et al., 1982a] Jorgensen, K. H., B. Diamant, K. H. Jorgensen, and L. Thim: 1982a. Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): III. pharmacology of a new porcine pancreatic polypeptide with spasmolytic and gastric acid secretion inhibitory effects. *Reg.Peptides* 231–243.
- [Jorgensen et al., 1982b] Jorgensen, K. H., L. Thim, and H. E. Jacobsen: 1982b. Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): I. preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Reg.Peptides* 207–219.
- [Kaiser et al., 1999] Kaiser, G. C., F. Yan, and D. B. Polk: 1999. Mesalamine blocks tumor necrosis factor growth inhibition and nuclear factor kappaB activation in mouse colonocytes. *Gastroenterology*, **116**(3), 602–609.

- [Kayademir et al., 2000] Kayademir, T., I. Rosewell, N. Blin, and P. Gött: 2000. Genomic structure of the mouse trefoil factor (Tff) gene cluster in 17q. *GeneScreen I* 15–19.
- [Kayademir et al., 1998] Kayademir, T., E. Silva, C. Pusch, S. Beck, J. C. Machado, and P. Gött: 1998. A novel 25 bp tandem repeat within the human trefoil peptide gene TFF2 in 21q22.3: polymorphism and mammalian evolution. *Eur.J.Hum.Genet.*, **6**(2), 121–128.
- [Kindon et al., 1995] Kindon, H., C. Pothoulakis, L. Thim, K. Lynch-Devaney, and D. K. Podolsky: 1995. Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology*, **109**(2), 516–523.
- [Knudson, 1996] Knudson, A. G.: 1996. Hereditary cancer: two hits revisited. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, **122**(3), 135–140.
- [Konturek et al., 1998] Konturek, P. C., T. Brzozowski, P. Pierzchalski, S. Kwieci-en, R. Pajdo, E. G. Hahn, and S. J. Konturek: 1998. Activation of genes for spasmolytic peptide, transforming growth factor alpha and for cyclooxygenase (COX)-1 and (COX)-2 during gastric adaptation to aspirin damage in rats. *Aliment.Pharmacol.Ther.*, **12**, 767–777.
- [Labouvie et al., 1999] Labouvie, C., J.-C. Machado, F. Carneiro, M. Sarbia, M. Vieth, R. Porschen, and N. Blin: 1999. Differential expression of mucins and trefoil peptides in native epithelium, Barretts metaplasia and squamous cell carcinoma of the oesophagus. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, **125**, 71–76.
- [Labouvie et al., 1997] Labouvie, C., J.-C. Machado, F. Carneiro, G. Seitz, and N. Blin: 1997. Expression pattern of gastrointestinal markers in native colorectal epithelium, lesions and carcinoma. *Oncology Reports*, **4**, 1367–1371.
- [Lacy et al., 1993] Lacy, E. R., G. P. Morris, and M. M. Cohen: 1993. Rapid repair of the surface epithelium in human gastric mucosa after acute superficial injury. *J.Clin.Gastroenterol.*, **17**(Suppl. 1), S125–S135.
- [Lawrance et al., 2001] Lawrance, I. C., C. Fiocchi, and S. Chakravarti: 2001. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum.Molec.Genet.*, **10**, 445–456.
- [Lefebvre et al., 1996] Lefebvre, O., M. P. Chenard, R. Masson, J. Linares, A. Dierich, M. LeMeur, C. Wendling, C. Tomasetto, P. Chambon, and M. C. Rio: 1996. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science*, **274**(5285), 259–262.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [Lefebvre et al., 1993] Lefebvre, O., C. Wolf, M. Kedinger, M. P. Chenard, C. Tomasetto, P. Chambon, and M. C. Rio: 1993. The mouse one P-domain (pS2) and two P-domain (mSP) genes exhibit distinct pattern of expression. *J.Cell.Biol.*, **122**, 191–198.
- [Lipponen and Eskelinen, 1994] Lipponen, P. K. and M. J. Eskelinen: 1994. Expression of pS2 protein in transitional cell bladder tumours. *J.Pathol.*, **173**, 327–332.
- [Liu et al., 1997] Liu, D., I. el Hariry, A. J. Karayiannakis, J. Wilding, R. Chinery, W. Kmiot, P. D. McCrea, W. J. Gullick, and M. Pignatelli: 1997. Phosphorylation of beta-catenin and epidermal growth factor receptor by intestinal trefoil factor. *Lab.Invest.*, **77**(6), 557–563.
- [Lüdeking et al., 1998] Lüdeking, A., P. Fegert, N. Blin, and P. Gött: 1998. Osmotic changes and ethanol modify gene expression in gastrointestinal cell lines. *FEBS Lett.*, **439**(1-2), 180–184.
- [Luqmani et al., 1989] Luqmani, Y., C. Bennett, I. Paterson, C. M. Corbishley, M. C. Rio, P. Chambon, and G. Ryall: 1989. Expression of the pS2 gene in normal, benign and neoplastic human stomach. *Int.J.Cancer*, **44**, 806–812.
- [Machado et al., 1996] Machado, J. C., F. Carneiro, N. Blin, and M. Sobrinho-Simões: 1996. Pattern of pS2 protein expression in premalignant and malignant lesions of gastric mucosa. *Eur.J.Cancer Prev.*, **5**, 169–179.
- [Mahida et al., 1989] Mahida, Y. R., K. Wu, and D. P. Jewell: 1989. Enhanced production of IL-1 $\beta$  by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis or Crohn's disease. *Gut*, **30**, 835.
- [Marchbank et al., 2001] Marchbank, T., H. M. Cox, R. A. Goodlad, A. S. Giraud, S. F. Moss, R. Poulson, N. A. Wright, J. Jankowski, and R. J. Playford: 2001. Effect of ectopic expression of rat trefoil factor family 3 (intestinal trefoil factor) in the jejunum of transgenic mice. *J.Biol.Chem.*, **276**(26), 24088–24096.
- [Mashimo et al., 1996] Mashimo, H., D. C. Wu, D. K. Podolsky, and M. C. Fishman: 1996. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science*, **274**(5285), 262–265.
- [Masiakowski et al., 1982] Masiakowski, P., R. Breathnach, J. Bloch, F. Gannon, A. Krust, and P. Chambon: 1982. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res.*, **10**, 7895–7903.
- [May and Westley, 1997] May, F. E. B. and B. R. Westley: 1997. Expression of human intestinal trefoil factor in malignant cells and its regulation by oestrogen in breast cancer cells. *J.Pathol.*, **182**, 404–413.

- [Mori et al., 1988] Mori, K., R. Fujii, N. Kida, M. Ohta, and K. Hayashi: 1988. Identification of a polypeptide secreted by human breast cancer cells (MCF-7) as the humal estrogen-responsive gene (pS2) product. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **155**, 366–372.
- [Muller and Borchard, 1993] Muller, W. and F. Borchard: 1993. pS2 protein in gastric carcinoma and normal gastric mucosa: association with clinicopathological parameters and patient survival. *J.Pathol.*, **171**, 263–269.
- [Nogueira et al., 1999] Nogueira, A. M. M. F., J.-C. Machado, F. Carneiro, C. A. Reis, P. Gött, and M. Sobrinho-Simoes: 1999. Patterns of expression of trefoil peptides and mucins in gastric polyps with and without malignant transformation. *J.Pathol.*, **187**, 541–548.
- [Nunez et al., 1989] Nunez, A. M., M. Berry, J. L. Imler, and P. Chambon: 1989. The 5' flanking region of the pS2 gene contains a comple enhancer region responsiva to oestrogens, epidermal growth factor, a tumour promoter (TPA), the c-H-ras oncoprotein and the c-jun protein. *EMBO.J.*, **8**, 823–829.
- [Otto and Patel, 1999] Otto, W. R. and K. Patel: 1999. Trefoil factor family (TFF)-domain peptides in the mouse: embryonic gastrointestinal expression and wounding response. *Anat.Embryol.(Berl)*, **199**(6), 499–508.
- [Otto and Wright, 1994] Otto, W. R. and N. Wright: 1994. Trefoil peptides. Coming up clover. *Curr.Biol.*, **4**, 835–838.
- [Panja et al., 1998] Panja, A., S. Goldberg, L. Eckmann, P. Krishen, and L. Mayer: 1998. The regulation and functional consequence of proinflammatory cytokine binding on human intestinal epithelial cells. *J.Immunol.*, **161**(7), 3675–3684.
- [Park et al., 2000a] Park, W. S., R. R. Oh, J. Y. Park, J. H. Lee, M. S. Shin, H. S. Kim, H. K. Lee, Y. S. Kim, S. Y. Kim, S. H. Lee, N. J. Yoo, and J. Y. Lee: 2000a. Somatic mutations of the trefoil factor family 1 gene in gastric cancer. *Gastroenterology*, **119**, 691–698.
- [Park et al., 2000b] Park, W. S., R. R. Oh, J. Y. Park, N. J. Yoo, S. H. Lee, M. S. Shin, S. Y. Kim, Y. S. Kim, J. H. Lee, H. S. Kim, W. G. An, and J. Y. Lee: 2000b. Mapping of a new target region of allelic loss at 21q22 in primary gastric cancers. *Cancer Lett.*, **159**, 15–21.
- [Pei and Shih, 1990] Pei, D. Q. and C. H. Shih: 1990. Transcriptional activation and repression by cellular DNA-binding protein C/EBP. *J.Virol.*, **64**, 1517–1522.
- [Piggott et al., 1991] Piggott, N. H., J. A. Henry, F. E. May, and B. R. Westley: 1991. Antipeptide antibodies against the pNR-2 oestrogen-regulated protein of human breast cancer cells and detection of pNR-2 expression in normal tissues by immunohistochemistry. *J.Pathol.*, **163**, 95–104.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [Pignatelli, 1996] Pignatelli, M.: 1996. Modulation of cell adhesion during epithelial restitution in the gastrointestinal tract. *Yale J.Biol.Med.*, **69**, 131–135.
- [Playford et al., 1995] Playford, R. J., T. Marchbank, R. Chinery, R. Evison, M. Pignatelli, R. A. Boulton, L. Thim, and A. M. Hanby: 1995. Human spasmolytic polypeptide is a cytoprotective agent that stimulates cell migration. *Gastroenterology*, **108**(1), 108–116.
- [Playford et al., 1996] Playford, R. J., T. Marchbank, R. A. Goodlad, R. A. Chinery, R. Poulson, and A. M. Hanby: 1996. Transgenic mice that overexpress the human trefoil peptide pS2 have an increased resistance to intestinal damage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **93**(5), 2137–2142.
- [Podolsky et al., 1993] Podolsky, D. K., K. Lynch-Devaney, J. L. Stow, P. Oates, B. Murgue, M. deBeaumont, B. E. Sands, and Y. R. Mahida: 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.
- [Polshakov et al., 1994] Polshakov, V. I., M. A. Williams, A. R. Gargaro, T. A. Frenkiel, B. R. Westley, M. P. Chadwick, F. E. B. May, and J. Feeney: 1994. High-resolution solution structure of human pNR-2/pS2: A single trefoil motif protein. *J.Mol.Biol.*, **267**, 418–432.
- [Poulsen et al., 1998] Poulsen, S. S., J. Thulesen, E. Nexø, and L. Thim: 1998. Distribution and metabolism of intravenously administered trefoil factor 2 porcine spasmolytic polypeptide in the rat. *Gut*, **43**, 240–247.
- [Poulson et al., 1996] Poulson, R., D. E. Begos, and I. M. Modlin: 1996. Molecular aspects of restitution: Functions of trefoil peptides. *Yale J.Biol.Med.*, **69**, 137–146.
- [Poulson et al., 1992] Poulson, R., R. Chinery, C. Sarraf, E. N. Lalani, G. Stamp, G. Elia, and N. Wright: 1992. Trefoil peptide expression in intestinal adaptation and renewal. *Scand.J.Gastroenterol.Suppl.*, **192**, 17–28.
- [Poulson et al., 1997] Poulson, R., A. M. Hanby, E. N. Lalani, F. Hauser, W. Hoffmann, and G. W. H. Stamp: 1997. Intestinal trefoil factor (TFF3) and pS2 (TFF2), but not spasmolytic polypeptide (TFF2) mRNAs are co-expressed in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast epithelium. *J.Pathol.*, **183**, 30–38.
- [Pullman et al., 1992] Pullman, W. E., S. Elsbury, M. Kobayashi, A. J. Hapel, and W. F. Doe: 1992. Enhanced mucosal cytokine production in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, **102**, 529.
- [Racca et al., 1995] Racca, S., G. Conti, F. Pietribiasi, D. Stramignoni, M. Tampellini, M. R. Valetto, F. Ghezzi, and F. D. Carlo: 1995. Correlation between pS2 protein positivity, steroid receptor status and other prognostic factors in breast cancer. *Int.J.Markers*, **10**, 87–93.

- [Rask et al., 2000] Rask, K., M. Thorn, F. Ponten, W. Kraaz, K. Sundfeldt, L. Hedin, and S. Enerback: 2000. Increased expression of the transcription factors CCAAT-enhancer binding protein-beta (C/EBbeta) and C/EBzeta (CHOP) correlate with invasiveness of human colorectal cancer. *Int.J.Cancer*, **86**(3), 337–343.
- [Reimund et al., 1996] Reimund, J. M., C. Wittersheim, S. Dumont, C. D. Muller, J. S. Kenney, R. Baumann, P. Poindron, and B. Duclos: 1996. Increased production of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut*, **39**(5), 684–689.
- [Rio et al., 1988] Rio, M. C., J. P. Bellocq, J. Y. Daniel, C. Tomasetto, R. Lathe, M. P. Chenard, A. Batzenschlager, and P. Chambon: 1988. Breast cancer-associated pS2 protein: synthesis and secretion by normal stomach mucosa. *Science*, **241**(4866), 705–708.
- [Rio and Chambon, 1990] Rio, M. C. and P. Chambon: 1990. The pS2 gene, mRNA, and protein: a potential marker for human breast cancer. *Cancer Cells*, **2**, 269–274.
- [Rio et al., 1991] Rio, M. C., M. P. Chenard, C. Wolf, L. Marcellin, C. Tomasetto, R. Lathe, J. P. Bellocq, and P. Chambon: 1991. Induction of pS2 and hSP genes as markers of mucosal ulceration of the digestive tract. *Gastroenterology*, **100**(2), 375–379.
- [Sands and Podolsky, 1996] Sands, B. E. and D. K. Podolsky: 1996. The trefoil peptide family. *Annu.Rev.Physiol*, **58**, 253–273.
- [Sartor, 1997] Sartor, R. B.: 1997. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am.J.Gastroenterol.*, **92**(12 Suppl), 5S–11S.
- [Schmid and Adler, 2000] Schmid, R. M. and G. Adler: 2000. NF-kappaB/rel/IkappaB: implications in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology*, **118**(6), 1208–1228.
- [Schmitt et al., 1996] Schmitt, H., I. Wundrack, S. Beck, P. Gött, C. Welter, H. Shizuya, M. Simon, and N. Blin: 1996. A third P-domain peptide gene, human intestinal trefoil factor (TFF3), maps to 21q22.3. *Cytogenet.Cell Genet.*, **72**, 299–302.
- [Segain et al., 2000] Segain, J. P., de la Bletiere. Raingeard, A. Bourreille, V. Leray, N. Gervois, C. Rosales, L. Ferrier, C. Bonnet, H. M. Blottiere, and J. P. Galmiche: 2000. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, **47**(3), 397–403.
- [Seib et al., 1997] Seib, T., N. Blin, K. Hilgert, M. Seifert, B. Theisinger, M. Engel, S. Dooley, K. D. Zang, and C. Welter: 1997. The three human trefoil genes TFF1, TFF2, and TFF3 are located within a region of 55kb on chromosome 21q22.3. *Genomics*, **40**, 200–202.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [Seib et al., 1995] Seib, T., S. Dooley, and C. Welter: 1995. Characterization of the genomic structure and the promoter region of the human intestinal trefoil factor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **214**, 195–199.
- [Seitz et al., 1991] Seitz, G., B. Theisinger, G. Tomasetto, M. C. Rio, P. Chambon, N. Blin, and G. Welter: 1991. Breast cancer-associated protein pS2 expression in tumors of the biliarytract. *Am.J.Gastroenterol.*, **86**, 1491–1494.
- [Solcia et al., 1996] Solcia, E., R. Fiocca, O. Luinetti, L. Villani, L. Padovan, D. Calistri, G. N. Ranzani, A. Chiaravalli, and C. Capella: 1996. Intestinal and diffus gastric cancers arise in a different background of Helicobacter pylori gastritis through different gene involvement. *Am.J.Surg.Pathol.*, **20 Suppl. 1**, S8–22.
- [Stein et al., 1993] Stein, B., P. C. Cogswell, and A. S. Baldwin, Jr.: 1993. Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol.Cell Biol.*, **13**(7), 3964–3974.
- [Stevens et al., 1992] Stevens, C., G. Waiz, B. Zanker, C. Singaram, M. Lipman, and T. B. Strom: 1992. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  and interleukin 6 expression in inflammatory bowel disease (IBD). *Dig.Dis.Sci.*, **37**, 818.
- [Suemori et al., 1991] Suemori, S., K. Lynch-Devaney, and D. K. Podolsky: 1991. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: ti. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **88**, 11017–11021.
- [Supakar et al., 1995] Supakar, P. C., M. H. Jung, C. S. Song, B. Chatterjee, and A. K. Roy: 1995. Nuclear factor kappa B functions as a negative regulator for the rat androgen receptor gene and NF-kappa B activity increases during the age- dependent desensitization of the liver. *J.Biol.Chem.*, **270**(2), 837–842.
- [Tan et al., 1997] Tan, X. D., W. Hsueh, H. Chang, K. R. Wei, and F. Gonzalez-Crussi: 1997. Characterization of a putative receptor for intestinal trefoil factor in rat small intestine: Identification by *in situ* binding and ligand blotting. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **237**, 673–677.
- [Taupin et al., 1996] Taupin, D., K. Ooi, N. Yeomans, and A. Giraud: 1996. Conserved expression of intestinal trefoil factor in the human colonic adenoma-carcinoma sequence. *Lab.Invest.*, **75**, 25–32.
- [Taupin et al., 1999] Taupin, D., D. C. Wu, W. K. Jeon, K. Devaney, T. C. Wang, and D. K. Podolsky: 1999. The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF rece. *J.Clin.Invest*, **103**(9), R31–R38.
- [Taupin et al., 2000] Taupin, D. R., K. Kinoshita, and D. K. Podolsky: 2000. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **97**(2), 799–804.

- [Theisinger et al., 1996] Theisinger, B., G. Seitz, S. Dooley, and C. Welter: 1996. A second trefoil protein, ITH/hP1.B, is transcribed in human breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.*, **38**, 145–151.
- [Theisinger et al., 1992] Theisinger, B., C. Welter, K. H. Grzeschik, and N. Blin: 1992. Assignment of the gene for human spasmolytic protein (hSP/SML1) to chromosome 21. *Hum.Genet.*, **89**, 681–682.
- [Theisinger et al., 1991] Theisinger, B., C. Welter, G. Seitz, M. C. Rio, R. Lathe, P. Chambon, and N. Blin: 1991. Expression of the breast cancer associated gene pS2 and the pancreatic spasmolytic polypeptide gene (hSP) in diffuse type of stomach carcinoma. *Eur.J.Cancer*, **27**, 770–773.
- [Thim, 1989] Thim, L.: 1989. A new family of growth factor-like peptides. Trefoil disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS1), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett.*, **250**, 85–90.
- [Thim, 1997] Thim, L.: 1997. Trefoil peptides: from structure to function. *Cell Mol.Life Sci.*, **53**(11-12), 888–903.
- [Thim et al., 1995] Thim, L., H. F. Woldike, P. F. Nielsen, M. Christensen, K. L. Devaney, and D. K. Podolsky: 1995. Characterization of human and rat intestinal trefoil factor produced in yeast. *Biochemistry*, **34**, 4757–4764.
- [Tomasetto et al., 2000] Tomasetto, C., R. Masson, J. L. Linares, C. Wendling, O. Lefebvre, M. P. Chenard, and M. C. Rio: 2000. pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins. *Gastroenterology*, **118**(1), 70–80.
- [Tomasetto et al., 1990] Tomasetto, C., M. C. Rio, C. Gautier, C. Wolf, M. Hareuveni, P. Chambon, and R. Lathe: 1990. hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *EMBO J.*, **9**(2), 407–414.
- [Tomasetto et al., 1992] Tomasetto, C., N. Rockel, M. G. Mattei, R. Fujita, and M. C. Rio: 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.
- [Tran et al., 1999] Tran, C. P., G. A. Cook, N. D. Yeomans, L. Thim, and A. S. Giraud: 1999. Trefoil peptide TFF2 (spasmolytic polypeptide) potently accelerates healing and reduces inflammation in a rat model of colitis. *Gut*, **44**(5), 636–642.
- [Uchino et al., 2000] Uchino, H., H. Kataoka, H. Itoh, R. Hamasuna, and M. Kono: 2000. Overexpression of intestinal trefoil factor in human colon carcinoma cells reduces cellular growth in vitro and in vivo. *Gastroenterology*, **118**, 60–69.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [Uchino et al., 1997] Uchino, H., H. Kataoka, H. Itoh, and M. Kono: 1997. Expression of intestinal trefoil factor mRNA is downregulated during progression of colorectal carcinomas. *J.Clin.Pathol.*, **50**, 932–934.
- [Vinson et al., 1989] Vinson, C. R., P. B. Sigler, and S. L. McKnight: 1989. Scissors-grip model for recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*, **246**(4932), 911–916.
- [Welter et al., 1994] Welter, C., B. Theisinger, M. C. Rio, G. Seitz, G. Schuder, and N. Blin: 1994. Expression pattern of breast-cancer-associated protein pS2/BCE1 in colorectal tumors. *Int.J.Cancer*, **56**, 52–55.
- [Welter et al., 1992] Welter, C., B. Theisinger, G. Seitz, C. Tomasetto, M. C. Rio, P. Chambon, and N. Blin: 1992. Association of the human spasmolytic polypeptide and an estrogen-induced breast cancer protein (pS2) with human pancreatic carcinoma. *Lab.Invest.*, **66**, 187–192.
- [Wiede et al., 1999] Wiede, A., W. Jagla, T. Welte, T. Kohnlein, H. Busk, and W. Hoffmann: 1999. Localization of TFF3, a new mucus-associated peptide of the human respiratory tract. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.*, **159**(4 Pt 1), 1330–1335.
- [Wissink et al., 1997] Wissink, S., E. C. van Heerde, M. L. Schmitz, E. Kalkhoven, B. B. van der, P. A. Baeuerle, and P. T. van der Saag: 1997. Distinct domains of the RelA NF-kappaB subunit are required for negative cross-talk and direct interaction with the glucocorticoid receptor. *J.Biol.Chem.*, **272**(35), 22278–22284.
- [Woywodt et al., 1999] Woywodt, A., D. Ludwig, P. Neustock, A. Kruse, K. Schwarting, G. JOntschek, H. Kirchner, and E. F. Stange: 1999. Mucosal cytokine expression, cellular markers and adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.*, **11**(3), 267–276.
- [Wright et al., 1990a] Wright, N. A., C. Pike, and G. Elia.: 1990a. Induction of a novel epidermal growth factor secreting cell lineage by mucosal ulceration in human gastrointestinal stem cells. *Nature*, **343**, 82–85.
- [Wright et al., 1993] Wright, N. A., R. Poulson, G. Stamp, S. Van Noorden, C. Sarraf, G. Elia, D. Ahnen, R. Jeffery, J. Longcroft, and C. Pike: 1993. Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, **104**(1), 12–20.
- [Wright et al., 1990b] Wright, N. A., R. Poulson, G. W. Stamp, P. A. Hall, R. E. Jeffery, J. M. Longcroft, M. C. Rio, C. Tomasetto, and P. Chambon: 1990b. Epidermal growth factor (EGF/URO) induces expression of regulatory peptides in damaged human gastrointestinal tissues. *J.Pathol.*, **162**, 279–284.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [Xian et al., 1999] Xian, C. J., G. S. Howarth, C. E. Mardell, J. C. Cool, M. Familiar, L. C. Read, and A. S. Giraud: 1999. Temporal changes in TFF3 expression and jejunal morphology during methotrexate-induced damage and repair. *Am.J.Physiol*, **277**(4 Pt 1), G785–G795.
- [Yamaoka et al., 2001] Yamaoka, Y., T. Kodama, M. Kita, J. Imanishi, K. Kashima, and D. Y. Graham: 2001. Relation between cytokines and *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Helicobacter*, **6**(2), 116–124.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Anatomie des GALT. . . . .	3
1.2	Kleeblattpeptid Gencluster auf Chromosom 21q22.3. . . . .	7
1.3	Sekundärstruktur der drei humanen Kleeblattpeptide. Die Cysteinreste sind durch Disulphidbrücken miteinander verbunden (Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, Cys3-Cys6) ([Thim, 1997]). . . . .	8
2.1	Vektor für Reporterstudien pGL3-Basic. . . . .	22
2.2	Die durch Firefly und Renilla Luziferase katalysierten Biolumineszenzreaktionen. . . . .	25
3.1	Herabregulation der <i>TFF</i> Reporteraktivität durch $IL1\beta$ und $IL6$ in der intestinalen Zelllinie HT-29. Die Werte sind in Prozent der unstimulierten Kontrolle dargestellt. . . . .	34
3.2	Herabregulation der <i>TFF</i> Reporteraktivität durch $IL1\beta$ und $IL6$ in der intestinalen Zelllinie LS 174 T. Die Werte sind in Prozent der unstimulierten Kontrolle dargestellt. . . . .	35
3.3	Herabregulation der <i>TFF</i> Reporteraktivität durch $IL1\beta$ und $IL6$ in der Magenzelllinie KATO III. Die Werte sind in Prozent der unstimulierten Kontrolle dargestellt. . . . .	35
3.4	Herabregulation der <i>TFF</i> Reporteraktivität durch $IL1\beta$ und $IL6$ in der Magenzelllinie MKN-45. Die Werte sind in Prozent der unstimulierten Kontrolle dargestellt. . . . .	36

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

---

- 3.5 (A) Putative NF $\kappa$ -B Bindestellen in der 5'-flankierenden Region der drei *TFF* Gene. Die Bindestellen sind 90% (O) bzw. 80% ( $\Delta$ ) mit der Konsensus NF $\kappa$ -B Bindestelle (GGR(A/T/C)TYYYCC) wie folgt identisch: *TFF1*: 1: GGGGATCCTC; 2: GGGACTTTCT; 3: GGGAGTCTCC; 4: GGGGTTTCCG; 5: AGTGATTCTC; 6: GGGGCTCCCT. *TFF2*: 7: CCGGTTTCC; 8: GGGTCACACC; 9: GGGACTTTTC; 10: GGGGCTGCTC; 11: GGGAATGCTC; 12: GGGAACTTTC; 13: GGGGGTTGCC. *TFF3*: 14: AAGGCTCTCC; 15: GCGGATTCCA; 16: GGGGTGTTCC; 17: GAGCCTTTCC. (B) Putative C/EBP $\beta$  Bindestellen in der 5'-flankierenden Region der drei *TFF* Gene. Die Bindestellen sind 100% (O) bzw. 85% ( $\Delta$ ) mit der Konsensus C/EBP $\beta$  Bindestelle (R(A/G/T/C)NR(A/G/C/T)TK(T/G/A)NNGM(C/A/T)AAK(T/G/C)NN) wie folgt identisch: *TFF1*: 1: TCTTTAAGCAAACA; 2: TCCTTAGGCAAATG; 3: ATGTCTAGGAAACA; 4: AGATTCAGAAAGTC; 5: TAATAATGAAATTG; 6: ACATGGCGAAACCC. *TFF2*: 7: GCATTCTGCAAGCC; 8: GAATTTAGAAAATA; 9: TACTGGG-GAAAATG. *TFF3*: 10: TGCTTGGGGAAGGC; 11: AAATTCT-GAAAGGA. . . . . 38
- 3.6 Herabregulation der *TFF* Reporterexpression nach Co-Transfektion von p50/p65 (NF $\kappa$ -B) und C/EBP $\beta$  in der intestinalen Zelllinie HT-29. Die Kontrolle wurde nur mit den *TFF* Reporterexpressionskonstrukten (ohne NF $\kappa$ -B- und C/EBP $\beta$ -Expressionsvektoren) transfiziert. Die Werte sind in Prozent dieser Kontrolle dargestellt. . . 39
- 3.7 Herabregulation der *TFF* Reporterexpression nach Co-Transfektion von p50/p65 (NF $\kappa$ -B) und C/EBP $\beta$  in der intestinalen Zelllinie LS 174 T. Die Kontrolle wurde nur mit den *TFF* Reporterexpressionskonstrukten (ohne NF $\kappa$ -B- und C/EBP $\beta$ - Expressionsvektoren) transfiziert. Die Werte sind in Prozent dieser Kontrolle dargestellt. . . 39
- 3.8 Herabregulation der *TFF* Reporterexpression nach Co-Transfektion von p50/p65 (NF $\kappa$ -B) und C/EBP $\beta$  in der Magenzelllinie KATO III. Die Kontrolle wurde nur mit den *TFF* Reporterexpressionskonstrukten (ohne NF $\kappa$ -B- und C/EBP $\beta$ - Expressionsvektoren) transfiziert. Die Werte sind in Prozent dieser Kontrolle dargestellt. . . 40
- 3.9 Herabregulation der *TFF* Reporterexpression nach Co-Transfektion von p50/p65 (NF $\kappa$ -B) und C/EBP $\beta$  und anschließender Stimulation mit IL1 $\beta$  und IL6 in der intestinalen Zelllinie HT-29. Die Kontrolle wurde ebenfalls mit NF $\kappa$ -B- und C/EBP $\beta$ -Expressionsvektoren co-transfiziert, aber nicht stimuliert. Die Werte sind in Prozent dieser Kontrolle dargestellt. . . . . 42

3.10 Herabregulation der <i>TFF</i> Reporterexpression nach Co-Transfektion von p50/p65 (NF $\kappa$ -B) und anschließender Stimulation mit IL1 $\beta$ und IL6 in der intestinalen Zelllinie LS 174 T. Die Kontrolle wurde ebenfalls mit dem NF $\kappa$ -B-Expressionsvektor co-transfiziert, aber nicht stimuliert. Die Werte sind in Prozent dieser Kontrolle dargestellt. . . . .	42
3.11 Herabregulation der <i>TFF</i> Reporterexpression nach Co-Transfektion von p50/p65 (NF $\kappa$ -B) und anschließender Stimulation mit IL1 $\beta$ und IL6 in der Magenzelllinie KATO III. Die Kontrolle wurde ebenfalls mit dem NF $\kappa$ -B-Expressionsvektor co-transfiziert, aber nicht stimuliert. Die Werte sind in Prozent dieser Kontrolle dargestellt. . . . .	43
3.12 Endogene <i>TFF</i> Expression nach 48Std Stimulation mit IL6 und anschließender Multiplex-RT-PCR in HT-29. Ungerade Zahlen bezeichnen <i>TFF1</i> , <i>GAPDH</i> und <i>TFF3</i> , gerade <i>TFF1</i> , <i>GAPDH</i> und <i>TFF2</i> Amplifikationen. Die densitometrische Analyse der Bandenintensitäten sind als Verhältnis <i>TFF</i> zu <i>GAPDH</i> dargestellt. K=unstimulierte Kontrolle. . . . .	44
3.13 Endogene <i>TFF</i> Expression nach 48Std Stimulation mit IL6 und anschließender Multiplex-RT-PCR in LS 174 T. Ungerade Zahlen bezeichnen <i>TFF1</i> , <i>GAPDH</i> und <i>TFF3</i> , gerade <i>TFF1</i> , <i>GAPDH</i> und <i>TFF2</i> Amplifikationen. Die densitometrische Analyse der Bandenintensitäten sind als Verhältnis <i>TFF</i> zu <i>GAPDH</i> dargestellt. K=unstimulierte Kontrolle. . . . .	45
3.14 Endogene <i>TFF</i> Expression nach 48Std Stimulation mit IL1 $\beta$ und IL6 und anschließender Multiplex-RT-PCR in KATO III. Ungerade Zahlen bezeichnen <i>TFF1</i> , <i>GAPDH</i> und <i>TFF3</i> , gerade <i>TFF1</i> , <i>GAPDH</i> und <i>TFF2</i> Amplifikationen. Die densitometrische Analyse der Bandenintensitäten sind als Verhältnis <i>TFF</i> zu <i>GAPDH</i> dargestellt. K=unstimulierte Kontrolle. . . . .	46
3.15 Endogene <i>TFF</i> Expression nach Stimulation mit IL1 $\beta$ und anschließender Realtime-PCR bei HT-29. Die Kurvenpunkte zum jeweiligen Zeitpunkt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanzwerte sind mit * bezeichnet: *p>0,1; **0,1<p>0,05; ***p<0,05; ****p<0,01. . . . .	47
3.16 Endogene <i>TFF</i> Expression nach Stimulation mit IL6 und anschließender Realtime-PCR bei HT-29. Die Kurvenpunkte zum jeweiligen Zeitpunkt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanzwerte sind mit * bezeichnet: *p>0,1; **0,1<p>0,05; ***p<0,05; ****p<0,01. . . . .	48

---

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

3.17	Endogene <i>TFF</i> Expression nach Stimulation mit $IL1\beta$ und $IL6$ und anschließender Realtime-PCR bei HT-29. Die Kurvenpunkte zum jeweiligen Zeitpunkt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanzwerte sind mit * bezeichnet: * $p > 0,1$ ; ** $0,1 < p > 0,05$ ; *** $p < 0,05$ ; **** $p < 0,01$ . . . . .	49
3.18	Endogene <i>TFF</i> Expression nach Stimulation mit $IL1\beta$ und anschließender Realtime-PCR bei KATO III. Die Kurvenpunkte zum jeweiligen Zeitpunkt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanzwerte sind mit * bezeichnet: * $p > 0,1$ ; ** $0,1 < p > 0,05$ ; *** $p < 0,05$ ; **** $p < 0,01$ . . . . .	49
3.19	Endogene <i>TFF</i> Expression nach Stimulation mit $IL6$ und anschließender Realtime-PCR bei KATO III. Die Kurvenpunkte zum jeweiligen Zeitpunkt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanzwerte sind mit * bezeichnet: * $p > 0,1$ ; ** $0,1 < p > 0,05$ ; *** $p < 0,05$ ; **** $p < 0,01$ . . . . .	50
3.20	Endogene <i>TFF</i> Expression nach Stimulation mit $IL1\beta$ und $IL6$ und anschließender Realtime-PCR bei KATO III. Die Kurvenpunkte zum jeweiligen Zeitpunkt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanzwerte sind mit * bezeichnet: * $p > 0,1$ ; ** $0,1 < p > 0,05$ ; *** $p < 0,05$ ; **** $p < 0,01$ . . . . .	51
3.21	Cytokinexpression nach 2 und 4Std Stimulation mit PHA=Phytohämagglutinin, TFF2, TFF3 und BSA=Bovines Serumalbumin und anschließender RT-PCR bei HL60 (granulozytär). MA=Marker, K=unstimulierte Kontrolle. . . . .	53
3.22	Cytokinexpression nach 2 und 4Std Stimulation mit PHA=Phytohämagglutinin, TFF2, TFF3 und BSA=Bovines Serumalbumin und anschließender RT-PCR bei PMN. MA=Marker, K=unstimulierte Kontrolle. . . . .	54

# Tabellenverzeichnis

2.1	Liste der getesteten Zelllinien. . . . .	19
2.2	Liste der verwendeten Primerpaare. F und R bezeichnen die jeweiligen Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer. . . . .	20
2.3	Liste der verwendeten Plasmide und Reportergeren Konstrukte. amp: Ampicillin. . . . .	21
2.4	Laufbedingungen der TFF-Multiplex-PCR. . . . .	27
2.5	Laufbedingungen der TFF-Realtime-PCR. . . . .	29
2.6	Laufbedingungen der Cytokin-Multiplex-PCR. . . . .	31
3.1	Relative <i>TFF</i> Expression nach transienter Transfektion mit Konstrukten der 5'-flankierenden Region der <i>TFF</i> Gene und anschließender Cytokinapplikation. Die Prozentwerte sind Mittelwerte mit Standardabweichung. . . . .	37
3.2	Relative <i>TFF</i> Expression nach Co-Transfektion mit $\text{NF}\kappa\text{-B}$ - und $\text{C/EBP}\beta$ -Expressionsvektoren. Die Prozentwerte sind Mittelwerte mit Standardabweichung. . . . .	41
3.3	Relative endogene <i>TFF</i> Expression nach 5, 24, 48 und 72Std Stimulation mit $\text{IL1}\beta$ und $\text{IL6}$ nach Realtime-RT-PCR. Die Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung und als Prozent relativ zur nicht stimulierten Kontrolle dargestellt. Hochsignifikante Werte sind hervorgehoben. . . . .	52

## **TABELLENVERZEICHNIS**

---

## Lebens- und Bildungsgang

22. November 1974 geboren in Lauingen an der Donau

1981 - 1985 Grundschule, Wendlingen

1985 - 1994 Gymnasium, Wendlingen

1994 - 1999 Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

1999 Diplomarbeit am Hygiene-Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Betreuung von Prof. G. Döring

2000 - dato Promotion am Institut für Anthropologie und Human-genetik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Betreuung von PD Dr. P. Gött

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht:

Cytokines, signaling pathways and transcription factors modulate expression of *TFF* genes, putative tumor suppressors encoding gastrointestinal healing peptides. (Posterbeitrag AEK Heidelberg, April 2001)

Down-regulation of *TFF* expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors. (Cellular Physiology and Biochemistry, in press)

Im Selbstverlag herausgegeben von:  
Veronika Dossinger  
Hartmeyerstr. 6/61  
72076 Tübingen