

Vergleichende Expressionsanalysen von stationären und migrierenden Epithelzellen nach *in vitro*-Verwundung

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Eva Barbara Znalesniak
geb. am 16.02.1969 in Bielitz-Biala (Polen)

Gutachter: Prof. Dr. Werner Hoffmann, Universität Magdeburg
Prof. Dr. Sabine Werner, ETH-Hönggerberg Zürich

eingereicht am 02.10.2012

verteidigt am 03.04.2013

Selbstständigkeitserklärung

Die von mir eingereichte Dissertation „Vergleichende Expressionsanalysen von stationären und migrierenden Epithelzellen nach *in vitro*-Verwundung“ wurde selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Verwendung anderer als der angegebenen Hilfsmittel verfasst. Die aus anderen Quellen übernommenen Daten und Erkenntnisse sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe und an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Magdeburg, 02.10.2012

Danksagung

Mein großer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, dem Institutsdirektor Herrn Univ.-Prof. Dr. Werner Hoffmann für die Bereitstellung des Themas und stetige Unterstützung während meiner Promotion. Des Weiteren danke ich für seine zahlreichen Anregungen, konstruktiven Kritiken, wertvollen Hinweise bei der Bearbeitung des Themas sowie für die Korrektur dieser Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Institutes für Molekularbiologie und Medizinische Chemie Timo Albert, Ting Fu, Jana Reising, René Stürmer, Jens Weste, Hubert Ragge, Andreas Kohnke und Elke Voß für die angenehme Arbeitsatmosphäre, große Hilfsbereitschaft und Unterstützung nicht nur im Laboralltag.

Ein besonderer Dank geht an den medizinischen Doktoranden Felix Mertin für seine große moralische und freundschaftliche Hilfe sowie stete Diskussionsbereitschaft und Geduld bei der sprachlichen Überarbeitung des Manuskripts.

Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Znalesniak E B, Dürer U, Hoffmann W; Expression profiling of stationary and migratory intestinal epithelial cells after *in vitro* wounding: restitution is accompanied by cell differentiation; *Cell. Physiol. Biochem.*, 2009, 24: 125-132.

Znalesniak E B, Hoffmann W; Modulation of cell-cell contacts during intestinal restitution *in vitro* and effects of epidermal growth factor (EGF); *Cell. Physiol. Biochem.*, 2010, 25: 533-542.

Posterpräsentationen:

33th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, University of Regensburg, 10-13.03.2010

Znalesniak E B, Hoffmann W; Rapid repair of mucous epithelia by restitution: expression profiling of stationary and migratory epithelial cells after *in vivo* wounding

4th Mildred Schell Cancer Conference, Königswinter bei Bonn, 19-21.05.2010

Znalesniak E B, Hoffmann W; Expression profiling of stationary and migratory epithelial cells after *in vitro* wounding: comparison of non-transformed and cancer cell lines

Abkürzungen	8
1 Einleitung	10
1.1 Epitheliale Barriere.....	10
1.2 Aufrechterhaltung und Schutz der mukosalen Barriere.....	10
1.2.1 Mukus.....	11
1.2.2 Gewebshomöostase durch Proliferation und Differenzierung (<i>Self-Renewal</i>).....	11
1.2.3 Reparatur durch Zellwanderung (Restitution).....	12
1.2.4. Komplexe Wundheilungsprozesse.....	13
1.3 Trefoil Factor Family Peptide (TFFs).....	15
1.4 Zellbiologische Vorgänge.....	16
1.4.1 Zellmigration.....	16
1.4.2 Polarisierung der Zelle.....	17
1.4.3 Zell-Adhäsion.....	18
1.4.4 Proteolytischer Umbau der extrazellulären Matrix.....	18
1.4.5 EMT.....	19
1.4.6 Apoptose/Nekrose.....	20
1.5 Untersuchung der Wundheilung <i>in vitro</i>	21
1.6 Ziele der Arbeit.....	21
2. Materialien	23
2.1 Zelllinien.....	23
2.2 Tierische Gewebeproben.....	23
2.3 Humane Biopsieproben.....	23
2.4 Materialien für die Kultivierung von Zellen.....	23
2.5 Peptide und Antikörper.....	25
2.6 Materialien für die molekularbiologischen Arbeiten.....	26
2.7 Geräte.....	28
2.8 Primer.....	30
3. Methoden	31
3.1 Zellkultur.....	31
3.1.1 Passagieren der Zellen.....	31
3.1.2 Zellzahlbestimmung.....	31
3.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	31
3.1.4 Kontrolle der Zellkultur auf Mykoplasmen.....	31
3.2. Kultivierung der Zellen.....	32
3.2.1 Gewinnung und Kultivierung von Zellen aus den humanen Biopsieproben.....	32
3.2.2 Gewinnung und Kultivierung von Zellen aus dem Magen der Maus.....	32
3.2.3 Kultivierung von Zelllinien.....	33
3.3 <i>in vitro</i> Verwundungsexperimente.....	34
3.3.1 Präparativer Scratch Assay.....	34
3.3.2 Scratch-Assay.....	36
3.3.3 Totale Verwundungsexperimente (multi-Scratch Assay).....	36
3.4 Differenzierungsexperimente.....	37
3.5 Boyden-Kammer-Assay.....	37

3.6 Inkubation der Zellen mit Wachstumsfaktoren, TFF-Peptiden und anderen Stimulantien.....	38
3.7 PAS-Alcianblau-Färbung der Zellkulturen.....	38
3.8 Immunzytochemie.....	39
3.8.1 Immunfluoreszenz.....	39
3.8.1.1 Fixierung der Zellen mit Methanol.....	39
3.8.1.2 Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd.....	39
3.8.1.3 Blockierung.....	40
3.8.1.4 Inkubation mit Antikörpern.....	40
3.8.1.5 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	40
3.9 Genexpressionsanalysen mit RT-PCR.....	41
3.9.1 Isolierung von Gesamt-RNA.....	41
3.9.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen.....	41
3.9.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe.....	42
3.9.2 Qualitätskontrolle der RNA.....	42
3.9.3 Bestimmung der RNA-Konzentration.....	42
3.9.4 Entfernung genomischer DNA-Spuren in RNA mit RNase-freier DNase.....	43
3.9.5 Reverse Transkription.....	43
3.9.6 RT-PCR.....	44
3.9.7 Elektrophoretische Trennung von DNA.....	45
3.10 Bioinformatische Methoden.....	45
3.10.1 Sequenz-Vergleiche.....	45
3.10.2 Entwurf der Primer.....	46
3.11 Proteinbiochemische Methoden.....	46
3.11.1 Proteinextraktion.....	46
3.11.1.1 Proteinextraktion mittels Trizol.....	46
3.11.1.2 Proteinextraktion mit Lysispuffer.....	46
3.11.1.3 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA).....	47
3.11.2 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	47
3.11.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Biorad Protein Assay.....	47
3.11.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Kit.....	47
3.11.3 SDS-PAGE.....	48
3.11.3.1 Probenvorbereitung für SDS-PAGE.....	48
3.11.3.2 Durchführung von SDS-PAGE.....	48
3.11.4 Western Blot.....	49
3.11.5 Ponceau-Färbung.....	49
3.11.6 Immunologische Detektion der Proteine.....	49
3.11.7 Wiederverwenden der Nitrozellulosemembran.....	50
3.11.8 Coomassie-Färbung.....	50
3.11.9 Silberfärbung.....	51
3.12 Semiquantitative Auswertung der Gele.....	51
3.13 Bestimmung der Migrationsstrecke nach <i>in vitro</i> -Verwundung.....	51
4 Ergebnisse	52
4.1. Wirkung von TFF-Peptiden bzw. TNF α auf Epithelzellen.....	52
4.1.1 Untersuchung der motogenen Wirkung von TFF2-glyk auf IEC-18 und BEAS-2B-Zellen nach <i>in vitro</i> -Verwundung.....	52

4.1.2 Wirkung von TFF2-glyk auf CXCR4 exprimierende Zellen.....	52
4.1.3 Untersuchung der motogenen Wirkung von TFF3 und EGF auf IEC-18- und BEAS-2B-Zellen nach <i>in vitro</i> -Verwundung.....	53
4.1.4 Expressionsanalysen nach TFF3- bzw. TNF α -Behandlung nach totaler Verwundung von IEC-18-, BEAS-2B- und A549-Zellen.....	54
4.2 Expressionsanalysen von getrennten stationären bzw. migrierenden Epithelzellen....	59
4.2.1 Charakterisierung von stationären und migrierenden IEC-18-Zellen.....	59
4.2.2 Charakterisierung von stationären und migrierenden IEC-18-und IEC-6-Zellen nach EGF-Behandlung.....	62
4.2.3 BEAS-2B und A549-Zellen.....	64
4.2.4 AGS-Zellen.....	67
4.2.5 Primäre Zellkulturen.....	68
4.3 Expression der TFF-Peptide in IEC-18- bzw. BV2-Zellen nach LPS-Stimulation.....	69
5 Diskussion	70
5.1 Präparativer Scratch Assay: methodische Aspekte.....	70
5.2 Vergleich der Genexpressions von stationären und migrierenden IEC-18-Zellen.....	70
5.2.1 Differenzierungsprozesse.....	70
5.2.2 EMT.....	74
5.2.3 Zell-Zell-Kontakte.....	77
5.2.4 EGF-induzierte Änderungen in der Genexpression der IEC-18-Zellen.....	78
5.3 Andere Zelllinien im Vergleich.....	80
5.3.1 BEAS-2B und A549.....	81
5.3.2 AGS-Zellen.....	85
5.3.3 Primäre gastrale Zellkulturen.....	85
5.3.4 Wirkung von EGF auf BEAS-2B- und A549-Zellen sowie Primärkulturen.....	86
5.4 Motogene Wirkung von rekombinantem TFF2-glyk und TFF3-Dimer.....	87
5.5 Einfluss von rekombinantem TFF3 auf TNF α -induzierte Entzündungsmarker.....	88
5.6 CXCR4 als möglicher Rezeptor von TFF2?.....	89
5.7 Beteiligung von TFF-Peptiden an der Immunantwort im zentralen Nervensystem.....	89
6 Zusammenfassung und Ausblick	91
6.1 Summary and outlook	93
7. Literaturverzeichnis	95
8. Anhang	109
8.1 Western Blots.....	109
8.2 Mikroskopaufnahmen.....	110
8.3 Primer.....	112

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AC-2	Serumersatz
APS	Ammoniumperoxidisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Cy3	Cyanin3
deion. Wasser	deionisiertes Wasser (18.2 MΩ ·cm)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM/Ham's F-12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
HBSS	Hanks balancierte Salzlösung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethylsulfonsäure
IF	Immunfluoreszenz
kb	Kilobasen
kDa	KiloDalton
LPS	Lipopolysaccharid
M	mol/L
MET	mesenchymale-epitheliale Transition
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Perjodsäure-Schiff-Färbung
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung

PBS-T	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i> : Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer,
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung + Tween
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFF	<i>trefoil factor family</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Western Blot

Die genauen Bezeichnungen der Gene sind, soweit nicht in Klammern erklärt, in den Tab. 16-18 erläutert (siehe Anhang).

In der Diskussion werden alle Gene zur Vereinfachung groß geschrieben.

1 Einleitung

1.1 Epitheliale Barriere

Epithelien, die die Oberfläche des Körpers und dessen Hohlräume auskleiden, stellen eine hochgradig interaktive Barriere dar. Einerseits ermöglichen sie die Kommunikation mit der Umwelt; andererseits gewährleisten sie durch den mechanischen Schutz und die Sekretion einer mukösen Schranke körperliche Unversehrtheit gegen Umwelteinflüsse. Spezifische Aufgaben sind z.B. der Austausch von Gasen, die Aufnahme von Nahrungsmitteln, die Sekretion von Enzymen und Hormonen, sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten (renale und biliäre Exkretion). Um diesen essentiellen Aufgaben kontinuierlich nachzukommen, muss die epitheliale Barriere ständig erneuert werden, da sie durch Schadstoffe andauernd geschädigt wird.

Die Barriere besteht primär aus einer Epithelzellschicht. Diese spezialisierten Zellen zeichnen sich durch ihre apikal-basale Polarität aus, die durch das Vorhandensein von *tight junctions* und Adhäsionsverbindungen charakterisiert ist. Die Plasmamembran wird so in biochemisch und funktionell unterschiedliche Bereiche getrennt (Abb. 1). Die apikal liegenden, dichten *tight junction*-Verbindungen bilden eine Diffusionsbarriere für den Zellzwischenraum. Die integralen Transmembrankomponenten dieser Verbindungen umfassen drei Proteinfamilien: die Occludine (OCLN), die Claudine (CLDN) und die *Junctional Adhesion Molecules* (JAM). Diese treten mit zytosolischen Adapterproteinen in Wechselwirkung, die wiederum direkt oder indirekt eine Bindung zum Zytoskelett der Zelle vermitteln (D'Atri and Citi, 2002).

Die haftenden Zell-Zell-Verbindungen werden vor allem durch die Ca^{2+} -abhängigen homophilen Cadherin-Dimere zwischen Nachbarzellen vermittelt, wie z.B. E-Cadherin (CDH1) in Epithelien oder N-Cadherin (CDH2) in Stromazellen. Die zytoplasmatischen Domänen der Cadherine werden durch die Bindung des β -Catenins mit dem Actinzytoskelett oder Actin-assoziierten Molekülen bzw. via p120 mit Mikrotubuli verbunden (Alattia et al., 1999, Friedl and Wolf 2009, Baum and Georgiou, 2011).

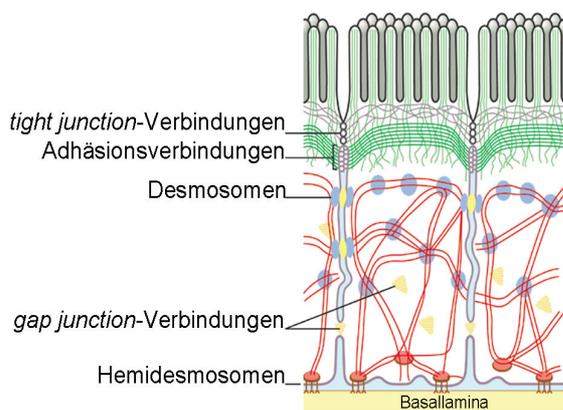


Abb. 1: Schematische Darstellung epithelialer Zellen der intestinalen Mukosa: rot Intermediärfilamente, grün Actinfilamente (verändert nach Chandran et al., 2003).

Ferner wird der Zellzusammenhalt, besonders im basolateralen Bereich der epithelialen Zellen, durch die mit Intermediärfilamenten gebundenen desmosomalen Cadherine gewährleistet (Huber, 2003). Epitheliale Zellen sind außerdem, wie die meisten Körperzellen, über die aus Connexonen zweier Nachbarzellen gebildeten *gap-junction* Kanäle gekoppelt, welche in ihrer Vielzahl zur *gap junction*-Verbindung zusammengefasst werden. Diese interzellulären Poren erlauben den Austausch von Ionen und kleinen Molekülen, was die Zellen sowohl chemisch als auch elektrisch miteinander verbindet (Giepmans, 2004).

1.2. Aufrechterhaltung und Schutz der mukosalen Barriere

Die Schutzmechanismen der Epithelien, die z.B. äußere Oberflächen des Respirations-, Verdauungs- und Urogenitaltraktes bedecken, können in drei Schlüsselkomponenten kategorisiert werden: in die pro-epitheliale (Mucus), epitheliale (*Self-Renewal* und

Restitution) und post-epitheliale Abwehr (Wundheilungsprozesse) (Sarosiek and McCallum 2000; Sturm and Dignass, 2008).

1.2.1 Mukus

Die extrazelluläre Mukusschranke z.B. im Darm besteht aus sezernierten Muzinen (MUC), unspezifischen antimikrobiellen Molekülen sowie spezifischen antimikrobiellen Immunglobulinen und enthält hydrophobe und hydrophile Anteile. Die hydrophobe Auskleidung der luminalen Oberflächen mit Phospholipiden minimiert bzw. unterbindet den Kontakt und das Anheften von pathogenen Mikroorganismen an die Zellmembran und verhindert eine Verletzung durch chemische Reaktionen (Sturm and Dignass, 2008). Das stark hydratisierte visköse Gel ermöglicht dennoch die Diffusion von Makromolekülen, die für die Ausübung der spezifischen Funktionen der Epithelien benötigt werden.

Die gelformenden Muzine und Glykoproteine, die den Hauptanteil der Mukusschicht bilden, werden von spezialisierten Zellen sezerniert (z.B. Becherzellen im Darm). Die komplexen Oligosaccharide auf den glykosylierten Domänen der Muzine bilden potentielle Liganden für mikrobielle Adhäsine, können aber auch als Energiequelle von einigen kommensalen Mikroorganismen genutzt werden. Das muköse Gel stellt darüber hinaus eine Matrix für die Retention antimikrobieller Moleküle dar, welche z.B. im Darm in erster Linie von Paneth-Zellen produziert werden. Von den B-Zellen in der *Lamina propria* gebildete und von Epithelzellen in den Mukus durch Transzytose sezernierte Immunglobuline A und G repräsentieren eine wichtige Komponente der mukösen Barriere. Zusätzlich zur äußeren Schleimschicht ist die apikale Oberfläche der mukösen Epithelzellen in der Regel durch dichte Mikrovilli und eine komplexe Glykokalyx (eine Schicht Polysaccharide, die kovalent an Membranproteine und Membranlipide der Epithelialzellen gebunden sind) bedeckt. Diese sind zum Schutz gegen Pathogene erforderlich, welche trotz der rheologischen und biochemischen Eigenschaften durch die innere Schleimschicht eindringen und Entzündungssignale modulieren können. Die Differenzierung der Becherzellen, die Glykosylierung der Muzine und die Produktionsmengen antimikrobieller Moleküle werden vom angeborenen und adaptiven Immunsystem reguliert (zusätzlich zur direkten Regulation der Epithelzellen als Antwort auf die mikrobiellen Signale) (McGuckin et al., 2011).

Der Mukus unterliegt sowohl einem ständigen mechanischen (im respiratorischen Epithel durch Cilien und Hustreflexe; im Gastrointestinaltrakt durch Abtragen via peristaltische Bewegung und Nahrungsbestandteile) als auch einem mikrobiellen Abbau durch permanente Keimbeseidlung.

1.2.2 Gewebshomöostase durch Proliferation und Differenzierung (*Self-Renewal*)

Das Markenzeichen muköser Epithelien ist ein homöostatisches Wachstum zur Aufrechterhaltung des Fließgewichtes zwischen absterbenden, sich differenzierenden und proliferierenden Zellen. Die kontinuierliche Erneuerung beinhaltet die Differenzierung der Epithelzellen aus Stamm- und Vorläuferzellen z.B. innerhalb der Krypten des Darmes, und die nachfolgende Apoptose der funktionellen, ausdifferenzierten Zellen des Oberflächenepithels.

Stammzellen weisen die Besonderheit auf, sich selbst zu erneuern ohne dabei zu differenzieren; sie können einen oder mehrere spezialisierte Zelltypen erzeugen, die eine kennzeichnende Morphologie und Funktion aufweisen (Weissman, 2000). Es existieren sowohl pluripotente embryonale (Odorico et al., 2001) als auch multipotente gewebspezifische Stammzellen, deren primäre Funktion die kontinuierliche Gewebeerhaltung (*Self-Renewal*) und auch die Geweberegeneration ist (Twardzik and Rapp 2002).

Die multipotenten Stammzellen liegen in Stammzellnischen. Diese, aus mesenchymalen (subepithelialen Myofibroblasten) und anderen unterstützenden Zelltypen aufgebaute Senke im Epithel, bietet den Stammzellen eine spezielle Mikroumgebung aus selbsterzeugten und/oder transmittierten Stimuli, welche die Zellteilung gänzlich verhindern oder eine übermäßige Bildung der Tochterzellen hemmen (Moore and Lemischka, 2006).

Eines der bestuntersuchten Systeme ist die intestinale Mukosa, welche sich etwa alle 4-5 Tage durch kontinuierliche Proliferation der Stamm- und Vorläuferzellen (bidirektional) erneuert. Hier gibt es 2 Typen von intestinalen Stammzellen, aus welchen mindestens vier verschiedene Zelllinien entstehen. Drei Tage nach ihrer terminalen Differenzierung erreichen die entlang der Krypt-Villus-Achse wandernden absorptiven Enterozyten, die Mukus-sezernierenden Becherzellen und unterschiedliche Typen von enteroendokrinen Zellen die Villusspitze. Danach unterliegen sie einer spontanen Apoptose und werden in das Lumen abgeschilfert bzw. durch Phagozytose beseitigt. Die Paneth-Zellen, welche Lysozym und antimikrobielle Peptide sezernieren, wandern dagegen die Krypte abwärts zur Basis und verweilen dort bis zu drei Wochen (Potten, 1998; Barker et al., 2007; Kouznetsova et al., 2011; van der Flier and Clevers, 2009).

Man geht heute davon aus, dass Veränderungen von Gradienten an Signalmolekülen zwischen Stammzellnische und Vorläuferzellzone die Empfänglichkeit für parakrine und autokrine Wachstums- und Differenzierungsfaktoren entlang des Wanderungsweges zur Zielposition in den Vorläufer-Zellen induzieren. Die Differenzierung einer Zelle ist so von der Positionsinformation abhängig, die sie während der Wanderung entlang der Krypt-Villus-Achse empfängt. Dazu gehören u.a. Morphogene, wie z.B. Mitglieder der Hedgehog Familie: SHH (*sonic hedgehog*) und IHH (*indian hedgehog*), welche von epithelialen Zellen sezerniert werden, oder die von mesenchymalen Zellen sezernierten BMPs (*bone morphogenetic proteins*), die als negative Regulatoren der Kryptenregion wirken. Die dominierende Kraft zur Aufrechterhaltung der Proliferation stellt der aktive WNT-Signalweg (*wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family*) dar. Eine weitere wichtige Komponente ist der NOTCH-Signalweg, der für die Aufrechterhaltung der proliferierenden Aktivität der Vorläufer-Zellen und Erschaffung der spezifisch differenzierten Zelltypen erforderlich ist (Scoville et al., 2008; Brabletz et al., 2009).

Durch ihr hohes Potenzial an Proliferation und Differenzierung in multiple Zellarten sind Stammzellen von großer Bedeutung für die Entwicklungen auf dem Gebiet der Regenerationsmedizin. Hier können sie (insbesondere die somatischen Stammzellen) in Zukunft vermutlich für die künstliche Rekonstruktion von Geweben und Organen (*Tissue Engineering*) eingesetzt werden. Bei dysregulierter Differenzierung können aus den Stammzellen (aber auch aus Vorläuferzellen) entartete Zellen entstehen und so zur Tumorentstehung führen. Diese, oft als Krebsstammzellen bezeichnet, können dann zur Resistenz der Tumore für viele Therapien und somit für Rezidive beitragen. (Donner, 2007; Gupta et al., 2009; Cohen and Melton, 2011)

1.2.3 Reparatur durch Zellwanderung (Restitution)

Defekte von Epithelien, die sich auf den Verlust einzelner Zellen beschränken, werden sehr schnell mittels des „*purse-string-Mechanismus*“ behoben. Durch die Ausdehnung der benachbarten Zellen und Kontraktion eines Actinmyosin-Bandes bei gleichzeitiger Bildung funktioneller *tight junctions* wird der Zellzwischenraum geschlossen (Florian et al., 2002).

Größere Schäden an Epithelien (oder Urothelien), welche die Basalmembran nicht durchbrechen oder Defekte an Schleimhäuten, welche auf die Tunica mucosa beschränkt sind (Erosionen), können durch den Vorgang der Restitution geschlossen werden. Dieser Prozess findet auch in der frühen Phase der epithelialen Wundheilung statt und basiert auf der Migration der dem Defekt benachbarten Epithelzellen. Dabei dedifferenzieren (morphologisch und genetisch) die intakten Zellen, reorganisieren ihr Zytoskelett, flachen ab, wandern gezielt in das verletzte Areal ein und bedecken die darunter liegenden Zellschichten. Nach dem Verschluss der Wundstelle und Herstellung von Zell-Zell-Kontakten redifferenzieren sie zu funktionsfähigen Epithelzellen (Erjefält et al., 1995; Bonventre, 2003; Taupin and Podolsky, 2003). Dieser Prozess der epithelialen Restitution erfordert keine Proliferation und erfolgt innerhalb von Minuten bis Stunden nach der Läsion (Silen and Ito, 1985; Wilson and Gibson, 1997; Hoffmann 2005). Ferner erfordert die Restitution keine mitochondriale Atmung, sondern nur eine intakte Glykolyse (Cheng et al., 2001).

1.2.4 Komplexe Wundheilungsprozesse

Wird die Oberflächenbarriere durch mechanische und/oder chemische Noxen beschädigt, schaltet sich als drittes Element der epithelialen Abwehr der Wundheilungsprozess als post-epitheliale Antwort ein (Sturm and Dignass 2008).

Die Wundheilung ist ein komplexer und dynamischer Prozess der Wiederherstellung von zellulären Strukturen und Gewebeabschnitten. Daran sind Epithelzellen, (Myo-)Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen Thrombozyten sowie assoziiertes lymphatisches Gewebe beteiligt.

Die Kontinuität der Barrierefunktion und die Selektivität der epithelialen Oberfläche wird dabei durch mindestens drei verschiedene, sich im Zeitverlauf überlappende Mechanismen sichergestellt: Restitution wie oben dargestellt als schnelle Wundheilung durch Zellmigration, sowie Proliferation und Differenzierung als langsame Wundheilung.

Überschreiten die Defekte die Basalmembran (bzw. *Tunica mucosa*), werden sie als Ulkus bezeichnet und bedürfen je nach Größe des Substanzverlustes einer Reparatur. Die Läsion kann durch Restitution und reparative Regeneration (als Ersatz verlorengegangener Zellen durch gleichwertiges Gewebe; entspricht einer Heilung ohne bleibende Defekte) oder durch Reparation geschlossen werden. Im Zuge einer Reparation wird die Wunde zusätzlich durch mesenchymale Zellen verschlossen (Ersatz durch funktionell limitiertes Gewebe). Dies entspricht einer Heilung mit permanentem Defekt in Form von Narbengewebe (Böcker et al., 2008, Oberholzer, 2001).

Die Wundheilung kann in mehrere Phasen eingeteilt werden, die sich jedoch überschneiden und nicht streng voneinander zu trennen sind. Als erste Phase wird innerhalb von Minuten die Hämostase initiiert. Die lokale Blutgerinnung und Thrombusbildung wird von den Thrombozyten (Fibrin) veranlasst. Von diesen freigesetzte Moleküle steuern die Rekrutierung, Bewegung und Proliferation all der Zellen, die zur Beseitigung des Gewebes Schadens benötigt werden. Nach dem Aufbau einer provisorischen Matrix (Phase zwei), die zu einem großen Teil aus dimeren Fibronectinmolekülen, Fibrin und Kollagen besteht (welche von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten abgegeben werden), wird innerhalb von Stunden nach der Verletzung die dritte Phase, die der Entzündung, eingeleitet. Ihr Ziel ist es, die Noxe bzw. ihre Folgen zu beseitigen und den ursprünglichen Gewebezustand wiederherzustellen.

Die durch Gewebeschädigung freigesetzten Entzündungsmediatoren führen zu einer Reihe kaskadenartig ablaufender vaskulärer und zellulärer Reaktionen, die in ihrer Gesamtheit den Entzündungsprozess darstellen. Zu den vaskulären Reaktionen gehören Vasodilatation mit vermehrter Gewebsdurchblutung und Permeabilitätssteigerung der Gefäßwand, welche in der Bildung eines entzündlichen Exsudates resultiert. Die zellulären Reaktionen der Entzündung beinhalten die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut in die geschädigte Gewebe mittels Chemotaxis (Margination, Emigration) sowie die Phagozytose von eingedrungenen Mikroben und apoptotischen/nekrotischen Zellen (Böcker et al., 2008).

Zur Verhinderung einer chronischen Entzündung, die durch Persistenz des Entzündungsreizes hervorgerufen wird und eine kritische Komponente der Tumorentstehung darstellt, ist eine schnelle Reparatur beschädigter muköser Epithelien essenziell (Coussens and Werb, 2002). Die meisten der tödlich verlaufenden Tumorerkrankungen bei erwachsenen Menschen haben ihren Ursprung in Epithelien (über 90%, Nollet et al., 1999). Sowohl eine unzureichende Wundheilung, welche in Abszessen und Fisteln resultiert, als auch eine übermäßige Wundheilung, welche Fibrose verursacht, rufen häufig klinische Probleme, z.B. bei Darmerkrankungen, hervor (Rieder et al., 2007, Sturm and Dignass 2008).

Die vierte (operative) Phase beginnt nach ca. 24 h nach der Wundsetzung und beinhaltet den Aufbau der temporären, extrazellulären Matrix (ECM) in Form von Granulationsgewebe (an der Fibroblasten, Myofibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen beteiligt sind). Nach Wochen wird durch die Fibroblasten eine „junge“ bzw. nach Monaten eine „reife“ Narbe gebildet (Böcker et al., 2008, Oberholzer 2001).

Der Zellersatz während der reparativen Regeneration bzw. Reparatur als Reaktion auf äußere Verletzung wird wie bei der Gewebshomöostase (physiologische Regeneration) durch die Proliferation der Stamm- und Vorläuferzellen geregelt. So strecken und vertiefen sich z.B. die Krypten verletzter Darmareale, was die Zunahme der schnell proliferierenden Vorläuferzellpopulationen widerspiegelt (Okamoto, 2011).

Nach einer Gewebeverletzung setzen die direkt betroffenen sowie die nekrotischen und apoptotischen Zellen eine Vielfalt von Faktoren frei, welche die Stammzellen zu mitogenischen Vorgängen via WNT-, BMP- oder Hedgehog-Signalweg veranlassen können (Fan and Bergmann, 2008; Bergmann and Steller, 2010; Morata et al., 2011). Die Aktivierung von Phospholipase A2 durch die Caspasen CASP-3 und -7 in apoptotischen Zellen resultiert in einer erhöhten Konzentration von Arachidonsäure. Diese wird anschließend zu Prostaglandin E2 (PGE2), einem potenten Stimulator der Stammzell-Proliferation, Geweberegeneration und Wundheilung (via WNT-Signaltransduktion), umgewandelt (Li et al., 2010).

Eine große Bedeutung in der Reparatur haben die mesenchymalen Stammzellen. Ihre Nachkommen differenzieren sich und nehmen am strukturellen Organaufbau teil. Sie können ebenfalls Faktoren sezernieren, die die Wundheilung unterstützen und das Immunsystem modulieren. So kann z.B. von mesenchymalen Stammzellen sezerniertes PGE2 die WNT-Signaltransduktion verstärken und die durch Makrophagen produzierten Entzündungszytokine herunterregulieren (Stappenbeck, 2009).

Bestimmende Faktoren der Wundheilung

Die Wundheilung wird durch ein breites Spektrum von verschiedenen Faktoren reguliert, die durch die Zellen des angrenzenden Gewebes (wie Myo-/Fibroblasten, die eingewanderten Thrombozyten, Neutrophile, Makrophagen) oder epitheliale Zellen selbst sezerniert oder bei Membrandefekten durch Verletzungen freigesetzt werden. Viele von diesen regulieren u.a. über den MAPK-Signalweg diverse zelluläre Aktivitäten wie Genexpression, Zellzyklus-Regulation, Zellstoffwechsel, Beweglichkeit, Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung und erlauben somit der Zelle koordinierend auf die vielfachen und divergierenden Eingangssignale zu reagieren (Pearson et al. 2001; Qi and Elion, 2005).

Zu den regulierenden Faktoren zählen Zytokine wie die Interleukine IL-1, IL-2, IL-15, IL-22 und IFN- γ (*interferon-gamma*) (Reinecker et al., 1996; Dignass and Podolsky 1996; Fiocchi 1997; MacDermott, 1996, Brand et al., 2006), aber auch die Wachstumsfaktoren wie KGF (*keratinocyte growth factor*) (Werner, 1998, Werner and Grose, 2003; Greenwood-Van et al., 2003), VEGF (*vascular endothelial cell growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) (Beck and Podolsky 1999), FGFs (*fibroblast growth factors*), IGFs (*insulin-like growth factors*) und HGF (*hepatocyte growth factor*) (Dignass et al. 1994a, Dignass et al. 1994b) oder von den lokalen endokrinen Zellen sezerniertes GLP-2 (*glucagon-like peptide*), das die Proliferation der epithelialen Zellen via Stimulation der enterischen Neurone fördert (Bjerknes and Cheng, 2001).

Einen direkten Einfluss auf die Restitution haben aber auch Adhäsionsmoleküle wie z.B. Integrine, welche sowohl inside-out- als auch outside-in-Signale übertragen können, sowie Phospholipide wie z.B. LPA (Lysophosphatidsäure) (Sturm et al., 1999; Moolenaar, 1995) und Polyamine wie Putrescin, Spermidin und Spermin (McCormack and Johnson, 2001; Seiler and Raul 2007).

Auch kann die Zellmigration nach Freisetzung von Nukleotiden (z.B. ATP oder UTP) und Aktivierung von Purinrezeptoren (P2X, P2Y) ausgelöst werden (Weinger et al., 2005). Außerdem fördern kurzkettige Fettsäuren wie Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure *in vitro* die Motilität von Zellen sowie die Expression z.B. von MUC2 und damit die Schutzfunktion der Mukosa (Wilson and Gibson 1997; Willemsen et al. 2003).

Für die epitheliale Restitution und Gewebshomöostase spielen auch die enterischen kommensalen Bakterien eine wichtige Rolle. Die bakteriell-epithelialen Kontakte unterstützen die Proliferation während der Entwicklung und nach einer Verwundung (Pull et al., 2005).

Durch Induktion von ROS (*reactive oxygen species*) in epithelialen Zellen fördern sie die Zellmigration (Swanson et al., 2011). Nach einer Verletzung des Epithels kann die Exposition von TLR-Liganden (*toll like receptor*) durch Bindung an die in der *Lamina propria* des Darmes ansässigen Makrophagen die Expression von Heat-Shock-Proteinen (HSP), IL-6 oder TNF α (*tumor necrosis factor*) hervorrufen. Ferner kann die Expression von Faktoren angeregt werden, die für die Zytoprotektion, Gewebereparatur und Angiogenese eine Rolle spielen wie z.B. COX-2 (*cyclooxygenase*), KGF-1/2, HGF, TGF β 1 (*transforming growth factor*), VEGF, und ANG-4 (*angiogenin-4*) (Rakoff-Nohoum et al., 2004).

Zu den wichtigsten Modulatoren der Restitution, Gewebshomöostase und Reparatur epithelialer Zellen zählen stark proliferationsförderndes und motogenes EGF (*epidermal growth factor*), sowie ebenfalls motogen wirkendes TGF β , das jedoch die Proliferation inhibiert (Kurokawa et al., 1987, Moses et al., 1987; Ciacci et al., 1993, Dignass et al., 1996). Dabei wurde *in vitro* zwischen EGF und TGF β ein Synergismus in Bezug auf die motogene Wirkung beobachtet (He and Bazan 2008).

1.3 Trefoil Factor Family Peptide (TFFs)

Die TFF (*trefoil factor family*)-Domäne ist ein Cystein-reiches Modul, das die Grundeinheit für die TFF-Peptide (TFFs) bildet. Diese werden vor allem durch Muzin-produzierende Zellen des Verdauungstraktes, des Urogenitaltraktes, der Lunge sowie im Gehirn sezerniert.

Zu den multiplen molekularen Funktionen gehören die Mitwirkung an der mukösen Barriere, Unterstützung der Restitution und die Modulation der Differenzierungsprozesse von mukösen Epithelien. Zahlreiche Studien belegen die schützende und heilende Wirkung aller TFF-Peptide nach einer Schädigung des Magen-Darm-Traktes bei Nagetieren (Vandenbroucke et al., 2004; Poulsen et al., 2005). Außerdem zeigen TFF1-defizienten Mäuse eine Störung im Aufbau der Magenschleimhaut, die mit einer obligatorischen Adenomentwicklung und einer verstärkten Karzinombildung einhergeht (Lefebvre et al., 1996). Überdies weisen TFF3-defiziente Mäuse u.a. eine verminderte Resistenz gegen DSS-induzierte Colitis auf (Mashimo et al., 1996).

Bei entzündlichen Erkrankungen und in Neoplasien ist häufig die Expression von TFF-Peptiden dysreguliert. Dies wird für prognostische Zwecke genutzt (Vestergaard et al., 2002, 2004, 2006, 2010; Katoh, 2003; Kosriwong et al., 2011). Proinflammatorische Zytokine können beispielweise TFF2 (Nikolaidis et al., 2003) oder TFF3 (Blanchard et al., 2004) induzieren; antiinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF α können TFF-Peptide sowohl induzieren (Hirota et al., 1994; Tebbutt et al., 2002), aber auch suprimieren (Dossinger et al. 2002).

Es gibt zunehmend Hinweise dafür, dass besonders TFF2 an der Immunantwort und an entzündlichen Prozessen beteiligt ist. Zum Beispiel werden TFF2 und TFF3 in lymphatischen Geweben wie Milz, Thymus, Lymphknoten sowie Knochenmark exprimiert und stimulieren die Migration von Monozyten (Cook et al, 1999; Madsen et al., 2007). Bei TFF2-defizienten Mäusen lässt sich eine veränderte Expression von Genen erkennen, die entscheidend für die angeborene und adaptive Immunität sind (Baus-Loncar, 2005a; Kurt-Jones et al., 2006).

Ferner können TFF-Peptide als pro-angiogene Faktoren fungieren, welche eine schnelle Wundheilung fördern (Rodrigues et al., 2003). Andererseits können TFFs durch ihre proinvasive und metastasierende Effekte die Tumorprogression fördern (Emami et al., 2004; Mayer zum Büschelfelde, 2004, 2006). Darüberhinaus können TFFs sowohl anti-apoptotisch wirken (Zhang et al., 2010; Chen et al., 2000) als auch pro-apoptotische Effekte vermitteln (Efstathiou et al., 1998; Rösler et al., 2010; Paunel-Görgülü et al., 2011).

Die biologische Funktion der TFF-Peptide ist bis heute nicht komplett geklärt und es wurden noch keine typischen Rezeptoren charakterisiert. Lediglich für CXCR4 (*chemokine C-X-C motif receptor 4*) wurde eine schwache Affinität zu TFF2 nachgewiesen (Dubeykovskaya et al., 2009, Hoffmann, 2009). Basierend auf der Beobachtung, dass neben der Ausbildung von Homodimeren (TFF1 und TFF3) alle drei TFFs Heteromere mit verschiedenen Partner-Proteinen bilden [z.B. TFF1 mit GKN-2 (gastrokin 2); TFF2 als hochmolekularer Komplex

mit einem noch unbekanntem Partner oder TFF3 mit FCGBP (IgG Fc binding protein)], kann ihre biologische Funktion sehr stark von dieser Wechselwirkung beeinflusst werden (Hoffmann 2013).

TFF-Peptide sind wegen ihrer motogenen Effekte vermutlich Regulatoren der epithelialen Restitution. Die motogene Wirkung von TFF2 wurde in Scratch-Assays mit BEAS-2B (humane bronchiale Epithelzellen) nachgewiesen, ebenso konnte eine synergistische Wirkung von TFF2 mit EGF auf die Migration beobachtet werden (Oertel et al., 2001). Dieser Effekt kommt nach Chwieralski et. al. (2004) über unterschiedliche Signalkaskaden zustande. Interessanterweise unterscheiden sich auch die durch TFF3 und EGF induzierten Migrationsmuster (Dürer et al., 2007). TFF2 und TFF3-Dimer zeigten gegenüber BEAS-2B-Zellen relativ moderate chemotaktische Aktivität (Chwieralski et. al., 2004). TFF2 und TFF3 konnten auch die TNF α -induzierte Sekretion von IL-6 und IL-8 steigern (Graness et al., 2002).

1.4 Zellbiologische Vorgänge

1.4.1 Zellmigration

Die Fähigkeit von Zellen, sich zu bewegen und über weite Distanzen zu wandern, bildet die Voraussetzung für die Entstehung von komplexen Organismen. Die Zellmigration ist ein vielschichtiger und heterogener Prozess, der von allen kernhaltigen Zellen vollzogen wird. Für die meisten Zellen, wie epitheliale, stromale oder neuronale Zellen, sind die Migrationsphasen auf die Morphogenese beschränkt und enden mit der Differenzierung zu intaktem Gewebe. Die Migrationsfunktion kann später im gesunden Organismus u.a. für die Restitution, für immunologische Prozesse und für die Wundheilung wiederhergestellt werden. Außerdem spielt die Zellwanderung bei der Tumorgenese und Metastasierung eine bestimmende Rolle. Für andere Zelltypen, wie z.B. Leukozyten, ist die Migration ein integraler Bestandteil ihrer Funktion und wird das ganze Zelleben aufrechterhalten (Friedl and Wolf 2009).

Die fetalen, aus der Zygote abgeleiteten Trophoblastenzellen können in das maternale Uterusgewebe eintreten, sich später in weitere Organe ausbreiten und niederlassen (Dawe et al., 2007). Somit ist ein direkter Zellübergang zwischen verschiedenen Individuen möglich.

Man unterscheidet die Einzelzellmigration (amöboide bzw. pseudopodal-filopodal amöboide oder mesenchymale Migration) von der kollektiven Migration als unregelmäßige Zellmasse, Zellplatte oder in Form von Kettenmigration (*chain migration*, *cell streaming*) (Abb. 2). Die unterschiedlichen Zelltypen können dabei ihre Bewegungsarten mit stark variierenden Geschwindigkeiten ausführen (Friedl and Wolf, 2009).

Der sehr komplexe und in verschiedenen Zelltypen variable Vorgang der Fortbewegung kann vereinfacht als ein 5-Stufen-Mechanismus beschrieben werden. Dabei können die Polarisierung, die Protrusion, die Anheftung an die Matrix, die Kontraktion sowie die Vorwärtsbewegung mit Ablösen des Uropods unterschieden werden (Abb. 3).

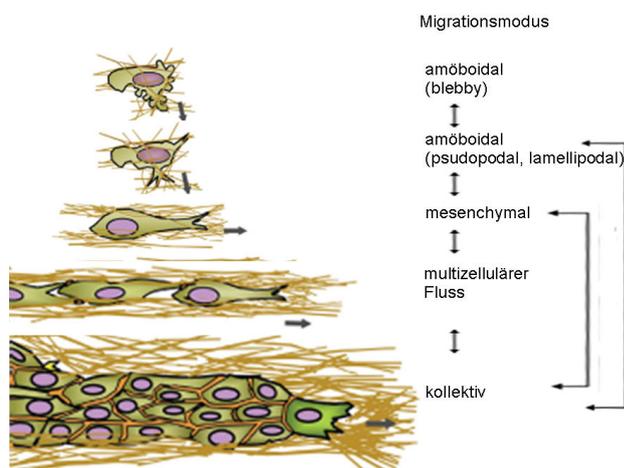


Abb. 2: Zellmorphologietypen, Migrationsmodi und Übergänge. Die Nomenklatur der interstitiellen Migration basiert auf der typischen Zellmorphologie (gerundet oder länglich) und dem Migrationsmuster (individuell oder kollektiv). Die am häufigsten untersuchten Übergänge sind die mesenchymal-amöboide Transition oder die kollektiv-individuelle. Die Pfeile zeigen die Richtung der Migration an (modifiziert nach Friedl and Wolf, 2009).

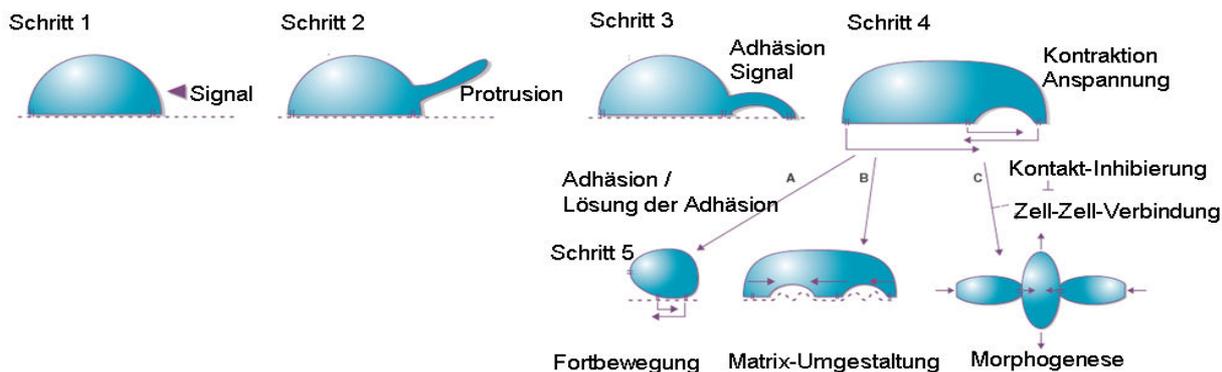


Abb. 3: Mechanismus der Zellmigration. Schritt 1: Polarisierung bzw. Umpolarisierung der Zelle, Schritt 2: Bildung von Lamellipodien und Filopodien, Schritt 3: Bildung von fokalen bzw. Zell-Zell-Kontakten, Schritt 4: Actomyosin-basierte Kontraktion, Schritt 5: Migration, Änderung der Geometrie der ECM, morphogenetische Bewegung (modifiziert nach Bailly and Condeelis, 2002).

Der dynamische Aufbau des Actinfilaments stellt dabei die Grundlage für den Umbau der Gestalt der Zelle dar (Bailly and Condeelis, 2002, Pollard and Borisy, 2003; Mattila and Lappalainen, 2008; Friedl and Wolf, 2009). Aufgrund ihrer physikalischen und molekularen Vielfalt muss die Zellmigration jedoch als Kontinuum von Zuständen betrachtet werden, welche durch die Zellmechanik und die Signalereignisse aus der Umgebung bestimmt werden (Friedl and Wolf, 2009).

Die nötige Zugkraft, um der Zelle Bewegung zu ermöglichen, wird durch die Anheftung der Zelle an die ECM via Integrin-Heterodimere gewährleistet. Bei zu loser oder zu fester Anheftung ist die Fortbewegung nicht möglich (Hood and Chersesh, 2002). Die Triebkraft für das Vorschieben der Zelle liefert die Polymerisierung der Actinfilamente in Lamellipodien und Filopodien (Fournier et al., 2010).

Die migrierenden Zellen können eine Migrationsspur hinterlassen. Diese Makroaggregate aus Integrinen, anderen Membranproteinen und Lipiden wie Cholesterol und Ceramiden können als Leitstrukturen für die nachkommenden Zellen oder als parakrine Signalmaschinerie dienen, welche in die chemotaktische Steuerung der benachbarten Zellen involviert ist (Kirfel et al., 2004).

1.4.2 Polarisierung der Zelle

Eine polare Verteilung der Membranproteine, wie z.B. Rezeptoren und der ihnen nachgeschalteten Signalproteine, ist für Erzielung einer hoch kompartimentierten Signaltransduktion zur Regulierung der Funktion der Zellen entscheidend (Manes and Viola, 2006; Gomez-Mouton and Manes; 2007, Florian and Geiger 2010). So stellt die Ausbildung der Asymmetrie bei einer bis dato symmetrischen (runden) Zelle oder die Veränderung der bestehenden apikal-basalen in eine anterior-posteriore Asymmetrie im Falle epithelialer Zellen die Voraussetzung für die (individuelle) Migration dar (Kirfel et al., 2004). Für viele Aspekte der kollektiven Migration der epithelialen Verbände ist außerdem die planare Zellpolarität (als Ausrichtung der epithelialen Zellen in einer Ebene innerhalb des Zellverbandes) wesentlich (Zallen, 2007).

Für die Migration, bei der die kleinen G-Proteine der RHO-Familie die Schlüsselrolle spielen, ist der Cross-Talk zwischen den PAR-Proteinen (die an der strikten Trennung zwischen der apikalen und der basolateralen Domäne beteiligt sind) und den kleinen GTPasen wie z.B. CDC42, RAC und RHO maßgebend (Etienne-Manneville, 2008, Bryant and Mostov, 2008) (Abb. 4). Die Signaltransduktion durch die Polaritätskomplexe ist stark an die WNT-Signalwege gebunden, z.B. an den kanonischen aber auch β -Catenin-unabhängigen WNT/ Ca^{2+} -Signalweg sowie den PCP-Signalweg (*planar cell polarity*), die direkten Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen nehmen (Huang and He, 2008; Montcouquiol et al. 2006; Sepich et al., 2011).

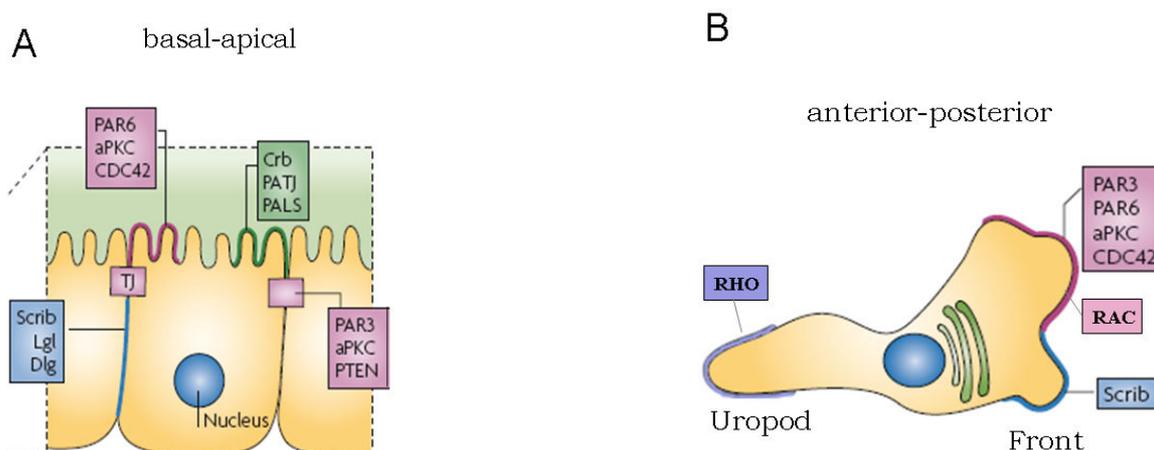


Abb. 4: Zellpolarität. Die Polaritätskomplexe sind involviert in die Generierung und Aufrechterhaltung aller Typen der Zellpolarisation. Die drei wichtigsten Polaritätskomplexe: PAR- (CDC42-PAR3-PAR6-aPKC), Crumbs- (Crb-PALS-PATJ) und Scribble- (Scrib-Dlg-Lgl) sind dabei asymmetrisch in der Zelle verteilt (A). Die asymmetrische Verteilung der Polaritätskomplexe sowie CDC42, RAC und RHO in migrierenden Zellen (B). Modifiziert nach Bryant and Mostov (2008).

1.4.3 Zell-Adhäsion

Die Migration erfordert eine koordinierte Regulation der Bildung und Lösung von Verbindungen mit anderen Zellen und der umgebenden Matrix. Während der individuellen Zellmigration fehlen die Zell-Zell-Verbindungen gänzlich und die Zellen bewegen sich voneinander unabhängig in Richtung und Geschwindigkeit. Bei der multizellulären Migration bewirken die (sich fortwährend bildenden und lösenden) lückenhaften und instabilen Zell-Zell-Verbindungen eine koordinierte Bewegung einer großen Anzahl sich hintereinander verlagernder Zellen. Hingegen erfahren während der kollektiven Bewegung, bei der die Zell-Zell-Verbindungen der vorderen mit den nachfolgenden Zellen intakt sind, die Zellen einen mechanischen Zusammenhalt. Die Beibehaltung der Zell-Zell-Verbindungen steigert die multizelluläre Koordination (Friedl and Wolf 2009).

Die Verbindung mit der ECM wird durch spezifische Oberflächenrezeptoren vermittelt, von denen die Familie der Integrine (Shattil et al., 2010) sowie Syndekane (Transmembran-Proteoglykane) die Hauptrepräsentanten darstellen. Ihre spezifische Anordnung und die Interaktion mit unterschiedlichen Partnern bringen eine Vielfalt an Verbindungsarten hervor, die das (mit Microtubuli assoziierte) Actinzytoskelett mittels Linkermolekülen an den Matrixkomponenten verankern. Es existieren neben mechanisch-unterstützenden (Hemidesmosomen) noch kontraktile und protrusive Zell-Matrix-Komponenten sowie fokale Verankerungen (Adams, 2002).

Die Größe und Stärke der fokalen Adhäsionen hängt von der Umgebung der Zelle ab und resultiert in einer Anpassung der Form der wandernden Zelle. So weisen die in zweidimensionaler Umgebung migrierenden Zellen in der basalen Fläche deutliche Fokalkontakte auf. Mit dem Übergang zu einer teilweise dreidimensionalen Matrix werden die Fokalkontakte kleiner und ihre Zusammensetzung ändert sich. *In vivo* dagegen, wenn die Zellen komplett in die Matrix eingebettet sind, können die fokalen Adhäsionen nicht detektiert werden (Fralely et al., 2010).

Extrazellulär werden die Adhäsionen durch verschiedene Proteasen wie Matrixmetalloproteasen (MMPs) oder Cathepsine (CTS) (Obermajer et al., 2008) gelöst, welche auch die Pro-MMPs spalten und aktivieren können (Punturieri et al., 2000), oder Sheddasen der ADAM-Familie (Franzke, 2002).

1.4.4 Proteolytischer Umbau der extrazellulären Matrix

Bei der zweidimensionalen Migration in einer Ebene ist das einseitige, nicht andauernde Anhaften an das Substrat und eine abgeflachte, ausgebreitete Zellmorphologie mit einem führenden Lamellipodium kennzeichnend. Im Gegensatz dazu erfahren die in dreidimensionalen Strukturen der extrazellulären Matrix migrierenden Zellen

charakteristische Veränderungen wie z.B. eine spindelförmige Gestalt, eine Ausbildung von zylindrischen Pseudopodien sowie eine Anpassung an die schmalen Lücken des Substrates durch Formänderung. Zusätzlich können proteolytische Enzyme sezerniert werden. (Friedl and Wolf, 2009).

Der proteolytische Abbau der extrazellulären Matrix ist in Geweben, in denen die Zellen trotz maximaler Deformation die Matrixporen nicht durchdringen können, obligatorisch und zugleich das Markenzeichen der mesenchymalen Migration (Friedl and Wolf, 2009). Dieser Umbau wird überwiegend durch Matrixmetalloproteasen (MMPs) gesteuert, eine Familie aus mehr als 25 Zink-abhängigen endogenen, proteolytischen Enzymen.

Die Expression der MMPs wird u.a. durch Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF β , Zytokine (z.B. IL-1 und TNF), Glucocorticoide und Retinoide gefördert. Dabei spielen bestimmte Transkriptionsfaktoren wie AP-1, PEA3, NF- κ B und STAT eine wichtige Rolle. Andere Regulatoren der MMPs sind endogene Inhibitoren wie TIMP1-4, α 2-Macroglobulin, Membran-gebundenes RECK 8 (*reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs*) und Thrombospondin (THBS1/2) sowie Proteasen, welche die MMP-Pro-Domänen abspalten. Die Funktion der MMPs beinhaltet außer der Degradation der extrazellulären Matrix die Freisetzung bzw. die Prozessierung von Wachstumsfaktoren (Szarvas et al., 2011). Deshalb beeinflussen MMPs auch indirekt die Proliferation, Apoptose, epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und Migration von Zellen.

1.4.5 EMT

Die Epithelzellen *in vivo* unterziehen sich der Restitution (eine Ausnahme bilden die Einzelzelldefekte) durch einen Wechsel ihrer Polarität von apikal-basal polarisierten Zellen zu planar-polaren, migrierenden Zellen (Etienne-Manneville, 2008). Unter Umständen können die epithelialen Zellen dabei die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) erfahren (Hay, 1995; Savagner et al., 2005; Moreno-Bueno et al., 2008; Acloque et al., 2009).

Die EMT wurde *in vivo* zum ersten Mal im Laufe der Embryonalentwicklung beobachtet und beschreibt biologische Vorgänge, die es einer apikal-basal polarisierten Epithelzelle ermöglichen einen mesenchymalen Phänotyp anzunehmen. Dieser beinhaltet die Migrationskapazität, Invasivität, Resistenz gegenüber Apoptose (Anoikis) und die Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix (Kalluri and Weinberg, 2009). Die EMT entspricht somit einer Umwandlung von Epithelzellen zu fibroblastoiden Zellen, welche sich durch eine veränderte, mesenchymale Genexpression auszeichnen (Abb. 5) (Huber et al., 2005; Yang and Weinberg, 2008; Lee et al., 2006; Moreno-Bueno et al., 2006; de Wever et al., 2008). Allerdings liefern diese Marker nicht immer klare Aussagen über den Zustand der Zellen und bis heute gibt es keine eindeutigen Marker für mesenchymale Zellen (Chai et al., 2010).

Die EMT, die während der Implantation, Embryogenese und Organentwicklung auftritt, wird als Typ1-EMT bezeichnet (Kalluri and Weinberg 2009). Der Übergang von epithelialen zu mesenchymalen Zellen, der mit Wundheilung und Organfibrose assoziiert ist, wird dagegen als Typ2-EMT charakterisiert. Nach der Reepithelialisierung durch die Rückumwandlung der Zellen via MET (mesenchymal-epitheliale Transition) ist der Vorgang abgeschlossen. Eine chronische Entzündung (Fibrose) hingegen kann zu einem Funktionsverlust des Organs durch übermäßiges Wachstum des Bindegewebes führen, z.B. bei einer Lungen- oder Leberfibrose (Kim et al., 2006; Zeisberg et al., 2007(a/b); Kalluri and Weinberg 2009). Der dritte Subtyp, die Typ3-EMT, wird mit Tumorwachstum assoziiert und tritt bei Zellen auf, die sich genetisch und epigenetisch von den untransformierten unterscheiden. Mutationen von Onkogenen sowie von Tumorsuppressorgenen fördern dabei die Entfaltung dieses Mechanismus und die so transformierten Zellen zeigen ein invasives und metastasierendes Verhalten (Kalluri and Weinberg 2009).

Unter inflammatorischen Bedingungen können epitheliale Zellen eine partielle EMT eingehen und dabei die Expression bestimmter epithelialer Gene beibehalten (Savagner, 2010). Die Signaltransduktionswege, die an der Induktion der epithelialen-mesenchymalen Transition beteiligt sind, beinhalten u.a. die Signalweiterleitung durch Rezeptor-Tyrosinkinasen (via

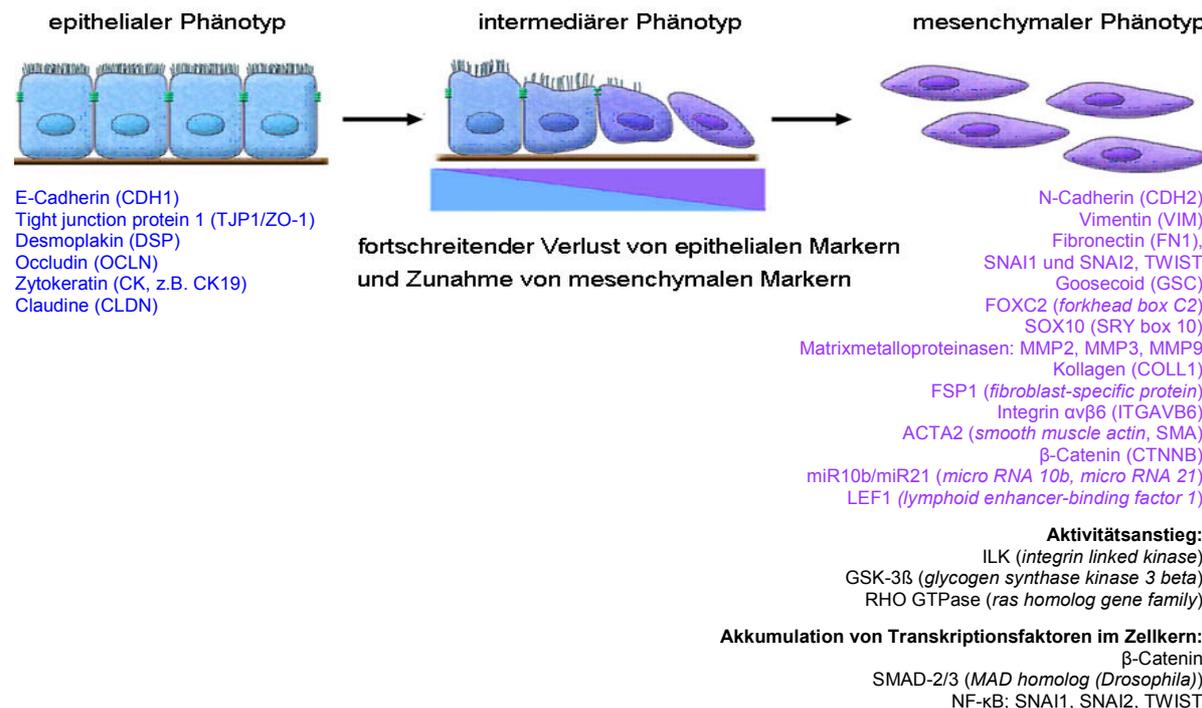


Abb. 5: EMT umfasst den funktionellen Übergang von polarisierten Epithelzellen in die mobilen, extrazelluläre Matrix sezernierenden, mesenchymalen Zellen (die typischen Marker sind in entsprechenden Farben aufgelistet; modifiziert nach Kalluri and Weinberg, 2009).

EGF, FGF, HGF, PDGF, IGF), Integrine, WNT, NF- κ B und TGF β oder PEZ (*protein tyrosine phosphatase Pez*). Diese schließen die Signalweiterleitung von AKT (*RAC alpha serine/threonine protein kinase*), GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*), RHO-GTPase- und SMAD ein und resultieren in einem migratorischen Verhalten der Zelle (Savagner, 2010).

1.4.6 Apoptose/Nekrose

Einen wichtigen Mechanismus zur Beseitigung von geschädigten bzw. funktionsunfähigen Zellen, die während oder unmittelbar nach einer Verletzung entstehen können, sowie zur Verhinderung von Entzündungen stellt die Apoptose dar. Dieser physiologische Vorgang bezeichnet den programmierten Zelltod ohne Schädigung des Nachbargewebes. Morphologisch wird dieser Prozess durch die Lösung der Zell-Zell-Verbindungen, Schrumpfen der Zelle, Fragmentierung des Zellkerns und Bildung von apoptotischen Körperchen charakterisiert. Die apoptotischen Zellen setzen, unter Beibehaltung der Membranintegrität, während des Sterbeprozesses u.a. Chemokine wie z.B. IL-8 oder MIP-2 (*macrophage inflammatory protein*, auch CXCL2/CXCL3 genannt) frei. Dies fördert die Akkumulation von Makrophagen um die absterbenden Zellen und ihre Eliminierung via Phagozytose, die auch von benachbarten epithelialen Zellen eingeleitet werden kann (Henson and Hume, 2006; Jones and Gores, 1997).

Zu den Signaltransduktionswegen, welche die Apoptose auslösen können, zählen der extrinsische (oder *death receptor*-Signalweg) und der intrinsische (mitochondriale) Signalweg, wobei die beiden Signalwege miteinander in Verbindung stehen und sich gegenseitig beeinflussen können. Zusätzlich existiert noch ein Perforin-Granzym-Weg, welcher das Zellsterben durch das Granzym A oder Granzym B (GZM A/B) initiiert. Die finale Phase des intrinsischen, extrinsischen und Perforin-Granzym-Signalweges erfolgt durch die Aktivierung der exekutiven Caspasen (CASP), welche die zytoplasmatischen Endonukleasen und Proteasen aktivieren und so zur Zellkern- und Zytoskelettdegradation führen. Neben den apoptotisch wirkenden Mitgliedern der intrazellulären Caspasen-Familie sind einige ihrer Vertreter an der Einleitung der inflammatorischen Prozesse beteiligt (Lieberman and Fan, 2003, Trapani and Smyth, 2002; Elmore, 2007).

Die gleichen schädigenden Einflüsse, die eine Apoptose hervorrufen können, führen in hohen Dosen oder nach langer Einwirkung zur Nekrose. Bei der Nekrose, dem „unprogrammierten“ Zelltod, kommt es zum Anschwellen und Aufplatzen der Zelle, wobei die aus dem Zytoplasma freigesetzten Stoffe den Entzündungsprozess initiieren. Wenn die apoptotischen Zellen nicht sofort entfernt werden, unterliegen sie dem postapoptotischen Zelltod (sekundäre Nekrose) und können ebenfalls zur Entzündung führen. Oft finden sich daher bei großflächigen Verletzungen sowohl nekrotische als auch apoptotische Zellen; dabei treten sowohl pro- als auch antiinflammatorische Signale auf (Henson and Hume, 2006). Obwohl sich die Mechanismen der Apoptose und Nekrose morphologisch unterscheiden, zeigen sich Überschneidungen zwischen diesen beiden Prozessen. Es gibt Hinweise, dass Nekrose und Apoptose zwei morphologische Ausdrucksformen eines gemeinsamen biochemischen Mechanismus sind, der als "Apoptose-Nekrose-Kontinuum" bezeichnet werden kann (Zeiss, 2003).

1.5 Untersuchung der Wundheilung *in vitro*

Da die kollektive Zellmigration eine wichtige Rolle für viele biologische Prozesse (u.a. in der Wundheilung) spielt, wurden zahlreiche Methoden entwickelt, die auf mechanischen, chemischen, optischen oder elektrischen Ansätzen zur Erstellung von Modellwunden beruhen. Diese Ansätze unterscheiden sich erheblich in der Schwierigkeit der Durchführung bzw. Datenanalyse, dem Durchsatz, der Reproduzierbarkeit sowie der Fähigkeit, mehrere voneinander abhängige Parameter gleichzeitig zu untersuchen (Multiplexverfahren) (Riahi et al., 2012).

Der mechanische Wundheilungsassay ist eine der frühesten Methoden, die für Studien der gerichteten Migration *in vitro* entwickelt wurden. Durch die z.B. mit einer Rasierklinge herbeigeführte mechanische Schädigung des Monolayers kann eine Migration der dem Verwundungsrandgebiet benachbarten Zellen initiiert werden. Im weiteren Verlauf kann es dabei zur Reparatur des zerstörten Gebietes durch Wanderung und Proliferation dieser Zellen kommen. Auf diese Weise kann die *in vivo* Migration, besonders von Epithelzellen, zu einem gewissen Grad imitiert werden; diese Methode ist daher als Modellsystem weit verbreitet und anerkannt. Dabei können die in die zu restituierende Fläche eingewanderten bzw. durch Teilung neuentstandenen Zellen gezählt oder die geschlossene Fläche vermessen werden. (Rodriguez et al., 2005).

Als *in vitro*-Modell der Restitution im Darm hat sich die artifizielle Verwundung der Monolayer von untransformierten, epithelialen IEC-6- und IEC-18-Zellen etabliert (McCormack, 1992). Für diese Modelle wurde u.a. eine restitutionsunterstützende Wirkung von EGF und TGF β (Dignass and Podolsky, 1993, Dürer et al., 2007) sowie die motogene Wirkung von TFF3 beschrieben (Dürer et al., 2007).

1.6 Ziele der Arbeit

Zum genauen Verständnis der ablaufenden Prozesse während der Zellmigration sind generelle Vergleiche der Genexpression zwischen migrierenden und stationären Zellen elementar. Bisher sind nur sehr wenige Arbeiten zur systematischen Untersuchungen von Expressionsänderung einzelner Gene in migrierenden Zellen erschienen. Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer Methode zur Trennung von migrierenden und stationären Zellen nach Verwundung epithelialer Monolayer unterschiedlicher Zelllinien.

Die abgetrennten Zellen der Restitutions- bzw. der Verwundungszone sowie die stationären Zellen sollten dann einer vergleichenden Genexpressionsanalyse unterzogen werden. In Fortsetzung von Vorarbeiten am Institut (Dürer et al., 2007; Oertel et al., 2001; Chwieralski et al., 2004) sollte mit der entwickelten Methode auch der Einfluss der potentiellen Motogene TFF2 und TFF3 auf die Genexpression epithelialer Zellen untersucht werden und mit der Wirkung von EGF verglichen werden. Ein besonderes Augenmerk lag auf einer potentiell unterschiedlichen Wirkung von nativen und rekombinanten TFF-Peptiden. Für TFF2 sollte mit Hilfe von CXCR4-exprimierenden HEK-Zellen eine, von Dubeykovskaya et al. (2009) beschriebene, mögliche motogene Wirkung von TFF2 über den CXCR4-Rezeptor geprüft werden.

Ein weiterer Schwerpunkt in der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung einer möglichen entzündungsmodulierenden Wirkung von TFF3 (Granes et al., 2002) auf die verwundeten Zellen (Behandlung der Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ und rekombinanten TFF-Peptiden).

Ebenfalls sollte eine mögliche Expression von TFF-Peptiden in Zellen des Immunsystems am Beispiel von Mikrogliazellen (inklusive Behandlung mit LPS) untersucht werden.

2 Materialien

2.1 Zelllinien

Die untersuchten Zelllinien oder Zellkulturen (Tab. 1) zeigen ein adhärentes oder im Falle der BV-2-Zelllinie ein semiadhärentes Wachstum. Mit Ausnahme von BV-2-Zellen, die amöboid erscheinen, weisen alle anderen Zelllinien eine epitheliale Morphologie auf.

Tab. 1: Zelllinien [Europäische Sammlung der Zellkulturen (ECACC), ICLC Animal Cell Lines Database (ICLC)]

Zelllinie/Kat.Nr.	Bezugsquelle	Herkunft	Spezies
A549 ECACC 86012804	ECACC	Lungenkarzinom	Mensch
AGS ECACC 89090402	ECACC	Magenadenokarzinom	Mensch
BEAS-2B ECACC 95102433	ECACC	normales Bronchialepithel transformiert mit SV40/Adenovirus 12 Hybrid	Mensch
BV-2 ICLC ATL03001	Xiao Qian Wang, Institut für Immunologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg	primäre Microglia transfiziert mit v-raf/v-myc-J2 Retrovirus (Blasi et al., 1990)	Maus (C57BL/6)
HEK.CD4.403/CXCR4	Martine Biard, Institut de Biologie, Montpellier, France	HEK-293-Zellen (ECACC : 85120602, embryonale Niere, transfiziert mit Adenovirus 5 DNA) transfiziert mit pcDNA3 Neo + verkürzte Form vom CD4-Gen (ohne zytoplasmatische Domäne und mit pcDNA3 Zeo +CXCR4-Gen (Ahr et al., 2005)	Mensch
HEK.CXCR4	Martine Biard, Institut de Biologie, Montpellier, France	HEK-293-Zellen (ECACC:85120602, embryonale Niere) transfiziert mit pcDNA3 Zeo +CXCR4-Gen (Ahr et al., 2005)	Mensch
IEC-6 ECACC 88071401	ECACC	normale Krypten aus Jejunum	Ratte
IEC-18 ECACC 88011801	ECACC	normale Krypten aus Ileum	Ratte

2.2 Tierische Gewebeproben

Die für die Zellgewinnung verwendeten murinen Organe entstammen den Tieren des Stammes 129S2/SvHsd. Die Präparation von Antrum und Corpus erfolgte nach der Entnahme der Organe durch eine qualifizierte Fachkraft des Instituts.

2.3 Humane Biopsieproben

Bei den für die Zellgewinnung verwendeten Proben handelt es sich um endoskopisch entnommene Biopsien von 2 Patienten zur histologischen Begutachtung der Magenschleimhaut. Hierfür wurden die Proben an der Universitätsklinik für Gastroenterologie und Hepatologie, Universitätsklinikum Magdeburg (Direktor: Univ-Prof. Dr. med. P. Malfertheiner) aus der kleinen und großen Krümmung des Corpus und Antrums des Magens entnommen (genehmigt durch Ethikkommission der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg an der Medizinischen Fakultät; Kouznetsova et. al., 2007).

2.4 Materialien für die Kultivierung von Zellen

Die verwendeten Medienzusätze für die Zellkultur sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

Material/Anwendung	Bezeichnung/Kat.-Nr.	Hersteller
Antibiotika , andere Reagenzien	Antibiotic Antimycotic Solution (100×) 10,000 u penicillin, 10 mg streptomycin, 25 µg amphotericin B per mL A5955-100ML	Sigma-Aldrich, München
	c BSA fraction V K41-001	PAN Biotech, Aidenbach
	collagen R Typ I, PO6-20166	PAA Cell Culture Company, Cölbe
	collagenase 17018-029	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
	dispase 17105,041	PAN Biotech, Aidenbach
	Dulbecco's PBS (1x) H15-002	PAA Cell Culture Company, Cölbe
	fetal bovine serum gold A15-151	PAA Cell Culture Company, Cölbe
	G418-BC	Biochrom, Berlin
	Gentamicin solution G1272-100ML	Sigma-Aldrich, München
	HBSS Hanks's balanced salt solution 1x 14170	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
	L-glutathione reduced G6013-5G	Sigma-Aldrich, München
	MycoKill	PAA Cell Culture Company, Cölbe
	NEA-non essential amino acids (100x) K0293	Biochrom AG, Berlin
	penicillin-streptomycin solution stabilized P4333	Sigma-Aldrich, München
	viable AC-2 serum free	Cell Concepts, Berlin
	sodium pyruvate L0473	Biochrom AG, Berlin
	trypsin inhibitor from <i>Glycine max</i> (Soybean)	Sigma-Aldrich, München
	zeocin R250-05	Invitrogen, Karlsruhe
Medien	DMEM high glucose (44,5 g/L) E15-009	PAA Cell Culture Company, Cölbe
	DMEM/Ham's F12 E15-012	PAA Cell Culture Company, Cölbe
	Leibovitz's L-15 E15-020	PAA Cell Culture Company, Cölbe
	RPMI 1640 ready mix R15-802	PAA Cell Culture Company, Cölbe
	RPMI 1640 E15-041	PAA Cell Culture Company, Cölbe
	Quantum 286 for epithelial cells U15-818	PAA Cell Culture Company, Cölbe
Filtrieren von Medien und Peptiden	Milllex-OR 0,22 µM, sterile	Millipore, Schwalbach
	Milllex-GV 0,22 µM protein-low binding, sterile	Millipore, Schwalbach
Kultivierung von Zellen	Cellstar 6-, 12, 24, 96-well Platten Cellstar Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² Cellstar Zellkulturschalen 100 mm, 35 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	Zellheber 18 c 3008	Corning/Costar (Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
	Zellschaber 18 mm schwenkbar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettieren von Volumina in µL-Bereich	safeseal tips premium 10, 100, 200, 1000,	Biozym Biotech Trading GmbH, Oldendorf
Pipettieren von Volumina in mL-Bereich	Serologische Pipetten 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 ml	VWR International, Darmstadt

Material/Anwendung	Bezeichnung/Kat.-Nr.	Hersteller
Zerkleinern von Gewebe	disposable scalpel	Feather Safety Razor co., LTD (PFM, Köln)
Immunfluoreszenz und PAS-Färbung	Lab-TEK glass chamber slides/1-, 2-, 4-, 8-well	Nunc (Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold)
Zellkultureinsätze für Boydenkammer-Experimente	cell culture inserts: 0,4 µm pore / 24 well 0,8 µm pore / 12 well 0,8 µm pore / 24 well	BD (Becton Dickinson and Company)
	cell culture 0,8 µm pore 24 well-inserts	SPL-life Sciences, Korea

2.5 Peptide und Antikörper

Die nachfolgend aufgeführten Peptide und Feinchemikalien (Tab. 3, Tab. 4, und Tab. 5) wurden jeweils nach den Angaben des Herstellers gelöst, aliquotiert und bei -20°C oder -80°C gelagert. Die Antikörper, die nach der Anweisung des Herstellers eingefroren werden konnten, wurden ebenfalls aliquotiert und bei -20°C gelagert. Alle anderen Antikörper wurden bei 4°C aufbewahrt. Die Anfärbung der Zellkerne wurde mittels Höchst 33258-Lösung der Firma Sigma-Aldrich (München) durchgeführt.

Tab. 3: Peptide, Wachstumsfaktoren und andere Stimulantien

Bezeichnung	Bezugsquelle
recombinant human epidermal growth factor (EGF) CB1101001	PAN Biotech, Aidenbach
recombinant human epidermal growth factor (EGF) E9644	Sigma-Aldrich, München
human TNF-alpha (tumor necrosis factor alpha) CB1112011	PAN Biotech, Aidenbach
recombinant human interleukin 1β 19401-5UG	Sigma-Aldrich, München
mitomycin C from <i>Streptomyces caespitosus</i>	Sigma-Aldrich, München
recombinant human/rhesus macaque/feline SDF1alpha CXCL12/SDF-1a (stromal derived factor) 350-NS	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
rekombinantes humanes TFF2-glykosyliert aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lars Thim, Novo Nordisk A/S, Måløv, Denmark (Thim et al., 1993)
rekombinantes humanes TFF3-Monomer aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lars Thim, Novo Nordisk A/S, Måløv, Denmark (Thim et al., 1995)
rekombinantes humanes TFF3-Dimer aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lars Thim, Novo Nordisk A/S, Måløv, Denmark (Thim et al., 1995)
gereinigtes humanes TFF3-Monomer, TFF3-Dimer und TFF3-FCGBP-Heteromer	Timo Albert, Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Albert et al., 2010)
GM1489 364200 MMP-Inhibitor	Calbiochem/Merck, Darmstadt

Tab. 4: Primärantikörper (WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz, AS: Aminosäure)

Antigen/Größe des Antigens	Typ/ Verdünnung	Reaktivität gegenüber	Originalbezeichnung/ Hersteller
N-terminale Region universell für alle Actine/ 42 kDa	Kaninchen polyklonal WB 1:50 - 1:200	Mensch, Ratte, Maus	anti-actin (20-33), IgG fraction of antiserum, A5060/ Sigma-Aldrich, München
Humanes Actin (ACTB), Nähe des N-Terminus/ 42 kDa	Kaninchen polyklonal WB 1:200	Mensch, Maus	beta actin (N-21) sc-130656/ Santa Cruz, Heidelberg
Acta2, N-terminales synthetisches Decapeptid des α-smooth muscle Actin / 43 kDa	Maus monoklonal WB 1:500 IF 1:100	Ratte	monoclonal anti-actin a-smooth muscle antibody produced in mouse clone 1A4, purified immuno-globulin A5228/ Sigma-Aldrich, München
Maus β-Catenin (CTNNB) AS: 571-781/ 92 kDa	Maus monoklonal WB 1:200 IF 1:100	Mensch, Ratte	purified mouse anti-β-catenin 610153, BD Transduction Laboratories/ BD Biosciences Pharmingen

Antigen/Größe des Antigens	Typ/ Verdünnung	Reaktivität gegenüber	Originalbezeichnung/ Hersteller
Humanes E-Cadherin (CDH1), zytoplasmische Domäne/ 120 kDa	Maus monoklonal WB 1:200 - 1:1000 IF 1:200	Mensch, Ratte	purified mouse anti-E-Cadherin 610181 / BD Transduction Laboratories/ BD Biosciences Pharmingen
Humanes Fibronectin (FN1)/ 220 kDa	Kaninchen polyklonal WB 1:200 - 1:400 IF: 1:200	Mensch	rabbit anti-FN1 F33648/ Sigma-Aldrich, München
Human MMP1 (matrix metalloproteinase 1) Nähe des C-Terminus pro-Form: 52 kDa (unglykosyliert) und 57 kDa (glykosyliert); aktive Form: 42 kDa (unglykosyliert) und 47 kDa (glykosyliert)	Kaninchen polyklonal WB 1:100-1:200 IF 1:100	Mensch	polyclonal antibody to MMP-1 purified AP15652PU-S/ Acris Antibodies, Herford
Ratte SDF-1 β / 10 kDa	Kaninchen polyklonal WB 1:200 IF: 1:50 - 1:100	Ratte, Maus	Purified Rabbit Anti-rat SDF-1 TP202 rabbit polyclonal IgG / Torrey Pines Boplabs Inc
anti-hTFF1-1; gegen Sequenz FYPNTIDV PEEECF/ 6,7 kDa	Kaninchen polyklonal WB: 1:2000 IF: 1:500	Mensch (Maus)	Kouznetsova et al., 2007
anti-hTFF2-1, gegen Sequenz FFPNSVEDCH/ ca 18 kDa (inkl. N-CHO)	Kaninchen polyklonal, WB: 1:1000 IF: 1:500	Mensch (Maus)	Jagla et al., 2000
anti-hTFF3-3, gegen Sequenz FKPLQEAECTF/ 6,6 kDa	Kaninchen polyklonal WB: 1:1000 - 1:2000 IF: 1-500 - 1:2000	Mensch (Ratte, Maus)	Hauser et al., 1993; Wiede et al., 1999; Albert et al., 2010
anti-mTff1-1, gegen Sequenz FHPMAIENTQEE ECPF/ 6,7 kDa	Kaninchen polyklonal WB: 1:500 - 1:1000 IF: 1:500	Maus	
anti-rTff3-3, gegen Sequenz EFVGLSPSQC MVPANVRVDCGYPTVTS EQCNNRGCCF/ 6,6 kDa	Kaninchen polyklonal WB: 1:500 IF: 1:500	Ratte (Maus)	
Humanes Vimentin (H-84) AS: 1-85/ 57 kDa	Kaninchen polyklonal WB 1:100 IF 1:50	Mensch, Ratte, Maus	Vimentin (H-84) sc-5565/ Santa Cruz, Heidelberg

Tab. 5: Sekundärantikörper (WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz)

Antigen / Verdünnung	Originalbezeichnung	Bezugsquelle
Kaninchen IgG IF: 1:100	anti-rabbit IgG (whole molecule), F(ab') ₂ fragment-Cy3 produced in goat C2306-1ML	Sigma-Aldrich, München
Maus IgG IF: 1:50 -1:100	anti-mouse IgG (Fc specific)-FITC antibody produced in goat F5897	Sigma-Aldrich, München
Ziege IgG WB: 1:2000	peroxidase horse anti-goat IgG(H+L) PI-9500	Vector Laboratories/ Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Kaninchen IgG WB: 1:4000	Peroxidase Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) PI-1000	Vector Laboratories/ Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Maus IgG WB: 1:2000	Peroxidase Horse Anti-Mouse IgG(H+L) PI-2000	Vector Laboratories/ Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching

2.6 Materialien für die molekularbiologischen Arbeiten

Chemikalien, die nicht in diesem Abschnitt aufgelistet, jedoch in den jeweiligen Abschnitten der Methoden aufgeführt sind, wurden im Reinheitsgrad *pro analysis* von folgenden Firmen bezogen: Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (München). Die Reagenzien und verwendeten Kits sind in Tab. 6 erfasst

Tab. 6: Verbrauchsmaterialien für die RNA- und Protein-Verarbeitung

Anwendung	Originalbezeichnung	Hersteller / Vertrieb
Anfärbung von Proteinen	Coomassie biosafe G-250 stain	Biorad, München
	Ponceau S	Merck, Darmstadt
Gelelektrophorese horizontal	Agarose for DNA electrophoresis research grade	Serva, Heidelberg
	1% Ethidiumbromidlösung (10mg/mL)	Merck, Darmstadt
	GeneRuler™ 1kb Plus DNA ladder, ready-to-use	Fermentas, St. Leon-Rot
	GeneRuler™ 50bp DNA ladder, ready-to-use	Fermentas, St. Leon-Rot
	6x Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Gelelektrophorese vertikal	30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1.(3029.1)	Roth, Karlsruhe
	TEMED	Roth, Karlsruhe
	APS	Roth, Karlsruhe
	peqGOLD Protein-Marker II	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
	precision plus protein standards all blue	Biorad, München
Immunfluoreszenz	Dako fluorescent mounting medium 2011-03	Dako, Hamburg
Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	UV-Küvetten micro PLASTIBRAND	Roth, Karlsruhe
	Quarzküvetten 6040-UV	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
Konzentrationsbestimmung von Proteinen	Biorad protein assay 500-0006	Biorad, München
	BCA protein assay reagent	Pierce Protein Research Products (Thermo Fisher Scientific, Bonn)
Mycoplasma-Test	MycoTrace Q052-020	PAA Cell Culture Company, Cölbe
PAS-Alcianblau-Färbung	Alcian Blau 8GX A3157	Sigma-Aldrich, München
	Schiff's Reagenz	Roth, Karlsruhe
	Dako faramount aqueous mounting medium	Dako, Hamburg
PCR	dNTP set	Fermentas, St. Leon-Rot
	i-StarTaq DNA-Polymerase	Intron Biotechnology (HIS Diagnostics GmbH, Freiburg)
	HotStar Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
	HotStar Taq Plus DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
	Ladepuffer 6x	Fermentas, St. Leon-Rot
	PCR-Reaktionsgefäße 200 µL	Kisker, Steinfurt
	PCR-Oligos	Metabion, Martinsried
	RediLoad	Invitrogen, Karlsruhe
RNA-Extraktion	InnuPREP RNA Mini Kit	Analytic Jena, Jena
	InnuPREP RNA Micro Kit	Analytic Jena, Jena
	RiboLock RNase-Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
	RNaseOUT recombinant ribonuclease inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
	RNase-Away	Roth, Karlsruhe

Anwendung	Originalbezeichnung	Hersteller / Vertrieb
RNA-Extraktion	RNA clean&concentrator	Zymo Research (HISS Diagnostics GmbH, Freiburg)
	RNase-freie DNase Deoxyribonuclease I	Fermentas, St. Leon-Rot
	RNase-freie DNase Deoxyribonuclease I	Invitrogen, Karlsruhe
	RNase-freie DNase Set Deoxyribonuclease I	Qiagen, Hilden
	RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
	Quick-RNA MiniPrep	Zymo Research (HISS Diagnostics GmbH, Freiburg)
RNA- und Protein-Extraktion	AllPrep RNA/Protein Kit	Qiagen, Hilden
	Ilustra TriplePrep Kit 28-9425-44 (für DNA/RNA/Protein)	GE Healthcare, München
	complete protease inhibitor cocktail tablets, Roche	Roche, Mannheim
	Ilustra TriplePrep Kit 28-9425-44 (für DNA, RNA, Protein)	GE Healthcare, München
	Trizol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Reverse Transkription	DNase I, RNase-free	Fermentas, St. Leon-Rot
	DNase I (RNase-free)	Invitrogen, Karlsruhe
	RevertAid H minus reverse transcriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
	DNase I (RNase-free)	Invitrogen, Karlsruhe
	RevertAid H Minus Reverse Transcriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
	RNase-free DNase set	Invitrogen, Karlsruhe
	RNase-free DNase set	Invitrogen, Karlsruhe
	Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Invitrogen, St. Leon-Rot
	Oligo(dT)18 Primer	Fermentas, St. Leon-Rot
	Safe-Lock Tubes 0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL	Eppendorf, Hamburg
	Safe-Lock Tubes (RNase, DNase, Pyrogen-frei) 0,5 mL und 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg
	Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
	Western Blotting	Gel-Blotting Papier BF2
Luminol		Fluka, Neu-Ulm
p-Cumarsäure		Fluka, Neu-Ulm
peqGOLD Protein-Marker II		PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Precision Plus Protein Standards All Blue		Biorad, München
Whatman PROTRAN BA79 Nitrozellulose Transfermembran		Whatman, Dassel

2.7 Geräte

Tab. 7: Geräte

Gerät/Funktion	Bezeichnung	Hersteller / Vertrieb
Brutschränke	Hera Cell 150	Haereus, Hanau
	US Autoflow	Nuaire (Integra Biosciences GmbH, Fernwald)
Gelelektrophorese horizontal	Agagel Maxi	Biometra, Göttingen

Gerät/Funktion	Bezeichnung	Hersteller / Vertrieb
Gelelektrophorese horizontal	Casting System Compact L/XL	Biometra, Göttingen
	Heinzinger Economy Line LNG 350 06	Herolab, Wiesloch
	Mini-Protean	Biorad, München
	PowerPac	Biorad, München
	Elektrophorese Supplier EPS 3500	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Geldokumentation	Herolab E.A.S.Y RH3	Herolab, Wiesloch
Homogenisation	Precellys 24	Bertin Technologie (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
	Ultraturrax T25 basic	IKA Werke GmbH, Staufen
Heizen/Schütteln/Rühren	Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
	IKA Magnetrührer COMBIMAG REO	IKA Werke GMBH, Staufen
	Magnetrührer RCT Bank	IKA Werke GmbH, Staufen
	Swip	Edmund Bühler (Omnilab, Bremen)
Konzentrationsmessung	NanoDrop 1000 Spektrophotometer	Thermoscientific (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
	Libra S12 Spektrophotometer	Biochrom Ltd., (Omnilab, Bremen)
Mikrowelle	Micromat Txp EEH8733	AEG-Elektrolux, Nürnberg
Mikroskopie	Axiovert 135, Zeiss	Zeiss, Göttingen
	Nikon EH-21	Nikon, Göttingen
	Axiovert 40,	Zeiss, Göttingen
	Axiophot /Axiocam HRC	Zeiss, Göttingen
Pipettieren	10 µL, 50 µL, 100 µL	Eppendorf, Hamburg
	2 µL, 200 µL, 1000 µL	Gilson, Limburg
Reverse Transkription	Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte (Omnilab, Bremen)
PCR/RT	Robocycler Gradient 96	Stratagene, Heidelberg
Proteintransfer	Semi Dry Blotter 20 x 20	Biostep, Jahnsdorf
	Heinzinger Economy Line LNG 350 06	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
	Heidolph Polymax 1040	Roth, Karlsruhe
Steriles Arbeiten	Hera Safe	Haereus, Hannau
	Biological Safety Cabinets Class II	Nuaire (Integra Biosciences GmbH, Fernwald)
Waage	Sartorius Analytic A2000S	Sartorius, Göttingen
Western-Blot: Dokumentation und semiquantitative Auswertung von Gelen	GeneGnome	Syngene Bioimaging Synoptics Ltd., Cambridge, England (VWR International GmbH, Darmstadt)
Vortexen	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Si (Roth, Karlsruhe)
	Lab Dance	IKA Werke GmbH und Co. KG , Staufen
Zentrifugation	Mikro 200R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
	Universal 30RF	Hettich Lab Technology, Tuttlingen

Gerät/Funktion	Bezeichnung	Hersteller / Vertrieb
Zentrifugation	Universal 329R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
	Biofuge primo R	Haereus, Hanau
	Micro Centrifuge	Roth, Karlsruhe

2.8 Primer

Die Primer in den Tabellen 16-18 (siehe Anhang) wurden mit der Software Primer3 (<http://jura.wi.mit.edu/rozen/papers/rozen-and-skaletsky-2000-primer3.pdf>) konstruiert. Für die Annealing Temperatur wurden dabei 57°C oder 60°C gewählt. Die übrigen Primer (grau unterlegt) wurden von anderen Mitarbeitern des Instituts übernommen. Die Oligos wurden von der Firma Metabion International AG, Martinsried, bezogen.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in den herkömmlichen 25 bzw. 75 cm²-Zellkulturflaschen oder in 12 bzw. 24-Well-Platten im Brutschrank bei 37°C, unter 5-6,5% Kohlenstoffdioxid und 95-97,5% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Sämtliche Arbeiten, die direkten Kontakt mit Zellen erforderten, wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Je nach Wachstum der Zellen wurde das Medium alle 2-4 Tage gewechselt. Dabei wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 2-3x mit HBSS gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

3.1.1 Passagieren der Zellen

Für das Passagieren der Zellen zum Zwecke der Stammhaltung oder zum Ansetzen der Experimente, wurde zunächst das verbrauchte Medium entfernt und die Zellen wurden bis zu 3x mit HBSS gewaschen; der letzte Waschschrift dauerte bis zu 30 sec. Danach wurden die Zellen mit 50 µL vorgewärmter (37°C) Trypsinlösung (0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA) pro cm² der Zellkulturfläche versetzt. Die Trypsinierung dauerte dann 3-7 Minuten bei 37°C. Je nach Zellart wurden die Zellen bei unvollständiger Ablösung zusätzlich mit Hilfe eines Schabers oder Zellhebers abgelöst. Danach erfolgte die Zugabe des frischen, vorgewärmten (37°C) Mediums (80 µL pro cm² der Zellkulturfläche). Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 4°C und 800 rpm (Biofuge primo R, Haereus) wurde das Zellpellet in frischem Medium durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die erhaltene Suspension wurde entweder der Zellzahlbestimmung unterzogen oder 1:2 bis 1:30 geteilt und in entsprechender Menge des Mediums bei 37°C und 5-6,5% CO₂ weiter kultiviert.

3.1.2 Zellzahlbestimmung

Für die Aussaat einer definierten Anzahl der Zellen wurde die Zelldichte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt, um so die erforderliche Konzentration einzustellen. Dabei wurden 20 µL der Zellsuspension in die Zellkammer überführt und die Zellen wurden unter Anwendung eines inversen Lichtmikroskopes bei 100-facher Vergrößerung gezählt. Für jede Bestimmung wurden die Zellen von jeweils 16 Kleinquadraten summiert um die Zellzahl über einem Großquadrat zu erhalten. Die Gesamtzellzahl wurde mit dem Mittelwert von mindestens zwei Großquadraten errechnet, unter Anwendung der Formel:

Zellzahl/mL = Mittelwert der Zellzahl aus 2 Großquadraten x Verdünnungsfaktor x Kammerkonstante (10⁴)

3.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgte in einem Wasserbad bei 37°C. Der Inhalt des 2 mL Einfriergefäßes wurde in 9 mL entsprechenden Mediums resuspendiert und anschließend 3 min bei 4°C und 800 rpm (Biofuge primo R, Haereus), zentrifugiert. Zum vollständigen Auswaschen des im Einfriermedium enthaltenen DMSO wurde dieser Vorgang wiederholt und das Pellet in Kultivierungsmedium resuspendiert.

Für das Einfrieren der Zellen wurde das entsprechende Medium zu 70% verwendet und mit 20% FCS sowie 10% DMSO, ohne Antibiotikazusatz, versetzt. Die Zellen wurden nach dem Waschen mit HBSS entweder durch Zugabe von Trypsinlösung oder zusätzlich mechanisch mit einem Schaber vom Gefäßboden abgelöst und in 15 mL Röhrchen 3 min bei 4°C und 800 rpm (Biofuge primo R, Haereus) zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in Einfriermedium resuspendiert und es wurden jeweils bis 5 x 10⁶ Zellen/mL in die 2 mL Einfriergefäße übertragen und in einer Einfrierbox für 24 h bei -80°C gelagert. Danach erfolgte die Lagerung in flüssigem Stickstoff.

3.1.4 Kontrolle der Zellkultur auf Mykoplasmen

Die Untersuchung auf das Vorhandensein von Mykoplasmen erfolgte mittels eines PCR-Kits (MycoTrace, PAA). Dazu wurde 1 mL Medium der Zellkultur entnommen und bei 15000 rpm (Universal 30RF, Hettich Lab Technology) abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 100 µL sterilem deion. Wasser resuspendiert und 3 min gekocht. Anschließend wurde weiter mit einer PCR-Nachweisreaktion der Mycoplasmengene, nach Herstellerangaben, verfahren.

3.2. Kultivierung der Zellen

3.2.1 Gewinnung und Kultivierung von Zellen aus den humanen Biopsieproben

Die humanen Magenbiopsieproben wurden direkt nach der Entnahme in Leibovitz's L15-Medium mit 1% (v/v) Streptomycin-Penicillin auf Eis gelagert und vor der Verarbeitung kurz in steriler 0,5% Natrium-Hypochloritlösung inkubiert und weiter, in Anlehnung an das Protokoll von Smoot et al. (2000), bearbeitet. Die Proben wurden in eine 78 cm²-Zellkulturschale überführt, mit 5 mL Kollagenase-Dispase-Medium bedeckt und mit einem sterilen Skalpell in ca. 1 mm kleine Teile geschnitten. Die geschnittenen Teile wurden dann in 20 mL Kollagenase-Dispase-Medium, in 50 oder 100mL Glasflaschen übertragen. Diese wurden dann bei 150-300 rpm (IKA-COMBIMAG REO Drehzahl Electronic) 60-90 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1500 rpm (Biofuge primo R, Haereus), 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1x PBS gewaschen und erneut bei 1500 rpm (Biofuge primo R, Haereus) 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann in Quantum 286 + je 1% Streptomycin/Penicillin/Amphotericin-B (Gentamycin) resuspendiert und in mit Kollagen I beschichtete 24-Well-Petrischalen ausplattiert.

Um die Verunreinigung der aus dem Magen gewonnenen Epithelzellen mit anderen Zelltypen zu minimieren wurde die Sedimentationsmethode angewandt. Bei dieser Methode sinken die mesenchymalen Zellen früher als die epithelialen Zellen zu Boden. Durch mehrmaliges Übertragen der Zellsuspension können so epitheliale Zellen angereichert werden. 30 min nach der ersten Ausplattierung wurden die Zellen der Suspension in neue Wells übertragen. Nach weiteren 30 min erfolgte dies noch ein zweites Mal. Dabei wurden die noch nicht am Gefäßboden anhaftenden Zellen übertragen und für die Weiterkultivierung beibehalten.

Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit frischem Quantum 286 + je 1% Streptomycin/Penicillin/Amphotericin-B (Gentamycin) versetzt. Danach wurde das Medium alle 2-3 Tage gewechselt, ab dem achten Tag nach der ersten Ausplattierung jedoch ohne Streptomycin/Penicillin/Amphotericin-B-Zusatz. Die primären Zellen wurden bei 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert und ein- bis zweimal wöchentlich passagiert. Die Dauer der Kultivierung betrug ca. 4 -5 Wochen.

Die primären Zellen und die daraus entstandenen primären Kulturen wurden bei 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten.

Kollagenase-Dispase-Lösung:

100ml L-15-Medium (+ 1% Penicillin/Streptomycin) + 20000 u Kollagenase
+ 120 u Dispase + 1 mg Trypsin Inhibitor + 125 mg BSA

Kollagen-Lösung: 10 mL 1x PBS + 25 µL Kollagen R Typ I (Endkonzentration 10 µg/mL)

Kollagen-Beschichtung: 0,5 mL Kollagen-Lösung pro Well, mindestens 2 h bei 37°C

3.2.2 Gewinnung und Kultivierung von Zellen aus dem Magen der Maus

Aus dem Svj126-Mausmagen wurden Corpus und Antrum dissektiert und mehrmals mit 1x PBS gewaschen. Die Zellen des Magens wurden nach dem Protokoll wie unter 3.2.1 beschrieben gewonnen. Pro 24-Well Platte wurden die Zellen von je einem Antrum, bzw. Corpus ausplattiert. Unter Anwendung der Sedimentationsmethode wurden die nicht auf den Boden gesunkenen Zellen der Suspension alle 20 min in weitere Wells übertragen. Dieser Vorgang wurde 6 bis 9 mal wiederholt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und weiter mit Quantum 286 + 1% Streptomycin/Penicillin/Amphotericin-B kultiviert. Je nach Wachstum wurden sie ein- bis zweimal pro Woche geteilt und in mehrere Kollagen I beschichtete Wells oder in größere Platten übertragen. Auch hier wurde ab dem achten Tag nach der ersten Ausplattierung auf Streptomycin/Penicillin/Amphotericin-B Zusatz verzichtet. Einige Kulturen wurden dann in DMEM mit 4.5 g/L Glucose, 1% (v/v) 100x nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat und 2 mM L-Glutamin und 5% FCS kultiviert.

Die primären Zellen und die daraus entstandenen primären Kulturen wurden bei 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten. Die nicht für die Experimente verwendeten Zellen wurden bei voller Vitalität nach 6-15 Passagen eingefroren.

3.2.3 Kultivierung von Zelllinien

Kultivierung von IEC-18-Zellen

Die IEC-18-Zellen wurden in DMEM mit 4.5 g/L Glucose, 1% (v/v) 100x nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin und 5% FCS oder alternativ in Quantum 286 bei 5% oder 6,5% CO₂ und 95% oder 97,5% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Für die Stammhaltung wurden die Zellen alle 1-2 Wochen 1:20 oder 1:30 geteilt.

Kultivierung von IEC-6-Zellen

Die IEC-6-Zellen wurden in DMEM mit 4.5 g/L Glucose, 1% (v/v) 100x nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin und 5% AC-2 (Serumersatz) bei 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Für die Stammhaltung wurden die Zellen einmal wöchentlich 1:20 oder 1:30 geteilt.

Kultivierung von BEAS-2B-Zellen

Die BEAS-2B-Zellen wurden in DMEM/Ham's F-12 mit 1% (v/v) 100x nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin und 5% AC-2 (Serumersatz) bei 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alternativ wurde anstatt Serumersatz 10% FCS verwendet. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Für die Stammhaltung wurden die Zellen einmal wöchentlich 1:10 - 1:20 geteilt.

Kultivierung von A549-Zellen

Die A549-Zellen wurden in DMEM/Ham's F-12 mit 1% (v/v) 100x nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin und 10% FCS bei 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Für die Stammhaltung wurden die Zellen einmal wöchentlich 1:10 - 1:20 geteilt.

Kultivierung von HEK.CXCR4-Zellen

Die HEK.CXCR4-Zellen wurden in DMEM/Ham's F-12 mit 1% (v/v) 100x nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS und 250 µg/ml Zeocin bei 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Für die Stammhaltung wurden die Zellen einmal wöchentlich 1:5 - 1:10 geteilt.

Kultivierung von HEK.CD4.403/CXCR4-Zellen

Die HEK.CD4.403/CXCR4-Zellen wurden in DMEM/Ham's F-12 mit 1% (v/v) 100x nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS, 1 mg/ml G418 und 250 µg/ml Zeocin bei 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Für die Stammhaltung wurden die Zellen einmal wöchentlich 1:5 - 1:10 geteilt.

Kultivierung von AGS-Zellen

Die AGS-Zellen wurden in RPMI 1640 Ready Mix oder RPMI 1640 mit 1% (v/v) 100x nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin und 10% FCS bei 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Für die Stammhaltung wurden die Zellen einmal wöchentlich 1:10 - 1:20 geteilt.

Kultivierung von BV-2-Zellen

Die BV-2-Zellen wurden in DMEM mit 4.5 g/L Glucose mit 1% (v/v) 100x nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat, 2mM-Glutamin, 1% Streptomycin/Penicillin und 10% FCS bei 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Für die Stammhaltung wurden die Zellen einmal wöchentlich 1:5 geteilt.

3.3 *in vitro*-Verwundungsexperimente

3.3.1 Präparativer Scratch Assay

Die Zellen wurden in den entsprechenden Zelldichten (siehe S. 35 und S. 36) in die 100 mm-Zellkulturschalen, auf die zuvor mehrere Bahnen (5-7 mm breit) von außen eingezeichnet wurden, ausplattiert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. 1-2 Tage vor der Verwundung, bei voller Konfluenz, wurden die Zellen mit serumreduziertem (0,1-2%) Medium versetzt. Die Verwundung erfolgte, indem die Zellen auf der inneren Fläche der Bahnen mit einer 5 mm-breiten Rasierklinge entfernt wurden. Die Schalen wurden mehrmals gewaschen um die Zelltrümmer zu entfernen. 2-3 Tage nach der Verwundung wurden die stationären Zellen von den in die Bahnen einmigrierenden Zellen getrennt. Es wurden mehrere Proben stationärer Zellen aus der unverletzten Hälfte mit einer 5 mm-breiten Rasierklinge entnommen und direkt in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß mit vorgelegtem Lysispuffer des RNA-Extraktionskits (s.Kap. 2.3) oder Trizol übertragen. Alternativ wurden die stationären Zellen mit einem Zellheber gelöst, mit dem Medium in ein 15 mL Röhrchen übertragen, 2 min bei 800 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Zellpellet dann mit Lysispuffer oder Trizol versetzt. Anschließend wurden die restlichen stationären sowie die Zellen in der Verwundungszone mit der 5 mm-breiten Rasierklinge oder einem Zellheber entfernt und mit Medium ausgewaschen, so dass nur die 10-20 Zellreihen hinter den Pionierzellen in der Zellkulturschale verblieben sind. Diese migrierenden Zellen wurden dann mit Lysispuffer/Trizol versetzt und in 1,5 mL Eppendorf-Gefäße überführt (s. Abb. 6 und Abb. 7). Die ganze Prozedur wurde unter einem Mikroskop in steriler (Sterilbank) oder unsteriler Umgebung durchgeführt. Die so vorbereiteten Proben wurden bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

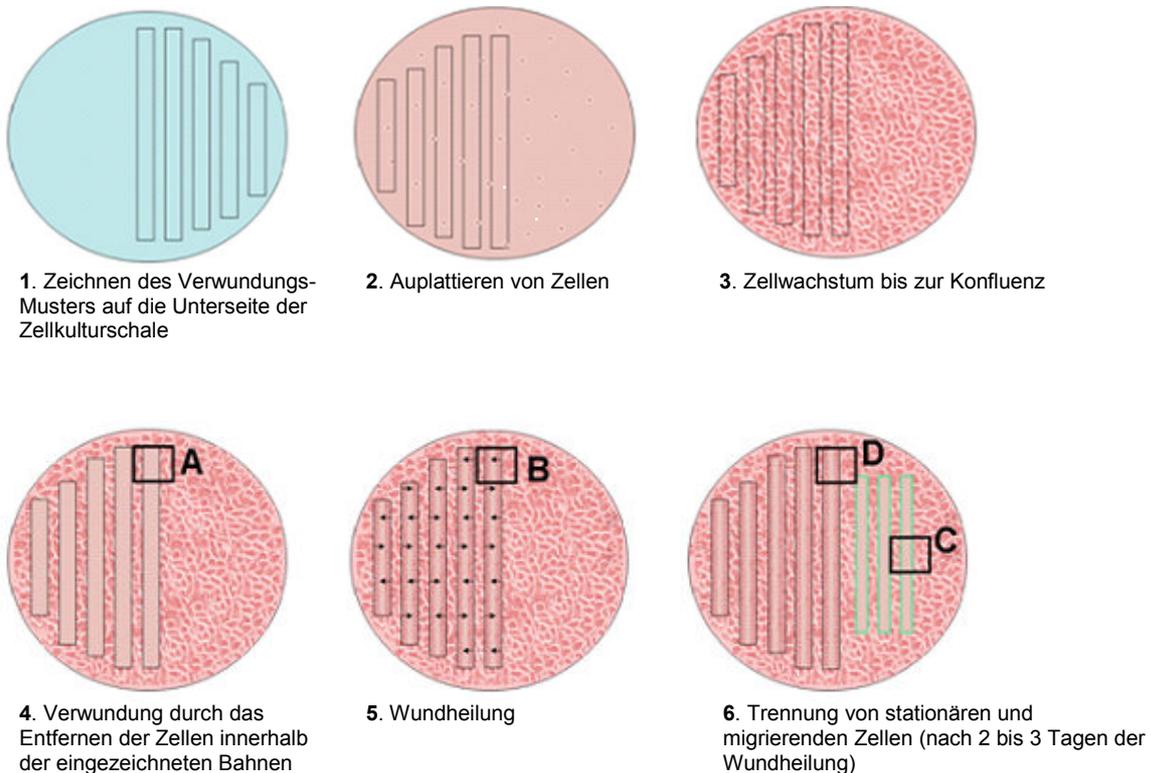
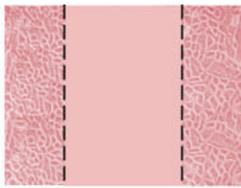
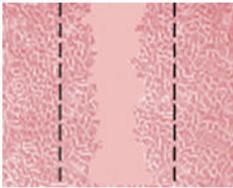


Abb. 6: Schematische Darstellung des präparativen Scratch-Assays (für Details zu den Ausschnitten A-D siehe Abb. 7).

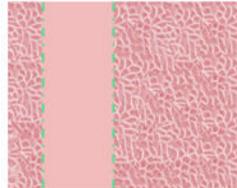
Alternativ wurden noch die verschiedenen Zellen der Verwundungszone getrennt analysiert. Dafür wurden zuerst die stationären Zellen abgelöst, mit dem Medium aufgenommen, abzentrifugiert und das Pellet im Lysispuffer gelöst. Danach wurden alle restlichen stationären Zellen, bis auf 5 Zellreihen vor der Verwundungszone, entfernt und die Zelltrümmer mehrmals mit Medium ausgewaschen (s. Abb. 7, D rechts).



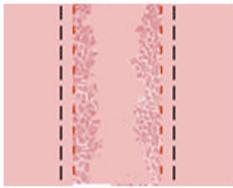
A. Verwundung durch Entfernung der Zellen in den vorgezeichneten Bahnen (Verwundungszone)



B. Wundheilung



C. Entnahme von stationären Zellen (grün)



D. Durch das Entfernen der restlichen stationären Zellen und Zellen der Verwundungszone (links), verbleiben in den Bahnen ausschließlich die migrierenden Zellen (rote Markierung)

Alternativ (rechts): durch das Entfernen der restlichen stationären und migrierenden Zellen verbleiben an den Bahnen ausschließlich die Zellen der Verwundungszone (innerhalb der roten und blauen Markierung)

Abb. 7: Schematische Darstellung des präparativen Scratch-Assays: Details der Ausschnitte **A-D** (vergleiche auch Abb.6).

Anschließend wurden die 10-20 Zellreihen der migrierenden Zellen entfernt, mit Medium aufgenommen, abzentrifugiert und das Pellet ebenfalls im Lysispuffer/Trizol gelöst. Am Ende wurde noch Lysispuffer/Trizol direkt auf die Zellen der Verwundungszone aufgetragen und das Homogenisat in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Menge des Lysispuffers aus dem Extraktionskit richtete sich nach den Angaben des Herstellers; für Trizol betrug die Menge jeweils 1 mL pro Probe.

Trennung von migrierenden und stationären IEC-18-Zellen

Die IEC-18-Zellen wurden zu 0,3 Mio. pro 100 mm-Schale ausplattiert (Tag 0). Das Medium (DMEM high Glucose mit 1% (v/v) 100x nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin und 5% FCS) wurde am Tag 2 gewechselt. Am Tag 5 wurde das FCS im Medium auf 0,0-0,2% reduziert. Alternativ gab es einen Mediumwechsel mit unveränderter FCS-Konzentration. Am Tag 7 wurden die Zellen verwundet und entweder mit 5% bzw. 0,2% FCS-haltigem Medium oder mit Medium ohne FCS, bzw. mit den zu untersuchenden Stimulantien wie EGF oder TFF3-dimer oder TFF3-monomer inkubiert. Am Tag 9 wurden die stationären Zellen von den in die Bahnen einmigrierten Zellen, getrennt.

Trennung von migrierenden und stationären IEC-6-Zellen

Die IEC-6-Zellen wurden mit einer Zellzahl von 0,5 Mio. pro 100-mm-Schale ausplattiert (Tag 0). Das Medium (DMEM high glucose + 1% (v/v) 100x nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin und 5% AC-2 [Serumersatz]) wurde am Tag 2 gewechselt. Am Tag 5 wurde das AC-2 im Medium auf 0,2% reduziert. Am Tag 7 wurden die Zellen verwundet und mit 0,2% AC-2-haltigem Medium, bzw. mit den zu untersuchenden Stimulantien wie EGF oder TFF3 inkubiert. Am Tag 9 wurden die stationären Zellen von den in die Bahnen einmigrierten Zellen getrennt.

Trennung von migrierenden und stationären BEAS-2B-Zellen

Die BEAS-2B-Zellen wurden mit einer Zellzahl von 0,5 Mio. (alternativ 1-3 Mio.) pro 100 mm-Schale ausplattiert (Tag 0). Das Medium (DMEM/Ham's F-12, 1% (v/v) 100x nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin und 5 % AC-2 als

Serumersatz), wurde am Tag 2 und 4 gewechselt. Alternativ zu AC-2 wurde das Medium mit 5% FCS versetzt. Am Tag 7 wurden die Zellen mit Medium mit 1-2% AC-2 oder 2% FCS versetzt. Am Tag 8 wurden die Zellen verwundet und mit AC-2- (oder FCS-) reduziertem Medium wie am Vortag, bzw. mit den zu untersuchenden Stimulantien inkubiert. Am Tag 9 (oder am Tag 10, wenn die Restitution/Migration 3 Tage andauern sollte) wurden die Zellen erneut stimuliert. Dies geschah im Zusammenhang mit der Untersuchung der Wirkung von EGF, SDF1 α , TFF3 oder TFF2. Bei Experimenten ohne EGF, SDF1 α , TFF3 oder TFF2 gab es keinen Mediumwechsel vom Tag der Verwundung bis zu dem Tag, an dem die stationären Zellen, von den in die Bahnen einmigrierten Zellen, getrennt wurden (Tag 10 oder Tag 11).

Trennung von migrierenden und stationären A549-Zellen

Die A549-Zellen wurden mit einer Zellzahl von 0,5 Mio. (alternativ 1-3 Mio.) pro 100 mm-Schale ausplattiert (Tag 0). Das Medium (DMEM/Ham's F-12, 1% (v/v) 100x nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin und 10% FCS), wurde am Tag 2 und 4 gewechselt. Am Tag 7 wurden die Zellen mit Medium mit 2% FCS versetzt. Am Tag 8 wurden die Zellen verwundet und mit FCS-reduziertem Medium wie am Vortag, bzw. mit EGF stimuliert. Am Tag 9 (oder ebenfalls am Tag 10, wenn die Restitution/Migration 3 Tage andauern sollte) wurden die Zellen erneut stimuliert. Bei Experimenten ohne EGF gab es keinen Mediumwechsel vom Tag der Verwundung bis zu dem Tag, an welchem die stationären Zellen von den in die Bahnen einmigrierten Zellen, getrennt wurden (Tag 10 oder Tag 11).

Trennung von migrierenden und stationären AGS-Zellen

Die AGS-Zellen wurden mit einer Zellzahl von 2-3 Mio. pro 100 mm-Schale in RPMI 1640 Ready Mix oder RPMI 1640 mit 1% (v/v) 100x nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin und 10% FCS ausplattiert (Tag 0). Am Tag 3 wurden die Zellen verwundet und mit Medium mit 2% FCS inkubiert. Am Tag 5 wurden die stationären Zellen von den in die Bahnen einmigrierten Zellen getrennt.

Trennung von migrierenden und stationären Zellen in primären Zellkulturen aus der Maus

Die primären Zellkulturen wurden zu 1:10 aus der wöchentlichen Stammhaltung pro 100 mm-Schale ausplattiert (Tag 0). Das Medium (Quantum 286) wurde am Tag 2 und am Tag 4 gewechselt. Am Tag 7 wurden die Zellen verwundet und mit den zu untersuchenden Stimulantien wie EGF oder TFF3-Dimer in Quantum 286 inkubiert. Am Tag 8 wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden erneut mit EGF und TFF3-Dimer stimuliert. Am Tag 9 wurden die stationären Zellen, von den in die Bahnen einmigrierten Zellen, getrennt. Alternativ wurden die Zellen nach der Stammhaltung in Quantum 286 in DMEM high Glucose mit 1% (v/v) 100x nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin mit 5%FCS kultiviert. Nach der Verletzung wurde das FCS im Medium auf 0,2% reduziert.

3.3.2 Scratch-Assay

Die IEC-18-Zellen wurden in den 24-Well-Platten in einer Zelldichte von 150000 Zellen pro Well ausplattiert und bis zur Konfluenz kultiviert. Danach wurde dem Monolayer an einer markierten Stelle mit einer sterilen 1000 μ L Pipettenspitze eine Kratzwunde zugefügt. Diese wurde in den Abständen von 6, 12 und 24 h fotografiert. Die Auswertung erfolgte durch Berechnung der durch die migrierten Zellen geschlossenen Fläche mit Hilfe von Photoshop CS3 Extended version 10.0.1.

3.3.3 Totale *in vitro* Verwundungsexperimente (multi-Scratch Assays)

Die Zellen wurden in 24-Well-Schalen ausplattiert und nach dem Erreichen der Konfluenz entweder einen Tag ohne Serum bzw. Serumersatz kultiviert oder ohne Serumserum weiter behandelt. Am nächsten Tag wurde der Zellrasen mit einer 10 μ L Pipettenspitze mehrmals quer mit Richtungswechsel verwundet und die Zelltrümmer wurden anschließend mit Medium ausgewaschen. Die so vorbereiteten Zellen wurden dann mit ausgewählten Stimulantien entweder in serumhaltigem oder serumreduziertem Medium inkubiert.

Das Mediumvolumen bei den 24-Well-Platten betrug 0,5-1 mL. Bei den untersuchten Zelllinien wurden die Experimente unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- IEC-18: 50000 oder 100000 Zellen pro Well, am Tag 2 Mediumwechsel (Vollmedium oder serumreduziert), am Tag 5 Verwundung und 8- oder 24-stündige Stimulation mit nicht serumreduziertem oder serumreduziertem Medium. Alternativ 285000 Zellen pro Well in 12-Well-Schalen, am Tag 2 Mediumwechsel, am Tag 3 Verwundung und achtstündige Stimulation ohne Serumzusatz
- BEAS-2B: 150000 Zellen pro Well, am Tag 2 Mediumwechsel ohne AC-2, am Tag 3 Verwundung und achtstündige Stimulation ohne Serumersatz
- A549: 150000 Zellen pro Well, am Tag 2 Mediumwechsel, am Tag 3 Mediumwechsel ohne Serumzusatz, am Tag 4 Verwundung und achtstündige Stimulation ohne Serumzusatz

3.4 Differenzierungsexperimente

Mit diesen Experimenten wurde der Differenzierungszustand, d.h. die Expression bestimmter Differenzierungsmarker zu unterschiedlichen Zeiten nach der Aussaat und zu verschiedenen Stadien vor und nach dem Erreichen der Konfluenz, untersucht. Die verwendeten Zellen wurden jeweils mit einer definierten Zelldichte in entsprechender Anzahl gleich behandelter 100 mm-Zellkulturschalen ausgesät, zu bestimmten Zeitpunkten gesammelt und nach der gewählten RNA-Extraktionsmethode weiter behandelt. Bei den untersuchten Zelllinien wurden jeweils die folgenden Zelldichten am Tag 0 ausplattiert: IEC-18: 0,3 Mio., IEC-6: 0,5 Mio., BEAS-2B: 0,5 Mio., AGS: 0,5 Mio. Zellen pro 100 mm Schale. Die Zellen wurden dann entweder an jedem folgenden Tag oder jeden zweiten Tag des laufenden Experiments geerntet.

3.5 Boyden-Kammer-Assays

Bei dem Chemotaxis-Assay wird die Zellwanderung gemessen. Zu Beginn des Experiments werden die Zellen auf einem Membranaufsatz ausplattiert der über einem Zellkulturgefäß platziert ist, in dem sich die zu untersuchende Substanz befindet. Die Membran ist in das Medium eingetaucht, so dass die Zellen durch sie hindurch wandern können. Wirkt die Substanz chemotaktisch wandern mehr Zellen mit ihrem Gradienten durch die Membran in das untere Gefäß als bei der Kontrollzellgruppe.

Für diese Experimente wurden die Cell Culture Inserts 0,4 µm pore/24 well, oder 0,8 µm pore/24 well von BD Becton Dickinson and Company oder SPL-life Sciences verwendet. Die Membranen wurden zuerst mit Kollagen I beschichtet (0,5 mL Kollagen-Lösung pro Well: 10 mL 1x PBS + 25 µl Kollagen R Typ I [10 µg/mL]) und für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die überschüssige Kollagenlösung durch kurzes Abschleudern entfernt. Die angezüchteten und 24h ohne Serum bzw. Serumersatz gehaltenen Zellen wurden wie unter 3.1.2 behandelt, in das Adhäsionsmedium (250 mg BSA pro 100 mL Medium ohne Serum oder Serumersatz) aufgenommen und auf die Zelldichte von 50000-100000 Zellen pro 100 µL verdünnt. Pro Well wurde jeweils 0,5 mL Adhäsionsmedium mit den entsprechenden Zusätzen vorgelegt. Nach Überführung der Membranaufsätze in die Wells wurde die Zellsuspension pipettiert. Die Ansätze wurden dann 6 h bei 37°C bei 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden die Einsätze entnommen und das Medium samt den nicht migrierten Zellen vorsichtig mit einem Wattestäbchen abgetupft. Anschließend wurden die Einsätze in die entsprechenden, mit 250 µL Kristallviolett-Lösung befüllten 24-Well-Patten übertragen und 30 min bei Raumtemperatur gefärbt. Danach wurden die Transwells durch mehrmaliges Schwenken in Wasser und Abtupfen von der Seite mit einem Filterpapier gereinigt und mit Ausnahme der Membranunterseite mit einem Wattestäbchen getrocknet. Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der in den Membranen angefärbten Zellen mittels eines Mikroskopes und durch das Herauslösen des Kristallviolett-Farbstoffs aus den Membranunterseiten. Hierzu wurden die Einsätze in die Wells mit vorgelegter 10% Essigsäure (1 mL pro Well) übertragen und 5 min entfärbt. Die entfärbte Lösung wurde gründlich gemischt und die optische Dichte bei 590 nm gemessen.

Kristallviolettlösung pH 8,0

25 ml MilliQ-Wasser
 + 625 µL Lösung A
 + 740 µL Lösung B
 + 530 µL abs. Ethanol
 + 7 mg Kristallviolett (Sigma)

Lösung A: 0,62 g Borsäure + 50 mL deion. Wasser

Lösung B: 0,95 g Dinatriumtetraborat + 50 mL deion. Wasser

3.6 Inkubation der Zellen mit Wachstumsfaktoren, TFF-Peptiden und anderen Stimulantien

Die in den Experimenten verwendeten Substanzen wurden dem jeweiligem Medium zugegeben und in folgenden Konzentrationen bzw. Stimulationszeiten eingesetzt: (Tab.8)

Tab. 8: Übersicht der eingesetzten Stimulantien (EGF: epidermal growth factor; G1489: MMP-Inhibitor; IL-1 β : Interleukin-1 β ; LPS: lipopolysaccharid; SDF1: stromal derived factor 1 (CXCL12); TFFs: TFF-Peptide; TNF α : tumor necrosis factor alpha) (s. auch Tab. 3, Kap. 2.5)

Stimulanz	Konzentration	Dauer
EGF	5 nM	6-72 h
G1489 MMP-Inhibitor	10-20 ng/mL	48 h
IL-1 β	20 ng/mL	8-72 h
LPS	100-500 ng/mL	24-48 h
SDF1 α	20-200 ng/mL	8-72 h
TFF2-glykosyliert	1,3-2 μ M	8-72 h
TFF3-Dimer	1,5-2 μ M	8-72 h
TFF3-Dimer gereinigt	1,5-2 μ M	6 h
TFF3-Heteromer gereinigt	1,5-2 μ M	6 h
TFF3-Monomer	2 μ M	8-24 h
TFF3-Monomer gereinigt	1,5-2 μ M	6 h
TNF α	10-20 ng/mL	8-24 h

Inkubation mit Mitomycin C

Für die Untersuchung der Fähigkeit zur Migration, nach Arretierung der Zellzyklen wurde Mitomycin C angewandt, ein zytostatisches Antibiotikum aus *Streptomyces caespitosus*, das über Alkylierung und Cross-linking der DNA die Replikation der Zellen und Transkription verhindert.

Das Medium wurde mit 2 mg/mL Mitomycin versetzt und die Zellen wurden damit 2 h im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurden die Zellen 3 x mit 1x PBS gewaschen und für die Wundheilungsexperimente weiterkultiviert.

3.7 PAS-Alcianblau-Färbung der Zellkulturen

Mit der PAS (Periodic-Acid-Schiff)-Färbung lassen sich Polysaccharide, neutrale Mukopolysaccharide, Muko- und Glykoproteine, Glykolipide und Glykokonjugate nachweisen. Dabei reagieren die zu Aldehyden oxidierten 1,2 Glykole mit Schiff's Reagenz zu einem roten Komplex. Die Alcianblaufärbung ermöglicht den Nachweis von sauren Mukosubstanzen. Dabei färben sich diese bei pH 2,5 blau.

Die Zellen wurden parallel zu Differenzierungs- und Wundheilungsexperimenten entsprechend der Zelldichte je cm² in den Ein-Kammer-Chamberslides kultiviert. Für das Anfärben wurden die Zellen 3 x mit 1x PBS gewaschen, mit 4% PFA 5 min bei RT fixiert, danach 3 x 2 Min. mit 1x PBS gewaschen. Nach dem Waschgang wurde die Kammerwand

entfernt und die Zellen wurden weiter nach dem nachfolgend aufgeführten Protokoll behandelt.

- 3% Essigsäure 3 min
- + 1% Alcianblau 8GK in 3% Essigsäure pH2 30 min
- mit deion. Wasser waschen 5 x 1 min
- + 1% frische Periodsäure 10 min
- mit deion. Wasser spülen 3 x kurz
- + Schiff'sches Reagenz 15 min
- + frisch hergestelltes Sulfitwasser 3 x 2 min
- mit Leitungswasser fließend waschen 15 min
- Mayer's Hämatoxylin 5 min
- In deion. Wasser kurz eintauchen
- fließend waschen mit Leitungswasser 15 min
- Lufttrocknen
- mit Dako Faramount einbetten

Alcianblau-Lösung: 3,77 g Alcianblau 8GX (Sigma) + 200 mL 3% Essigsäure

Sulfitwasser: 200 mL deion. Wasser + 9 mL 1 M HCL + 3 mL 10% Natriumdisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)

3.8 Immunzytochemie

3.8.1 Immunfluoreszenz

Mit dem Immunfluoreszenz-Verfahren können Proteine über Antikörpermarkierung zellulär lokalisiert werden. Der indirekte Nachweis erfolgt über Sekundärantikörper, die gegen die Primärantikörper gerichtet und kovalent an einen Fluoreszenzfarbstoff wie z.B. Cy3 oder FITC gebunden sind. Im Fluoreszenzmikroskop können nun die so markierten Antikörper, die an mehreren Stellen eines Primärantikörpers binden können, durch Auswahl der entsprechenden Anregungs- und Sperrfilter-Kombination, aufgrund ihres emittierten Lichtes, detektiert werden. Bei Mehrfachmarkierungen werden Primärantikörper aus mehreren verschiedenen Spezies eingesetzt, sowie die entsprechenden Zweitantikörper mit unterschiedlichen Fluorochromen.

Für die Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden die Zellen auf Lab-TEK „glass chamber slides“ (Nunc, 1-, 2-, 4- oder 8-well) kultiviert.

3.8.1.1 Fixierung der Zellen mit Methanol

Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 3 x für 2 min mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit Methanol bedeckt und bei -20°C fixiert. Danach wurde das Methanol entfernt und die Zellen wurden noch einmal 3 x 2 min mit 1x PBS gewaschen.

3.8.1.2 Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd

Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 3 x für 2 min mit 1x PBS gewaschen, anschließend mit 4% PFA bedeckt und 5-10 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurde 4% PFA entfernt und die Zellen wurden noch einmal 3 x 2 min mit 1x PBS gewaschen.

1x PBS: 2,3 g Na_2HPO_4 (wasserfrei) + 18,0 g NaCl+ 0,5 g KH_2PO_4 (wasserfrei), pH mit 1M NaOH auf 7,4 einstellen, auf 2000 mL mit deion. Wasser auffüllen;

4% PFA: 20 g Paraformaldehyd + 450 mL 1x PBS mit einem Magnetrührer auf 65°C erwärmen bis sich die Paraformaldehydflocken aufgelöst haben, dann die Lösung im Eisbad auf 22°C abkühlen, pH mit 1M NaOH auf 7,4 einstellen und mit 1x PBS auf 500 mL auffüllen

3.8.1.3 Blockierung

Um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu vermeiden wurden die Zellen in Blockierungslösung (1-2% BSA, 0,5 % Triton-X in 1x PBS) bei Raumtemperatur 30 min inkubiert.

3.8.1.4 Inkubation mit Antikörpern

Nach der Entfernung der Blockierungslösung wurden die Zellen mit Primärantikörpern in 0,2% Triton-X in 1x PBS in entsprechenden Verdünnungen (Tab. 9) 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert.

Tab. 9: Verdünnungen von Primärantikörpern (Acta2: smooth muscle actin 2; CTNNB1: catenin beta; MMP1: Matrix.Metalloprotease 1; TFFs: TFF-Peptide; (s. auch Tab.4, Kap 2.5))

Antigen	Antikörper / Tier / Spezifität	Verdünnung
Acta2	monoklonal / Maus / Ratte	1:100
CTNNB1	monoklonal / Maus / Mensch, Ratte	1:100
MMP1	polyklonal / Kaninchen / Mensch	1:100
hTFF2	polyklonal / Kaninchen / Mensch, Maus	1:1000
hTFF3	polyklonal / Kaninchen / Mensch, Ratte, Maus	1:500-1:2000
mTFF1	polyklonal / Kaninchen / Maus	1:500
rTFF3	polyklonal / Kaninchen / Ratte	1:500
mTFF1	polyklonal / Kaninchen / Maus	1:500

Danach wurden die Zellen 3 x 5 min mit Blockierungslösung gewaschen und mit Sekundärantikörpern (Tab. 10) in 0,2% Triton-X-100 in 1x PBS 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Tab. 10: Verdünnungen von Sekundärantikörpern

Antigen	Antikörper / Tier / Fluorochrom	Verdünnung
Kaninchen-Antikörper	anti-Kaninchen / Schaf/ Cy3	1:100
Maus-Antikörper	anti-Maus / Ziege / FITC	1:50-1:100

Anschließend wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und 5 min mit DAPI (1:1000) in 1x PBS bei Raumtemperatur gefärbt. Danach wurden die Trennwände der Kammern entfernt und die Objektträger vorsichtig 2 x 5 min in 1x PBS und 2 x 5 min in deion. Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen wurden jeweils 3 Tropfen Mowiol auf die Objektträger platziert. Danach wurden diese mit den (mit Ethanol gereinigten und getrockneten) Deckgläsern bedeckt, und zum Festigen des Einbettungsmediums über Nacht im Dunkeln, bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.8.1.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei dieser Art der Mikroskopie wird die Eigenschaft der Fluoreszenzmarker genutzt, durch die Bestrahlung mit Licht im Wellenlängenbereich ihres Absorptionsmaximums zur Emission von Licht einer anderen Wellenlänge angeregt werden zu können. Die Probe mit dem entsprechenden Fluoreszenzmarker emittiert dann längerwelliges Licht, für das der Strahlenteiler durchlässig ist. Der Sperrfilter selektiert dann nur das Licht der exakten Emissionswellenlänge, so dass auf diese Weise die Hintergrundstrahlung unterdrückt wird. Zur Auswertung der hergestellten Fluoreszenzpräparate wurde das Fluoreszenzmikroskop Axiophot /Axiocam HRC von Zeiss mit den in der Tab. 11 aufgelisteten Objektiven und in der Tab. 12 aufgelisteten Fluoreszenzfiltern verwendet.

Tab. 11: Objektive (Hersteller: Zeiss)

Bezeichnung
Ph1 Plan-NEOFLUAR 10x/0,30
Ph2 Plan-NEOFLUAR 20x/0,50

Bezeichnung
Plan-NEOFLUAR 40x/0,75
Ph3 Plan-APOCHROMAT 63x/1,40

Tab. 12: Fluoreszenzfilter (Hersteller: Zeiss)

Filter	Anregung BP	Strahlenteiler FT	Emission LP
Filterset 01	365 nm +/- 12 nm	395 nm	420 nm
Filterset 10	450-490	395 nm	397 nm
Filterset 15	546 nm +/- 12 nm	580 nm	590 nm

Die Anregungs- und Emissionsspektren der Fluoreszenzmarker sind in Tab. 13 aufgelistet:

Tab. 13: Anregungs- und Emissionsmaxima der Fluoreszenzmarker

Fluoreszenzmarker	Anregung	Emission
FITC	494 nm	518 nm
Cy3	552 nm	565 nm
Höchst 33258	358 nm	461 nm

3.9 Genexpressionsanalysen mit RT-PCR

3.9.1 Isolierung von Gesamt-RNA

3.9.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Die Extraktion von RNA aus Zellen erfolgte mit Kits genau nach Herstellerangaben (Qiagen, Analytic Jena). Dabei wurden die Zellen 3 x mit 1x PBS gewaschen und nach vollständiger Entfernung von PBS mit dem entsprechenden Lysispuffer benetzt. Mit einem Schaber wurden die Zellen aufgesammelt, mit einer Pipettenspitze in ein Eppendorfgefäß übertragen und durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Die Zelllysate wurden dann auf die RNA-Bindungssäulen aus dem Kit aufgetragen und bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die an der Säulematrix gebundene RNA wurde mehrmals durch Zentrifugation mit Puffern gewaschen und mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Alternativ wurde RNA mit einem Trizolaufschluss gemäß den Herstellerangaben (Invitrogen) gewonnen. Dieser basiert auf der sauren Guanidinhydrochlorid- bzw. Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode (Chirgwin et al. 1979, Chomczynski and Sacchi 1987). Dabei werden die Proteine mittels chaotropen Wechselwirkungen denaturiert (Guanidinhydrochlorid- bzw. Guanidinthiocyanat) und die Nukleinsäuren mit Chloroform und Phenol abgetrennt. Im Gegensatz zur RNA, ist bei saurem pH (4-5,5) DNA schwer wasserlöslich. Somit lässt sich RNA unter Zugabe von Isopropanol und Ethanol aus der wässrigen Phase fällen.

Nach dem 3-maligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen mit 1-2 mL Trizol bedeckt, mit einem Zellschaber aufgesammelt und durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Nach dem Übertragen in ein 2 mL Eppendorfgefäß wurde das Gemisch mit 200 µL Chloroform/1 mL Trizol durch kurzes Schütteln vermischt. Nach dem Abzentrifugieren (bei 4°C) bilden sich 2 Phasen aus: die untere Protein- und DNA-haltige Phase und die obere, wässrige Phase, welche die RNA enthält. Durch vorsichtiges Übertragen des wässrigen Überstandes wurde die RNA-haltige Lösung mit 500 µL Isopropanol pro 1 mL eingesetztem Trizol gemischt. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand entfernt und das RNA-Pellet mehrmals durch Waschen mit Ethanol (dazwischen Zentrifugieren), gereinigt. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in DEPC-Wasser gelöst.

Die RNA wurde zur kurzfristigen Weiterbearbeitung auf Eis gelagert, oder für eine spätere Nutzung bei -80°C gelagert.

RNA-Extraktion mit Trizol:

- Zellen in 1 mL Trizol aufnehmen, homogenisieren,
- abzentrifugieren 10 min bei 12000xg, 4°C, Überstand in ein neues 2 mL Eppendorfgefäß übertragen und 5 min bei RT stehen lassen
- + 0,2 mL Chloroform, kräftig schütteln, 3 min bei RT stehen lassen
- abzentrifugieren 15 min bei 12000xg, 4°C, den wässrigen Überstand in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß übertragen (die untere und die Interphase für Proteinverarbeitung bei -80°C lagern)
- + 0,5 mL Isopropanol, 10 min bei RT stehen lassen
- abzentrifugieren 10 min bei 12000xg, 4°C, Überstand verwerfen
- + 1 mL 75% Ethanol, kurz vortexen
- abzentrifugieren 5 min bei 7500xg, 4°C, Überstand verwerfen
- das bei RT getrocknete Pellet in 30-50 µl DEPC-H₂O lösen, auf Eis weiter verarbeiten oder bei -80°C lagern

3.9.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Die RNA-Extraktion aus Gewebe wurde mit Trizol nach dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. Dazu wurde die entsprechende Menge Gewebe in 1 ml Trizol aufgenommen und in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen mit dem Ultra-Turrax T25 basic homogenisiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein 2 mL Eppendorfgefäß übertragen. Weiter wurde wie oben beschrieben vorgegangen. Alternativ wurde die Gewebeprobe mit Precellys (Peqlab) homogenisiert. Das Aufschlußprinzip beruht dabei auf dem Zertrümmern der Probe durch hochbeschleunigte Kügelchen (Schüttelbewegung). Das Gewebe wurde in ein Schraubgefäß, in dem Trizol vorgelegt ist, platziert und danach in dem Gerät geschüttelt. Nach der Übertragung des Überstandes in ein 2 mL Eppendorfgefäß wurde wie im Kap. 3.9.1.1 beschrieben vorgegangen.

3.9.2 Qualitätskontrolle der RNA

Zur Überprüfung der Qualität der RNA wurde bei Experimenten mit hoher RNA-Ausbeute, 0,5-1 µg RNA je Probe in RNA-Probenpuffer und RNA-Ladepuffer aufgenommen und auf einem 1%-igen Agarosegel in 1x TAE bei 100 V für 30 min aufgetrennt. Die Degradation der RNA oder Kontamination mit genomischer DNA wurde dann in UV-Gel-Dokumentationsanlage (Färbung mit Ethidiumbromid) durch Verschmieren der erwarteten 18S- und 28S-Banden, oder durch das Erscheinen von zusätzlichen Banden sichtbar.

<u>RNA-Probenpuffer für Agarosegel in 1x TAE</u>	<u>MOPS-Puffer</u>
1mL Formamid deionisiert	0,2 M MOPS, pH 8,0
+ 350 µL 37% Formaldehyd	50 mM Natriumacetat
+ 200 µL MOPS-Puffer	5 mM EDTA
<u>RNA-Ladepuffer:</u> 50% Glycerin, 5 mM EDTA, 0,4% Bromphenolblau A, 1 mg/mL Ethidiumbromid + 6x Ladepuffer (Fermentas)	

3.9.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der RNA wurde mittels NanoDrop 1000 Spectrophotometer bestimmt. Dazu wurde 1 µL der RNA-Lösung auf das Messgerät aufgetragen und die Konzentration wurde direkt ermittelt.

Alternativ wurde das Libra S12 Spectrophotometer verwendet. Hierzu wurde die RNA-Lösung verdünnt und in einer UV-Küvette bei OD₂₆₀ (Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) und OD₂₈₀ (Absorptionsmaximum der Proteine) vermessen. Die Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$] = $\text{OD}_{260} \times 40 \mu\text{g}/\text{mL} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Aus dem Quotient aus OD_{260} und OD_{280} lässt sich auf die Reinheit/Verunreinigung der RNA schließen. Ist dieser Wert niedriger als 2,0 ist die Probe mit Proteinen und/oder DNA verunreinigt.

3.9.4 Entfernung genomischer DNA-Spuren in RNA mit RNase-freier DNase

Die Verunreinigung mit DNA, die mit jeder hier beschriebenen Methode nicht zu vermeiden ist, wurde mit Hilfe von RNase-freier DNase (Qiagen oder Fermentas) weitestgehend beseitigt. Die Probe wurde entweder direkt auf der RNA-Bindungssäule aus dem Kit verdaut und die DNase durch einen Waschschrift entfernt; oder die Probe wurde nach der RNA-Elution, gemäß unten aufgeführten Standardprotokollen bearbeitet. Dabei wurde die RNA-Lösung nach den Herstellerangaben, bis zu 1 h bei 37°C verdaut und das Enzym anschließend mit einer fünf- bis zehnmütigen Inkubation mit EDTA bei 65°C inaktiviert. Überschritt das Konzentrationsvolumen der RNA die Protokollangaben, wurden die Ansätze für alle Proben des Experiments entsprechend maßstabgerecht vergrößert. Optional wurde die so verarbeitete RNA mit einem Kit (RNA Clean&Concentrator, Zymo Research) gereinigt und mit RNase-freiem Wasser eluiert.

DNase I, RNase-frei (alle Komponenten von Fermentas)

RNA bis 1 μg	x μL
10x Reaktionspuffer	1 μL
DNase I, RNase-frei (1 u)	1 μL
RiboLock™ RNase Inhibitor (40 u)	1 μL
DEPC-Wasser	auf 10 μL auffüllen

Die Ansätze wurden 30 min - 1 h bei 37°C inkubiert, anschließend wurde 1 μL 50 mM EDTA zugegeben und die Proben 10 min bei 65°C erhitzt und auf Eis abgekühlt.

DNase I, RNase-frei (alle Komponenten von Invitrogen)

RNA bis 1 μg	x μL
10x Reaktionspuffer	1 μL
DNase I, RNase-frei (1 u)	1 μL
RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor (40 u)	1 μL
DEPC- Wasser	auf 10 μL auffüllen
gesamt	10 μL

Die Ansätze wurden 30 min - 1 h bei 37°C inkubiert, anschließend wurde 1 μL 25 mM EDTA zugegeben und die Proben 10 min bei 65°C erhitzt und auf Eis abgekühlt.

3.9.5 Reverse Transkription

Mit Hilfe von Reverser Transkriptase wird die RNA in cDNA umgeschrieben. Als Primer dienen dabei Oligo-dTs, die mit dem polyA-Schwanz am 3'-Ende eukaryotischer mRNA hybridisieren. Die Reverse Transkriptase schreibt die RNA in die komplementäre DNA um, die in der Folge ihrerseits als Matrize für die Zweitstrang DNA-Synthese unter Anwendung von DNA-Polymerase I dient.

Die Generierung von cDNA erfolgte unter Verwendung von SuperScript II Reverse Transkriptase (Invitrogen) oder von RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas). Für die RNA-Umschreibung wurde für alle Proben eines Experimentes die gleiche Menge an RNA eingesetzt: für die Verwundungsexperimente jeweils 50-500 ng, für andere Experimente bis 2000 ng. Überschritt das Volumen der RNA-Konzentration, die eingesetzt werden sollte, das in den Protokollen angegebene Volumen für RNA, wurden die Ansätze entsprechend vergrößert. Die fertige cDNA wurde dann 1:5-1:8 mit DEPC-Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

SuperScript II Reverse Transkriptase (alle Komponenten von Invitrogen):

Die mit DNase-verdaute RNA wurde mit DEPC-Wasser auf Eis vorbereitet:

50-2000 ng RNA in RNase-freiem Wasser	x μ L
DEPC- Wasser	auf 10 μ L auffüllen

Als Mastermix vorbereitet wurden:

50 mM Oligo(dT) ₁₂₋₁₈	1 μ L
10 mM dNTP-Mix (jeweils)	1 μ L

Der Mastermix wurde 5 min bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die weiteren Reaktionskomponenten hinzugegeben:

5x Reaktionspuffer	4 μ L
0,1M DTT	2 μ L
RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor (40 u)	1 μ L
SuperScript II RT (200 U/ μ L)	1 μ L
gesamt	10 μ L

10 μ L Master-Mix wurde zu 10 μ L RNA (in DEPC-Wasser) zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz vorsichtig gemischt, kurz anzentrifugiert und 60 min bei 42°C, und dann noch 15 min bei 70°C inkubiert, um das Enzym zu inaktivieren.

RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (alle Komponenten von Fermentas):

Die mit DNase-verdaute RNA wurde mit DEPC-Wasser auf Eis vorbereitet:

50-2000 ng RNA in RNase-freiem Wasser	x μ L
DEPC- Wasser	auf 11,5 μ L auffüllen

Als Mastermix vorbereitet wurden:

Oligo(dT) ₁₈ 100 μ M (0.5 μ g/ μ L)	1 μ L
--	-----------

Die Oligo(dT)s wurden 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die weiteren Reaktionskomponenten hinzugegeben:

5x Reaktionspuffer	4 μ L
RiboLock TM RNase Inhibitor (40 u)	0.5 μ L
10 mM dNTP (jeweils)	2 μ L
Rev.AidH (-) Reverse Transcriptase (200 u)	1 μ L
gesamt	8,5 μ L

8,5 μ L Master-Mix wurde zu 11,5 μ L RNA (in DEPC-Wasser) hinzugegeben. Anschließend wurde der Ansatz vorsichtig gemischt, kurz anzentrifugiert und 60 min bei 42°C, dann 10 min bei 70°C inkubiert, um das Enzym zu inaktivieren.

3.9.6 RT-PCR

Die RT-PCR dient als Nachweis für die in der Zelle stattfindende Genexpression. Als DNA-Matrize fungiert die, durch die Reverse Transkription generierte, cDNA. Im ersten Schritt wird die cDNA durch Denaturierung mit hoher Temperatur in Einzelstränge getrennt. Nach Absenkung der Temperatur (Primer-spezifisch) können die Primer mit den jeweiligen cDNA-Strängen hybridisieren und als Startpunkt für die Elongation mit DNA-Polymerase dienen. Die DNA-Polymerase beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers die Amplifikation und synthetisiert den komplementären Strang. Diese Reaktion wird dann durch erneute Trennung der neugebildeten Doppelstränge bei 94°C unterbrochen und im nachfolgenden Zyklus bilden sich auf diese Weise die ersten Produkte der gewünschten Größe. Diese wiederum vermehren sich exponentiell und können über Agarose Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid nachgewiesen werden. Die PCR-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt (Bsp.: Hotstar Taq Plus, Qiagen):

cDNA	1-3 µL
deion. Wasser autoklaviert	7 µL minus Vol. cDNA minus Vol. Hotstar-Taq-Polymerase
10x PCR-Reaktionspuffer (incl. 1,5 mM MgCl ₂ + Ladepuffer)	1 µL
2 µM dNTPs (jeweils)	1 µL
7,5 µM Primer-Mix (forward /reverse)	1 µL
Hotstar-Taq-Polymerase	0,05-0,1 µL
gesamt	10 µL

Bei Taq-Polymerasen, die mit Reaktionspuffer ohne Ladepuffer ausgestattet waren, wurde dieser extra dazugegeben (1 µL). Somit erniedrigte sich das Volumen von deion. Wasser um 1 µL. Die Primer wurden so gewählt, dass eine Hybridisierungstemperatur von 57°C bis 60°C erreicht wurde. Die verwendeten Primer sind den Tabellen 16-18 (Anhang) zu entnehmen.

Der PCR Verlauf:

- Denaturierung: 5 min bei 94°C / 95°C
- Anzahl der Zyklen: 21-35
 - Denaturierung: 45 sec bei 94°C
 - Primeranlagerung: 45 sec bei entsprechender Hybridisierungstemperatur
 - Kettenverlängerung: 45 sec bei 72°C
- Abschließende Kettenverlängerung 5 min bei 72°C
- Ende bei 4°C

3.9.7 Elektrophoretische Trennung von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgt entsprechend ihrer Größe und aufgrund ihrer negativen Ladung. Die Proben werden in die Taschen eines Agarosegels, das als großporige Matrix fungiert, aufgetragen. In einem Spannungsfeld wandern die Nukleinsäuren zum positiven Pol und werden nach ihrer Größe sortiert. Mit Hilfe eines Markers, der die DNA-Produkte bekannter Größen enthält, und der interkalierenden Substanzen, die dem Gel zugesetzt sind, kann man die erhaltenen Produkte identifizieren.

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden jeweils 8 µL der entsprechenden PCR-Probe direkt in die Geltasche pipettiert. Als DNA-Marker dienten GeneRuler 1kb Plus- oder GeneRuler 50bp Ladder (Fermentas). Die Elektrophorese erfolgte in 1,5 bis 2,25%-igen Gelen konstant bei 150 V für ca. 15-20 min. Die Gele wurden in einer UV-Detektionskammer ausgewertet und fotografiert (E.A.S.Y RH3, Herolab).

<u>50x TAE-Puffer:</u>	<u>Agarose-Gele:</u>
242 g TrisBase	1,5% : 1,5 g / 100 mL 1xTAE
+ 100,0 mL 0,5M EDTA	2,0% : 2,0 g / 100 mL 1xTAE
+ 57,1 mL abs. Essigsäure	2,25% : 2,25 g / 100 mL 1xTAE
+ 842,9 mL deion. Wasser	erhitzen bis zum gleichmäßigen Schmelzen
	+ 50 µL 0,1% Ethidiumbromid

3.10 Bioinformatische Methoden

3.10.1 Sequenz-Vergleiche

Die DNA- und RNA-Sequenzen der Gene wurden bei GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) abgerufen. Die RNA- sowie cDNA-Sequenzen wurden mit unterschiedlichen Teilprogrammen wie u.a. BLAST oder mit verschiedenen Programmen des EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute; (<http://www.ebi.ac.uk/>)) überprüft bzw. zugeordnet.

3.10.2 Entwurf der Primer

Für den Entwurf der Primer wurde die Software Primer3 verwendet (<http://jura.wi.mit.edu/rozen/papers/rozen-and-skaletsky-2000-primer3.pdf>). Die Primerpaare wurden sofern möglich so ausgewählt, dass sie durch ein oder mehrere Introns getrennt sind und so eventuell noch vorhandene genomische DNA keine Artefakte liefert.

Die Auswahl der Primer wurde mit Hilfe von PrimerBLAST durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Bei Genen, die ausschließlich aus einem Exon bestehen, wurde die Reinheit der cDNA mit Hilfe von Primern für genomische Promotor-Sequenzen überprüft.

3.11 Proteinbiochemische Methoden

3.11.1 Proteinextraktion

3.11.1.1 Proteinextraktion mittels Trizol

Diese Methode wurde angewendet, wenn aus einer Probe sowohl RNA als auch Protein isoliert werden sollten. Die entsprechende Menge Zellen oder Gewebe wurde in 1-2 mL Trizol (Invitrogen) homogenisiert und nach Angaben des Herstellers weiter verarbeitet.

Nach dem Entfernen des wässrigen, RNA-haltigen Überstandes nach der Phenol-Chloroform Fällung, wurden 0,3 mL abs. Ethanol zugegeben und nach kurzer Inkubationszeit abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde verworfen und der Überstand in ein neues 2 mL Eppendorf Gefäß übertragen. Anschließend wurde mit 1,5 mL Isopropanol präzipitiert und abzentrifugiert. Das Proteinpellet wurde dann 3 x 20 min mit 2 mL 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol bei Raumtemperatur inkubiert und abzentrifugiert. Beim letzten Waschschrift wurde das Pellet mit 2 mL abs. Ethanol gevortext, und nach 20 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 1% SDS gelöst und auf Eis oder bei -20°C gelagert.

Proteinextraktion mit Trizol (Invitrogen):

Weiterverarbeitung der Probe nach dem Entfernen des wässrigen, RNA-haltigen Überstandes nach der Phenol-Chloroform Fällung siehe Kap.3.9.1.1 (je 1 mL eingesetztes Trizol):

- + 0,3 mL abs. Ethanol mischen durch invertieren, 3 min bei RT stehen lassen
- abzentrifugieren 5 min bei 2000xg, 4°C, Überstand in neues 2 mL Eppendorfgefäß übertragen (Pellet enthält DNA)
- + 1,5 mL Isopropanol, 10 min bei RT stehen lassen
- abzentrifugieren 10 min bei 12000xg, 4°C, Überstand verwerfen
- + 2 mL 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol, 20 min bei RT stehen lassen
- abzentrifugieren 5 min bei 7500xg, 4°C, Überstand verwerfen (diesen Waschschrift 2 x wiederholen)
- + 2 mL abs. Ethanol, vortexen, 20 min bei RT stehen lassen
- abzentrifugieren 5 min bei 7500xg, 4°C, Überstand verwerfen
- Pellet bei RT trocknen lassen, in 1% SDS in 1x PBS resolubilisieren
- auf Eis oder bei -20°C lagern

3.11.1.2 Proteinextraktion mit Lysispuffer

Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen 3 x mit 1x PBS gewaschen und mit kaltem Lysispuffer benetzt. Die migrierenden Zellen wurden mit 100-150 µL Lysispuffer bedeckt, mit dem Zellheber gesammelt und in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß übertragen. Die stationären Zellen wurden direkt in ein 1,5 mL-Eppendorfgefäß mit vorgelegten 100-150 µL Lysispuffer überführt, oder bei der Entnahme aus der gesamten unverletzten Hälfte (s. Kap. 3.3) wurden die Zellpellets in 200-300 µL Lysispuffer gelöst. Die Zelllysate wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit 200 µL Pipetten-Spitzen mit dem Lysispuffer gemischt und 10 min

bei 15000 rpm (Universal 30RF, Hettich Lab) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen, in neue 0,5 mL Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

Lysispuffer:

20 mM HEPES, pH 7,5 mit 1% Triton-X 100 und 2,5 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O (2,38 g HEPES, 5 g Triton- X-100 und 225 mg MgCl ₂ x 6H ₂ O pro 500 mL)	10 mL
0,25 M EGTA (1,9 g/20 mL), pH 8,4 (Endkonzentration: 10 mM EGTA)	0,4 mL
1 M β-Glycerophosphat (3 g/10 mL) (Endkonzentration: 40 mM β-Glycerophosphat)	0,4 mL
100 mM Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄) vorher kurz aufgeköcht (Endkonzentration: 2 mM Natriumorthovanadat)	0,2 mL
1 DTT (154 mg/mL) (Endkonzentration: 1 mM DTT)	10 µL
Complete-Proteinaseinhibitor (Roche)	0,4 mL

3.11.1.3 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Die Zellsuspension wurde mit der Hälfte des Volumens mit 20% TCA versetzt, gemischt, 2 h bei 4°C inkubiert und anschließend 5 min bei 5000 rpm (Universal 30RF, Hettich Lab) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1% SDS gelöst und bei -20°C gelagert.

3.11.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die hier verwendeten Methoden basieren auf kolorimetrischen Reaktionen, deren optische Dichte bei den jeweiligen Absorptionsmaxima gemessen wird. Als Standard dienten Proteine in bekannten Konzentrationen (wie z.B. Rinderserumalbumin), die zu gleichen Bedingungen wie die entsprechenden Proben behandelt wurden. Es wurde eine Konzentrationsreihe aufgestellt und die Extinktion als Funktion der Konzentration als Graph aufgetragen. Die ermittelte optische Dichte der Probe wurde von den Graphen aus der Eichgerade abgelesen. Die Proben wurden in Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die Eichung des Messgerätes erfolgte mit der Messlösung als Leerwert.

3.11.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Biorad Protein Assay

Diese Methode basiert auf dem Bradford-Assay (Bradford, 1976). Das Absorptionsmaximum des in der Messlösung enthaltenen Farbstoffes (Coomassie Brilliant Blue G.250) verschiebt sich nach der Bindung mit Arginin in saurer Lösung (z.B. Phosphorsäure) von 465 nm auf 595 nm.

Die Messlösung wurde 1:4 mit deion. Wasser gemischt. 1-5 µL Probe wurde 1:500 -1:200 verdünnt (auf 1 bzw. 0,8 mL von totalem Volumen eingestellt) und Kunststoffküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm, bei 595 nm nach 5 min gemessen. Für die Proben geringer Konzentration wurden Micro-Küvetten eingesetzt und die Probe wurde nur 1:10 verdünnt.

3.11.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Kit

Die wesentlich empfindlichere Methode zum Nachweis von Proteinen basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der die Proteine in alkalischer Lösung mit Kupferionen blaue Komplexe bilden (Smith et al., 1985). Dabei wird Cu²⁺ zu Cu¹⁺ reduziert. Nach der Reaktion mit der Bicinchoninsäure bilden sich wiederum purpurrote Komplexe, die ihr Absorptionsmaximum bei 562 nm haben.

Für die BCA-Lösung (Bicinchoninsäure-Reaktion-Kit, Pierce Protein Research Products) wurden 50 Teile von Reagenz A (enthält BCA) mit 1 Teil von Reagenz 2 (enthält Kupfersulfat) vermischt. Für einen Standard-Assay (für Konzentrationen von 20-2000 µg/mL) wurde zu 20 µL Probe 1 mL Lösung gegeben (1:20-Verdünnung). Der Ansatz wurde gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt (kurz auf Eis), in Küvetten überführt und die optische Dichte bei 562 nm innerhalb von 10 min gemessen. Für kleinere Proteinkonzentrationen (von 5-250 µg/mL) kann das Verhältnis von Probe und BCA-Lösung auf 1:8 verringert werden. Hierzu muss dann eine entsprechende Eichkurve erstellt werden.

3.11.3 SDS-PAGE

3.11.3.1 Probenvorbereitung für SDS-PAGE

Bei allen Experimenten wurden für die jeweiligen Proben die gleichen Mengen (in μg) an Protein eingesetzt und das restliche Volumen wurde mit dem entsprechenden Lösungsmittel auf 45 μL aufgefüllt. Für die Durchführung der vertikalen Elektrophorese wurden die Proben mit nichtreduzierendem Probenpuffer oder mit reduzierendem Probenpuffer (15 μL) vermischt, 4 min gekocht, auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert.

Reduzierender Probenpuffer

0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,5 mL
87% Glycerin	4,6 mL
20% SDS	0,4 mL
Bromphenolblau	1 Spatelspitze
2-Mercaptoethanol	2,0 mL
deion. Wasser	auf 10 mL auffüllen

Bei dem nichtreduzierenden Probenpuffer wird auf 2-Mercaptoethanol verzichtet und mit deion. Wasser auf 10 mL aufgefüllt.

3.11.3.2 Durchführung von SDS-PAGE

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde die vertikale, diskontinuierliche SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) nach Lämmli (1970) verwendet. Das Gel besteht aus zwei Abschnitten: dem grobporigen Sammelgel (pH 6,8), das die Proteine fokussiert, und dem feinporigen Trenngel (pH 8,8). Die Zusammensetzung des Elektrodenpuffer, des Probenpuffers und des Gels, ermöglicht die kontrollierte Bewegung der Proteine in einem Spannungsfeld, in welchem der pH-Status die Geschwindigkeit der elektrophoretischen Mobilität bestimmt. Die Puffer und Gele wurden nach den unten aufgeführten Protokollen vorbereitet. Die Gelelektrophorese verlief bei 85 V bis die Proteine sich am Übergang von Sammelgel und Trenngel gesammelt hatten, dann wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Nachdem die Lauffront der Proteinproben den unteren Bereich des Gels erreicht hatte, wurde das Gel entnommen und weiter für eine Coomassie- bzw. Silberfärbung oder für einen Western Blot genutzt.

<u>Trenngelpuffer (Lämmli)</u> 90,86 g Tris + 490 mL deion. Wasser pH-Wert auf pH 8,8 einstellen + 10 mL 20% SDS	<u>Sammelgelpuffer (Lämmli)</u> 12,114 g Tris + 100 mL deion. Wasser pH-Wert auf pH 6,8 einstellen
<u>Elektrophoresepuffer nach Lämmli:</u> 3,03 g Tris + 14,25 g Glycin + 5 mL 20% SDS + 995 mL deion. Wasser	

Trenngele: 20 mL Lösung für 2 Gele, Geldicke 1,5 mm, Kammdicke 1,5 mm

Komponenten	für 7,5%-Gel	für 15%-Gel
deion. Wasser	11,2 mL	6,2 mL
30% Acrylamid- Bisacrylamid-Lösung Verhältnis 37,5:1	5,0 mL	10,0 mL
Trenngelpuffer	3,8 mL	3,8 mL

unmittelbar vor dem Gießen der Gele werden hinzugeben und gründlich gemischt:

20% APS	80 μL
TEMED	8 μL

Sammelgele: 15,5 mL Lösung für 2 Gele, Geldicke 1,5 mm, Kammdicke 1,5 mm

Komponenten	Acrylamidkonzentration 6%
deion. Wasser	9,0 mL
20% SDS	0,125 mL
30% Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung Verhältnis 37,5:1	3,125 mL
Sammelgelpuffer	3,125 mL

unmittelbar vor dem Gießen der Gele werden hinzugeben und gründlich gemischt:

20% APS	125 µL
TEMED	12,5 µL

3.11.4 Western Blot

Mit dieser Methode werden die geoelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Auf den positiv geladenen Pol des Semi Dry Blotters (20 x 20 cm, Biostep) wurden drei Lagen Gel-Blotting-Papier (Typ BF2, Stratorius), die in Transferpuffer getränkt waren, aufgelegt und mit einer ebenfalls in Transferpuffer befeuchteten Nitrocellulose-Membran (Whatman PROTRAN) blasenfrei bedeckt. Auf die Membran wurde das Gel platziert, auf das nun 3 weitere, feuchte Filterpapiere gestapelt wurden. Der Ansatz wurde dann mit dem negativ geladenen Pol für 1 h geschlossen und bei 0,8 mA/cm² Membran geblottet.

Transferpuffer, pH 8,8:

5,81 g Tris + 2,93 g Glycin + 1,85 mL 20% SDS + 200,00 mL abs. Methanol
+ 798,15 mL deion. Wasser

3.11.5 Ponceau-Färbung

Die Überprüfung der Effizienz der Proteinübertragung erfolgte mittels Ponceau-Färbung durchgeführt. Dabei bindet der Azofarbstoff reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine. Die Membran wurde mit der Farbstofflösung kurz inkubiert und mit dest. Wasser gewaschen. Die gleichmäßige Verteilung der Banden qualifizierte die Membran zur Weiterverarbeitung. Dabei wurde noch der Protein-Marker mit Bleistift gekennzeichnet, und die Membran auf die gewünschte Größe zugeschnitten.

Ponceau S-Lösung (0,2% Ponceau S in 3% Trichloressigsäure)

1 g Poncau S (Merck) + 15 g Trichloressigsäure + 500 mL deion. Wasser

3.11.6 Immunologische Detektion der Proteine

Die Proteine auf der Membran wurden zuerst mit 0,2% Glutaraldehyd in 1x PBS für 30 min fixiert. Danach wurde die Membran 2 x 5 min mit PBS-T und 1 x 5 min in TBS-T gewaschen. Die Blockierung erfolgte mit 1% BSA und 1% Trockenmilch in 1x TBS-T und dauerte 60 min. Anschließend wurde die Membran 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (Tab. 14) in 7,5 mL TBS-T inkubiert. Nach dem 3 x fünfminütigem Waschen mit TBS-T wurde für 1 h der Sekundärantikörper (Tab. 15) in 7,5 ml TBS-T, auf die Membran aufgebracht. Abschließend wurde die Membran noch 2 x 10 min mit TBS-T gewaschen, abgetropft und für die ECL-Färbung vorbereitet.

Der Nachweis der Proteine auf der Nitrozellulosemembran erfolgte mit der ECL-Methode (enhanced chemiluminescence). Hierbei katalysiert die, an dem Zweitantikörper gekoppelte, Meerrettichperoxidase (HRP) durch die Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol. Die oxidierte Form von Luminol erzeugt die Chemilumineszenz, die bei 428 nm detektiert werden kann. Hierzu wurden pro Membran 4 mL ECL-Gemisch auf die abgetropfte Membran aufgetragen und nach einer Inkubationszeit von 2 min mit dem GeneGnome (Syngene Bioimaging Synoptics) ausgewertet. Es wurden Expositionszeiten von jeweils 5 x 2 min oder 5 x 3 min gewählt.

<u>PBS-T:</u> 1x PBS (siehe Kap. 3.9.1.2) 0,1% Tween 20 (Sigma)	<u>TBS T:</u> 4,84 g Tris + 17,52 g NaCl + 2 mL Tween 20 + deion. Wasser ad 2000 mL
---	---

Tab. 14: Verdünnungen von Primärantikörpern (ACTA2: smooth muscle actin; CDH1: E-Cadherin; FN1: Fibronectin; MMP1: Matrix-Metalloprotease 1; SDF1 β : stromal derived factor 1 β ; TFFs: TFF-Peptide; VIM: Vimentin) (s. auch Tab. 4, Kap 2.5)

Antigen	Antikörper / Tier / Spezifität	Verdünnung
Actin	polyklonal / Kaninchen / Mensch, Ratte, Maus	1:50-1:200
Acta2	monoklonal / Maus /Ratte	1:500
CDH1	monoklonal / Maus/ Mensch, Ratte	1:200-1:1000
FN1	polyklonal / Kaninchen / Mensch	1:200-1:400
MMP1	polyklonal / Kaninchen / Mensch	1:100-1:200
SDF1 β	polyklonal / Kaninchen / Ratte, Maus	1:200
hTFF1	polyklonal / Kaninchen / Mensch	1:2000
hTFF2	polyklonal / Kaninchen / Mensch, Maus	1:1000
hTFF3	polyklonal / Kaninchen / Mensch, Maus, Ratte	1:2000-1:4000
mTFF1	polyklonal / Kaninchen / Maus	1:500-1:1000
rTFF3	polyklonal / Kaninchen / Ratte	1:500
VIM	polyklonal / Kaninchen / Mensch, Ratte, Maus	1:100

Tab. 15: Verdünnungen von Zweitantikörpern (Vector Laboratories)

Antigen	Verdünnung
Peroxidase anti-Kaninchen IgG(H+L)	1:4000
Peroxidase anti-Maus IgG(H+L)	1:2000

ECL-Nachweis: Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 1:1

Lösung 1: 100,0 μ L 250 mM Luminol

+ 44,0 μ L 90 mM Cumarsäure

+ 1000,0 μ L 1 M Tris-HCl pH 8,5

+ 8856,0 μ L deion. Wasser

Lösung 2: 6,1 μ L 30% H₂O₂

+ 1000,0 μ L Tris-HCl pH 8,5

+ 8993,9 μ L deion. Wasser

3.11.7 Wiederverwenden der Nitrozellulosemembran

Die Nitrozellulosemembran wurde nach der ECL-Färbung von den gebundenen Antikörpern mittels 30-minütiger Inkubation in Stripping-Puffer bei 56°C gereinigt und konnte für den Nachweis weiterer Proteine eingesetzt werden. Anschließend wurde sie 5 min mit deion. Wasser und 3 x 5 min mit TBS-T gewaschen. Danach konnte die Weiterbehandlung zum Proteinnachweis mittels Antikörper (s. Kap. 3.11.6), fortgesetzt werden.

Stripping-Puffer:

4 mL 20% SDS + 3,125 mL 1 M Tris-HCl, pH 6,8 + 0,35 mL Mercaptoethanol

+ 41,525 mL deion. Wasser

3.11.8 Coomassie-Färbung

Diese Methode dient der Anfärbung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel. Dabei lagert sich der Triphenylmethanfarbstoff an die Seitenketten der basischen und nicht polaren, hydrophoben Aminosäuren. Die Bildung des Komplexes stabilisiert die negativ geladene anionische Form des Farbstoffes und führt zur Entstehung der blauen Farbe (Diezel et al., 1972). Das Polyacrylamidgel wurde 30 min in der Bio-Safe Coomassie G-250 Stain (Bio-Rad) und anschließend mit deion. Wasser entfärbt.

3.11.9 Silberfärbung

Hierbei handelt sich um eine sehr empfindliche Methode um Proteine nachzuweisen. Dabei werden die Proteine nach der elektrophoretischen Trennung mit 10% Essigsäure und 30% Ethanol fixiert und mit Silbernitratlösung inkubiert. Die Silberionen lagern sich an die Proteine und werden durch die Zugabe von Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert, das als schwarze Verfärbung sichtbar wird. Das Gel wurde nach folgendem Protokoll verarbeitet. Alle Lösungen wurden frisch angesetzt (außer Fixier- und Waschlösung).

Silbergel-Färbung nach Blum et al. (1987)

Schritt	Lösung (50 mL je Gel)	Dauer
Fixierung	40% Ethanol, 10% Eisessig, 50% deion. Wasser (400 mL abs. Ethanol + 100 mL Eisessig + 500 mL deion. Wasser)	> 1 h
Waschen	30% Ethanol, 70% deion. Wasser (300 mL abs. Ethanol + 700 mL deion. Wasser)	2 x 20 min
Waschen	deion. Wasser	1 x 20 min
Sensibilisierung	0,02% Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (200 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + deion. Wasser ad 1000 mL)	1 min
Waschen	deion. Wasser	3 x 20 sec
Färbung (Silber)	0,2% Silbernitrat, 0,02% Formaldehyd (37%) (2 g AgNO_3 + 0,2 mL Formaldehyd (37%) + deion. Wasser ad 1000 mL)	20 sec
Waschen	deion. Wasser	3 x 20 sec
Entwicklung	3% Natriumcarbonat 0,05% Formaldehyd (37%), 0,0005% Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (30g Na_2CO_3 + 0,5 mL Formaldehyd (37%) + 5 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + deion. Wasser ad 1000 mL)	3-5 min
Abstoppen	siehe Fixierung	5 min
Waschen	deion. Wasser	3 x 10 min

3.12 Semiquantitative Auswertung der Gele

Die semiquantitative Auswertung erfolgte mit dem SyneGene (Syngene Bioimaging Synoptics) Analyseprogramm (Gene Tools). Als Referenz (100%) wurde jeweils die als erste gemessene Kontrolle festgelegt. Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Office 2003, Microsoft) durchgeführt. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwerts. Die Berechnung zweiseitiger Signifikanzniveaus mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% (signifikant/*, $p < 0,05$), kleiner 1% (eindeutig signifikant/**, $p < 0,01$) und kleiner 0,1% (hoch signifikant/***, $p < 0,001$) erfolgte mit dem Students T-Test.

3.13 Bestimmung der Migrationsstrecke nach *in vitro*-Verwundung

Die Zellen wurden nach der Verwundung bei 20-facher Vergrößerung fotografiert und die gleiche Stelle wurde dann nach Beendigung des Experimentes wieder aufgenommen. Die Verwundungslinie wurde dann in 15 gleiche Abstände unterteilt und die Migrationsstrecke von den am weitesten gewanderten Pionierzellen pro Einteilungseinheit vermessen.

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung von TFF-Peptiden bzw. TNF α auf Epithelzellen

4.1.1 Untersuchung der motogenen Wirkung von TFF2-glyk auf IEC-18- und BEAS-2B-Zellen nach *in vitro* Verwundung

Im Rahmen früherer Untersuchungen an BEAS-2B-Zellen wurde die motogene Aktivität von TFF2 nachgewiesen (Oertel et al., 2001; Chwieralski et al., 2004). Mit Hilfe von *in vitro*-Wundheilungsexperimenten sollte nun die Auswirkung von TFF2 auf die Genexpression der migrierenden/restituierenden Zellen untersucht werden. Außerdem sollte die Wirkung von TFF2 auch auf IEC-18-Zellen getestet werden, die als Modell für die intestinale Restitution etabliert sind (Dürer et al., 2007).

Für die Experimente wurde rekombinantes glykosyliertes humanes TFF2 (TFF2-glyk) verwendet. Der unter reduzierenden Bedingungen durchgeführte Western Blot bestätigte die zu erwartende relative Molekülmasse von TFF2 (M_r 11,9 kDa + Anteil für Glykosylierung) (Abb. A1, siehe Anhang).

Unter Einwirkung von 1,3-2,0 μ M rekombinatem TFF2-glyk (über 48-72 h) wurden bei IEC-18- bzw. BEAS-2B-Zellen keine signifikanten Unterschiede der zurückgelegten Restitutionsstrecke (Pionierzellen) gegenüber der Kontrolle festgestellt (Abb. 8).

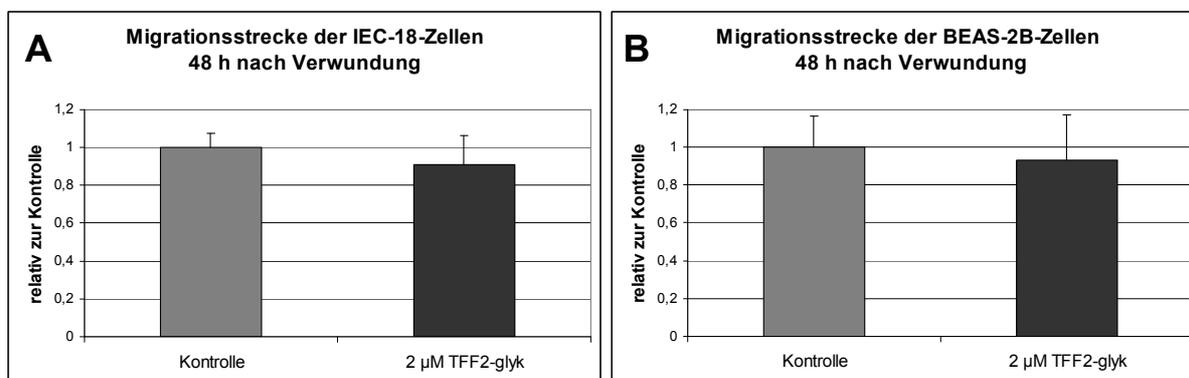


Abb. 8: Migration von IEC-18- (A) und BEAS-2B-Zellen (B). Migrationsstrecke der Pionierzellen nach Verwundung und 48-stündiger Inkubation mit 2 μ M TFF2-glyk (mit Mediumwechsel nach 24 h) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (+ PBS). Diagramm eines repräsentativen 3-fach-Experimentes: dabei wurde die Migrationsstrecke von 15 Pionierzellen pro Bild in regelmäßigen Abständen vermessen.

4.1.2 Wirkung von TFF2-glyk auf CXCR4-exprimierende Zellen

Den TFF-Peptiden wurden bisher keine Liganden-Bindungsstellen auf den Zelloberflächenrezeptoren zugewiesen. Lediglich für den CXCR4-Rezeptor wurde eine niederaffine TFF2-Bindung beschrieben (Dubeykovskaya et al, 2009). Mit Hilfe von CXCR4-exprimierenden HEK293-Zellen sollte eine mögliche Genexpressionänderung nach TFF2-Stimulation untersucht werden. Als positive Kontrolle diente der CXCR4-Ligand SDF-1 α (*stromal derived factor 1a*, heute als CXCL12 bezeichnet).

Zu den SDF-1-regulierten Genen gehören u.a. CXCL1 (*chemokine [C-X-C motif] ligand 1*, früher GRO α [*growth regulated oncogene-alpha*] genannt) oder CCL2 (früher MCP-1 [*monocyte chemoattractant protein 1*]) (Dwinell et al., 1999; Crane et al., 2000).

Die Behandlung der HEK.CXCR4 und HEK.CD4.403/CXCR4-Zellen für 24 h mit 1,6 bzw. 3,2 μ M rekombinatem TFF2-glyk, sowohl in serumhaltigem (5%) als auch serumfreiem Medium, zeigte keine erhöhte CXCL1-Expression, wie dies nach SDF-1 α -Stimulation zu beobachten war (Abb. 9). Ein ähnliches Ergebnis wurde für CXCL2 erhalten (Daten nicht gezeigt).

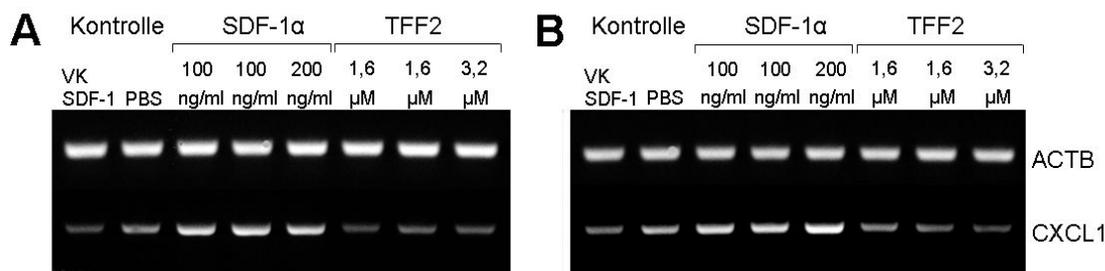


Abb. 9: RT-PCR-Analyse. Expression von CXCL1 (GRO α) 24 h nach Stimulation mit 100-200 ng/mL SDF-1 α (CXCL12) oder mit 1,6-3,2 μ M TFF2-glyk (in 5% FCS-haltigem Medium) in HEK.CXCR4- (A) bzw. HEK.CD4.403/CXCR4-Zellen (B). Die Analyse der β -Actintranskripte diente als Kontrolle für die Integrität der cDNA. (Zykluszahlen: ACTB, 30x; CXCL1, 33x). VK: Vehikel-Kontrolle für SDF-1 α

4.1.3. Untersuchung der motogenen Wirkung von TFF3 und EGF auf IEC-18- und BEAS-2B-Zellen nach *in vitro* Verwundung

An IEC-18-Zellen wurde von Dürer et al. (2007) die motogene Aktivität des TFF3-Dimers nachgewiesen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der hier vorgelegten Arbeiten eine vergleichende Genexpressionsanalyse der migrierenden/restituierenden und stationären Zellen nach Behandlung mit TFF3-Dimer durchgeführt. Zusätzlich wurde diesbezüglich auch die BEAS-2B-Zelllinie untersucht, bei der früher die motogene Wirkung von TFF3-Monomer und TFF3-Dimer beschrieben wurde (Chwieralski et al., 2004).

Die eingesetzten rekombinanten humanen TFF3-Dimer-Peptide variierten in Bezug auf den Gehalt von reinem TFF3-Dimer. Die verwendeten Chargen von 2007 und 2009 wiesen im Western Blot nach der Immunfärbung mit TFF3-Antikörper sowohl unter reduzierenden als auch nichtreduzierenden Bedingungen noch zusätzliche Nebenbanden über der zu erwartenden Molekülmasse (M_r ca. 7,5 kDa bzw. ca. 15 kDa) auf (Abb. A2, siehe Anhang).

In den *in vitro*-Verwundungsexperimenten unter Einwirkung von 1,5-2,0 μ M rekombinantem TFF3-Dimer (40-48 h) wurden keine signifikanten Unterschiede in der zurückgelegten Restitutionsstrecke der migratorischen Zellen festgestellt. Die Behandlung mit 5 nM EGF lieferte dagegen signifikante Unterschiede sowohl in der Migrationsstrecke (größer als bei den unbehandelten bzw. mit TFF3-Dimer/Monomer behandelten Zellen) (Abb. 10) als auch in einer weniger kollektiven Migrationsweise mit vielen individuell wandernden Zellen.

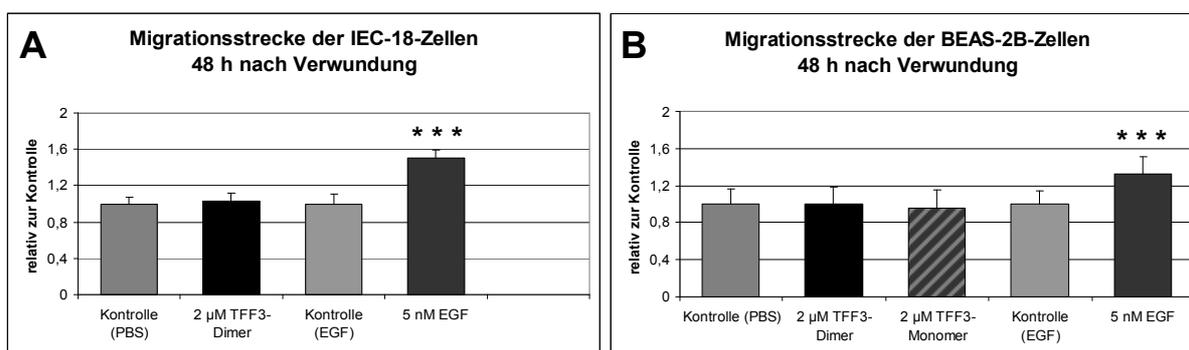


Abb. 10: Migration von IEC-18- (A) und BEAS-2B-Zellen (B). Migrationsstrecke der Pionierzellen nach Verwundung und 48-stündiger Inkubation mit 2 μ M TFF-Dimer bzw. 2 μ M TFF3-Monomer bzw. 5 nM EGF (mit Mediumwechsel nach 24 h) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollzellen (+ PBS). Diagramm eines repräsentativen 3-fach-Experimentes: dabei wurde die Migrationsstrecke von 15 Pionierzellen pro Bild in regelmäßigen Abständen vermessen.

Die 40-48-stündige Behandlung von IEC-18-Zellen mit 1,5-2,0 μ M TFF3-Dimer oder 48-72-stündige Behandlung von BEAS-2B-Zellen während der Wundheilungsexperimente mit 1,5-2,0 μ M TFF3-Dimer oder TFF3-Monomer lieferte keine Hinweise auf Unterschiede in den Migrationsmustern im Vergleich mit den unbehandelten Zellen (Abb. 11).

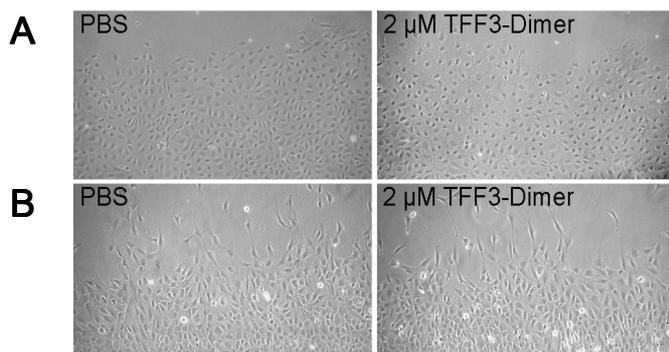


Abb. 11: Migrierende/restituierende IEC-18-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) 48 h nach Verwundung und Behandlung mit 2 µM TFF2-Dimer. Als Referenz dienten mit PBS behandelte Zellen.

4.1.4 Expressionsanalysen nach TFF3- bzw. TNF α -Behandlung nach totaler Verwundung von IEC-18-, BEAS-2B- und A549-Zellen

Die mehrfache *in vitro*-Verwundung des konfluenten Zellrasens mit Hilfe einer Pipettenspitze diente der Erzeugung eines stark restituierenden Systems. Durch die Bildung von zahlreichen Wundspalten und gleichzeitiger Verringerung der Anzahl nicht verwundeter Zellen wurde die Verwundungsfläche maximiert. Mit Hilfe dieser Methode sollte untersucht werden, ob migrierende bzw. restituierende Zellen möglicherweise stärker als nicht verwundete Zellen auf eine Behandlung mit TFF3 ansprechen. Durch TNF α -induzierte Entzündungsprozesse sollte geprüft werden, ob TFF3 einen Effekt auf die Expression der in diesem Modell hochregulierten Gene hat. Dazu gehören IL-6 und IL-8 (Graness et al., 2002), CXCL2 (Driscoll et al., 1995), PTGS2 (COX2) (Chen et al., 2000), SERPINE1 (*serpin-peptidase inhibitor clade E*, auch PAI1 genannt) (Liu et al., 2005). Außerdem wurde eine aktivierende Wirkung von TFF3 auf die Matrixmetalloproteinasen MMP1, -3, -13 (Rösler et al., 2010) und zusätzlich auf MMP9 (Schulze et al., 2010) beschrieben.

Das in den Experimenten eingesetzte rekombinante humane TFF3-Monomer zeigte im Western Blot nach der Immunfärbung mit TFF3-Antikörper unter nichtreduzierenden Bedingungen noch eine zusätzliche Bande über der zu erwartenden Molekülmasse M_r (ca. 7,5 kDa). Diese Bande entsprach der relativen Molekülmasse von humanem TFF3-Dimer (ca. 15 kDa) (Abb. A3, siehe Anhang).

Totaler Verwundung von IEC-18-Zellen und Behandlung mit TNF α und TFF3-Monomer bzw. Dimer

Die Experimente, in denen vollständig verwundete und unverwundete IEC-18-Zellen für 8 bzw. 24 h mit 2 µM TFF3-Monomer bzw. 2 µM TFF3-Dimer behandelt wurden (sowohl in serumreduziertem (0,2 % FCS) als auch in 5% FCS-haltigem Medium), offenbarten keine signifikanten Anhaltspunkte für eine mögliche Wirkung von TFF3 auf die Expression von IL-6. Die Expression von Mmp9 war in den verwundeten Zellen signifikant verstärkt gegenüber von Zellen, die nicht mit TFF3 behandelt wurden (Abb. 12).

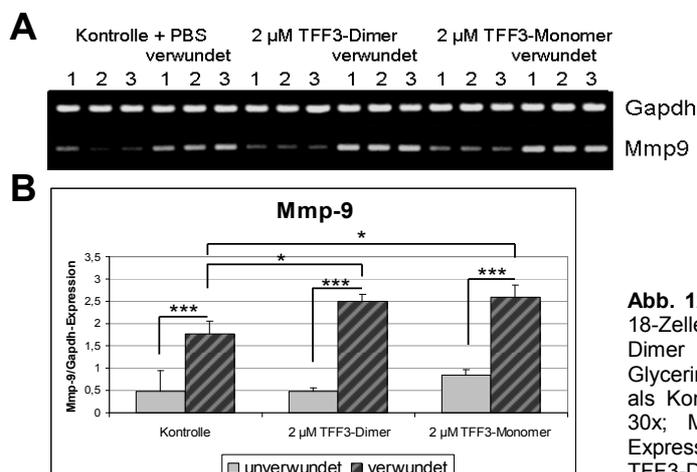


Abb. 12: RT-PCR-Analyse. **A:** Expression von Mmp9 in IEC-18-Zellen nach achtstündiger Behandlung mit 2 µM TFF3-Dimer oder Monomer (jeweils als 3-fach Ansatz). Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Gapdh) diente als Kontrolle der Integrität der cDNA (Zykluszahlen: Gapdh, 30x; Mmp-9, 35x). **B:** Semiquantitative Auswertung der Expression Mmp9 nach achtstündiger Behandlung mit 2 µM TFF3-Dimer oder Monomer (jeweils als 3-fach Ansatz),

In total verwundeten Zellen konnte 8 h nach der Verwundung eine gesteigerte Expression von Cxcl2, Ptgs2 und Serpine1 nachgewiesen werden. Die Zugabe von TNF α (20 ng/mL) nach der Verwundung resultierte in einer Erhöhung der Expression von Il-6 und Cxcl2 sowohl in den unverwundeten als auch in den verwundeten Zellen. Eine achtstündige Behandlung unverwundeter Zellen mit 2 μ M TFF3-Monomer führte ebenfalls zu einer signifikanten Verstärkung der Expression von Cxcl2, Ptgs2 und Serpine1 (Abb. 13). Die gleichzeitige Stimulation mit 2 μ M TFF3-Monomer und TNF α hatte unterschiedliche Wirkungen auf Il-6, Cxcl2, Ptgs2 und Serpine1. Dabei wurde in den unverwundeten Zellen die Expression von Cxcl2 signifikant vermindert. Für Il-6 und Ptgs2 zeigte sich eine signifikante mindernde Wirkung von TFF3-Monomer in den verwundeten Zellen. Auf die Expression von Serpine1 hatte TFF3-Monomer sowohl in den verwundeten als auch in den unverwundeten Zellen einen dämpfenden Effekt (Abb. 13).

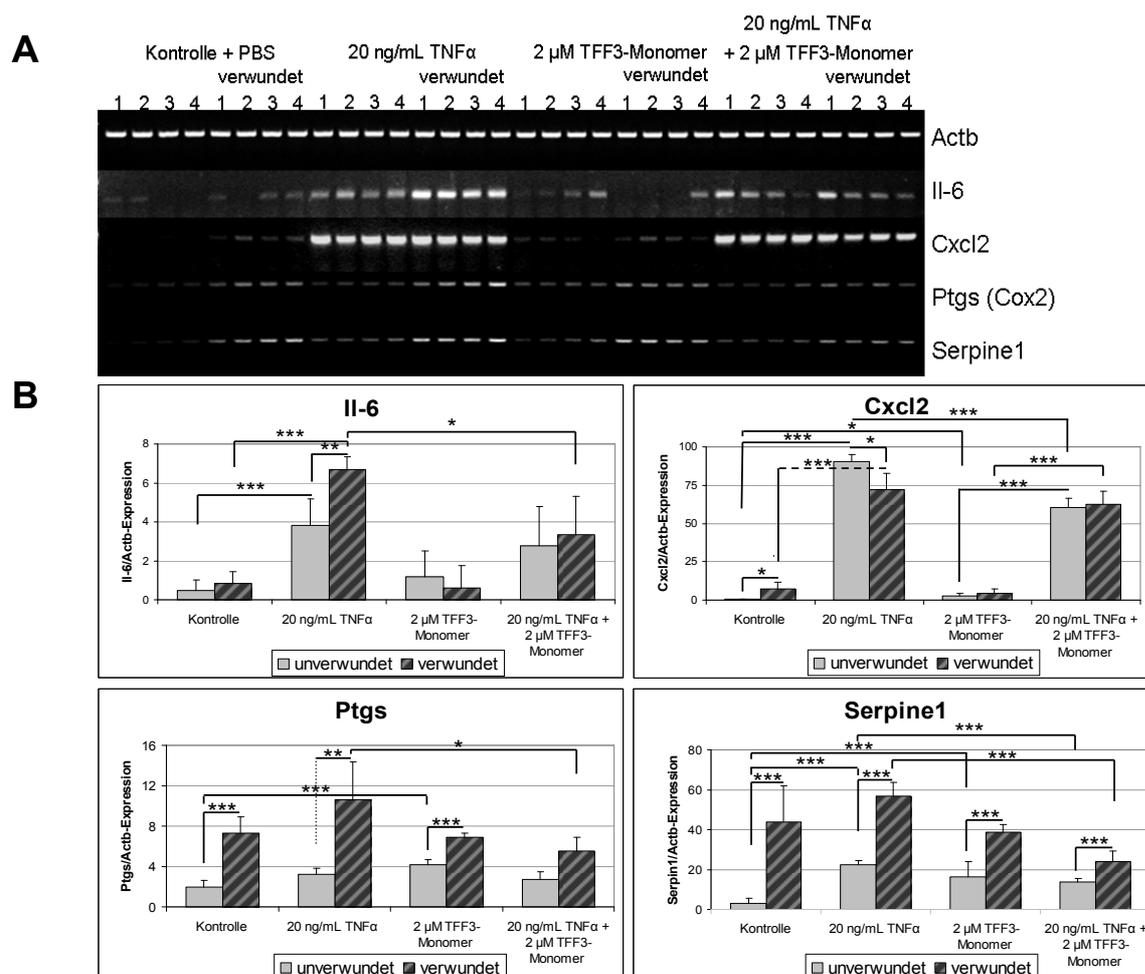
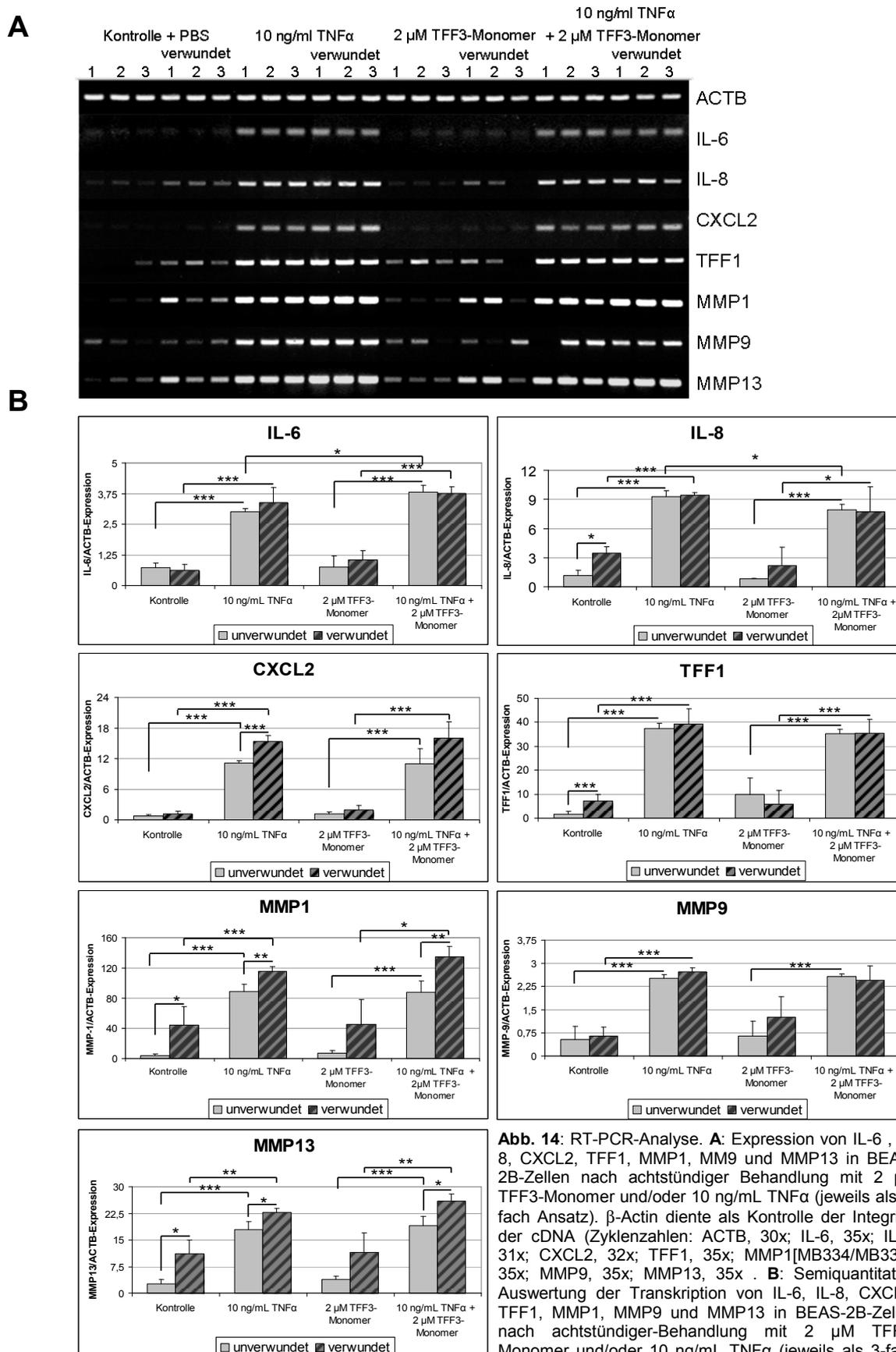


Abb. 13: RT-PCR-Analyse. **A:** Expression von Cxcl2, Ptgs und Serpine1(Pai1) in IEC-18-Zellen nach achtstündiger Behandlung mit 2 μ M TFF3-Monomer und/oder 20 ng/mL TNF α (jeweils als 4-fach Ansatz). β -Actin (Actb) diente als Kontrolle der Integrität der cDNA (Zykluszahlen: Actb, 30x; Cxcl2, 35x; Ptgs, 30x; Serpine1, 30x). **B:** Semiquantitative Auswertung der Transkription von Cxcl2, Ptgs2 und Serpin1, normalisiert auf Actb, in IEC-18-Zellen nach achtstündiger Behandlung mit 2 μ M TFF3-Monomer und/oder 20 ng/mL TNF α (jeweils als 4-fach Ansatz).

Totale Verwundung von BEAS-2B-Zellen und A549-Zellen und Behandlung mit TNF α und TFF3-Monomer

Graness et. al. (2002) beschrieben eine gesteigerte Sekretion von IL-6 und IL-8 durch TNF α -stimulierte BEAS-2B-Zellen nach TFF3-Dimer-Zugabe. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurde die Wirkung des TFF3-Monomers auf die nach TNF α -Behandlung gesteigerte Expression von IL-6 und IL-8 sowie MMP1, -3, -9, -10 und -13 (Li et al., 2003, Scott et al., 2004) geprüft. Die anti-inflammatorischen Zytokine wie IL-1 β und TNF α haben eine sowohl induzierende (Tebbutt et al., 2002) als auch hemmende (Dossinger et al. 2002; Loncar et al.,

2003;) Wirkung auf die Expression der TFF-Peptide. Hier wurde ebenfalls die mögliche Auswirkung des TFF3-Monomers auf die TFF1, -2 und -3-Expression untersucht



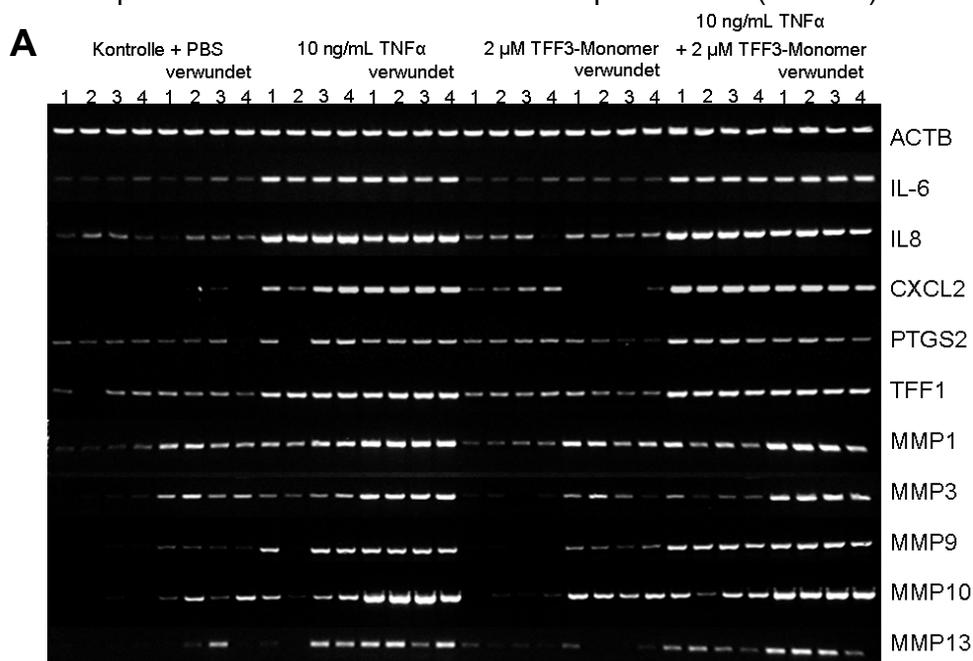
Die konfluenten BEAS-2B Zellen wurden *in vitro* verwundet und für 8 h mit TNF α (10 ng/mL), 2 μ M TFF3-Monomer und TNF α zusammen mit TFF3-Monomer inkubiert. Die gesteigerte Expression von IL-6 und IL-8 nach TNF α -Behandlung wurde in den zusätzlich mit TFF3-Monomer behandelten verwundeten Zellen nicht signifikant verändert (Abb. 14, siehe S. 56). Für die unverwundeten Zellen konnte jedoch eine leicht hemmende Wirkung auf IL-8 beobachtet werden. Die Inkubation mit TFF3-Monomer alleine ergab für IL-6 und IL-8 keine signifikante Veränderung. Zu den Genen, die nach der TNF α -Behandlung besonders in den verwundeten Zellen stark erhöht wurden, gehörte u.a. CXCL2. Die Behandlung mit TFF3-Monomer ergab keine Veränderung der CXCL2-Expression (Abb. 14).

Die TNF α -Behandlung führte zu einer gesteigerten Expression von TFF1 und wurde durch TFF3-Monomer-Applikation nicht verändert. Eine leichte Steigerung der Expression wurde auch in den unbehandelten verwundeten gegenüber den unverwundeten Zellen beobachtet. Die Inkubation mit TFF3-Monomer alleine ergab keine signifikante Veränderung (Abb. 14). Die Expression von TFF2- und TFF3 wurde ebenfalls nicht induziert bzw. nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Die Expression von MMP1, -9, und -13, die jeweils in den verwundeten Zellen erhöht war, wurde durch TNF α -Inkubation gesteigert. Die Zugabe von TFF3-Monomer brachte keine signifikante Veränderung in der Expression der untersuchten Matrixmetalloproteinasen (Abb. 14).

Die Wirkung des TFF3-Monomers auf TNF α -behandelte Zellen wurde außerdem in der A549-Lungen-Krebszelllinie untersucht. Auch hier wurden die konfluenten A549-Zellen *in vitro* verwundet und für 8 h mit TNF α (10 ng/mL) bzw. 2 μ M TFF3-Monomer oder in Kombination von beiden inkubiert. Die gesteigerte Expression von IL-6 und IL-8 nach TNF α -Stimulation wurde in den zusätzlich mit TFF3-Monomer behandelten unverwundeten Zellen leicht reduziert (Abb. 15). Außerdem wurde sowohl in unverwundeten als auch verwundeten Zellen die durch TNF α hochregulierte Expression von CXCL2 herabgesetzt. Die für die PTGS2-Expression beobachtete Tendenz zur Reduktion in den verwundeten Zellen wurde nach der TFF3-Monomer-Zugabe signifikant. (Abb. 15). TFF1 wurde durch die Behandlung mit TNF α hochreguliert und durch die TFF3-Monomer-Gabe nicht verändert (Abb. 15).

Die verwundeten Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung der Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP1, -3, -9, -10, sowie eine nichtsignifikante von MMP13 gegenüber den unverwundeten Zellen. Die Behandlung mit TNF α führte zum Anstieg der Expression aller MMPs, wobei MMP3 und MMP10 besonders stark erhöht wurden. Die Behandlung mit TNF α zusammen mit TFF3-Monomer führte zur Hochregulation von MMP9 in den verwundeten Zellen. Dies war der einzige Effekt des TFF3-Monomers auf die Transkription der untersuchten Matrixmetalloproteinasen (Abb. 15).



B

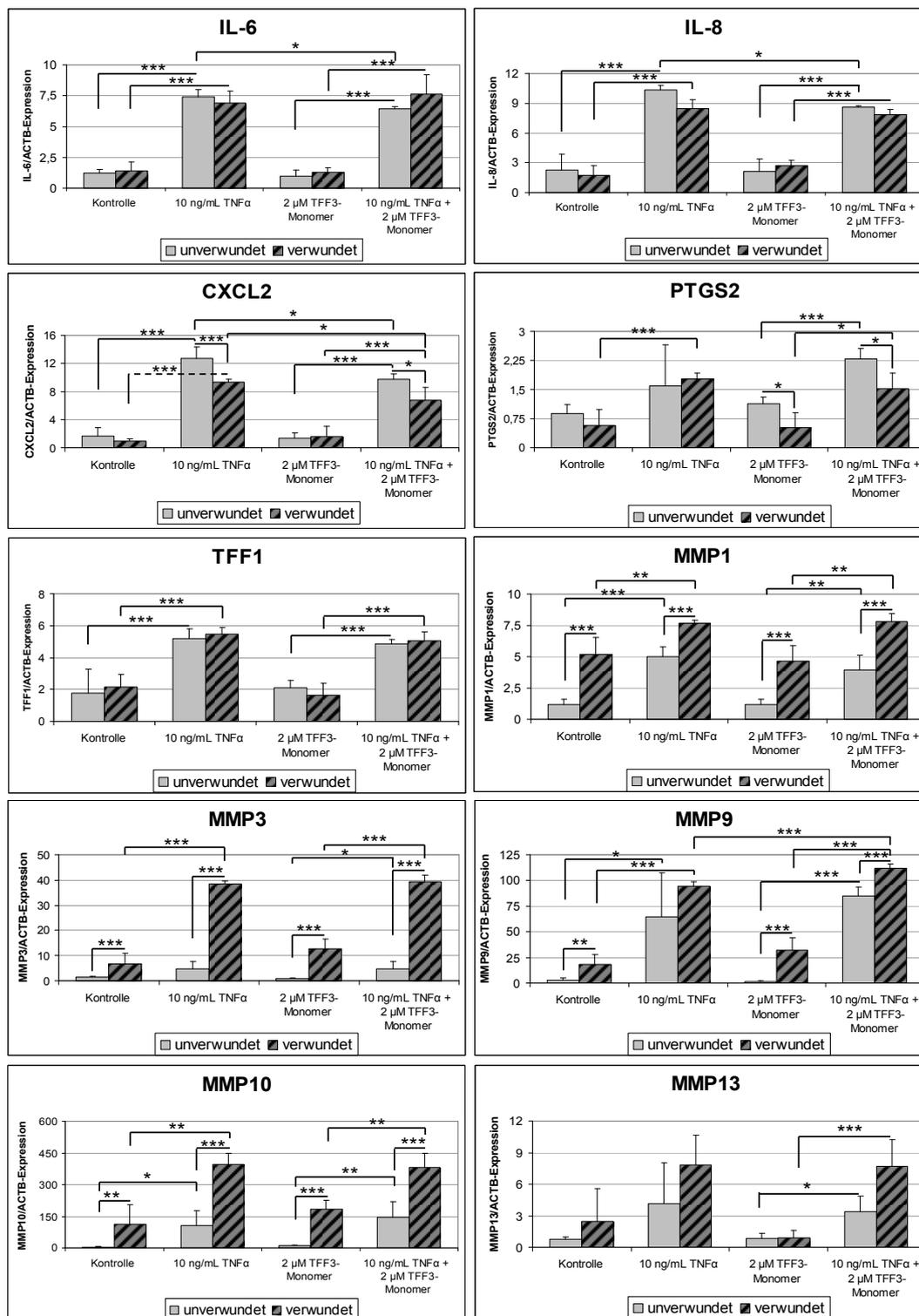


Abb 15: RT-PCR-Analyse. **A:** Expression von IL-6, IL-8, CXCL2, PTGS2, TFF1, MMP1, MMP3, MMP9, MMP10 und MMP13 in A549-Zellen nach achtstündiger Behandlung mit 2 μM TFF3-Monomer und/oder 10 ng/mL TNFα (jeweils als 4-fach Ansatz). β-Actin (ACTB) diente als Kontrolle der Integrität der cDNA (Zykelzahlen: ACTB, 29x; IL-6, 35x; IL-8, 32x; CXCL2, 31x; PTGS2, 30x; TFF1, 31x; MMP1[MB1839/MB1840], 31x; MMP3[MB1918/MB1919], 32x; MMP9, 35x; MMP10[MB1916/1917], 32x; MMP13, 35x. **B:** Semiquantitative Auswertung der Transkription von IL-6, IL-8, CXCL2, PTGS2, TFF1, MMP1, MMP3, MMP9, MMP10 und MMP13 normalisiert auf ACTB in A549-Zellen nach achtstündiger Behandlung mit 2 μM TFF3-Monomer und/oder 10 ng/mL TNFα (jeweils als 4-fach Ansatz).

4.2 Expressionsanalysen von getrennten stationären bzw. migrierenden Epithelzellen

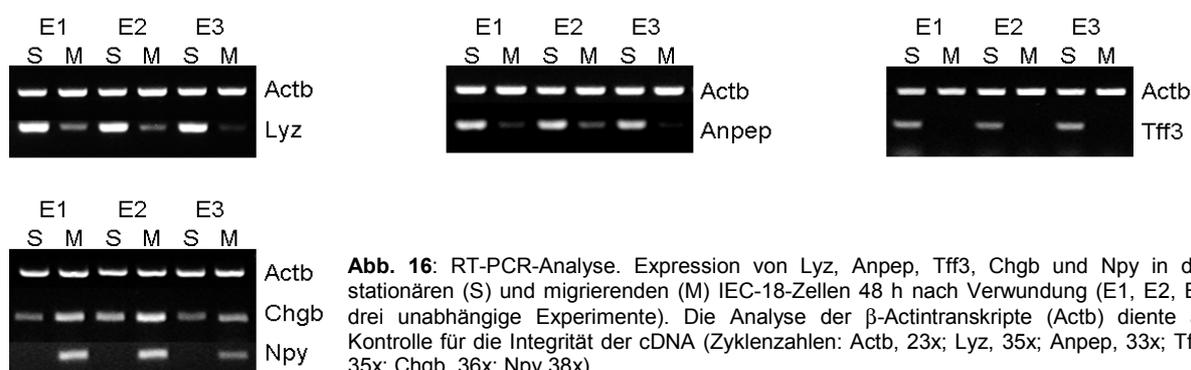
Dürer et al. (2007) beschrieben die Unterschiede in der motogenen Wirkung der rekombinanten TFF3-Dimere und von EGF auf restituierende IEC-18-Zellen in *in vitro*-Verwundungsexperimenten. Mit Hilfe von Zeitraffer-Video-Mikroskopie, Morphometrie und Immunzytochemie konnte gezeigt werden dass die TFF3-Dimer-Behandlung zu einer kollektiven Migrationsweise mit nur wenigen Lücken zwischen den benachbarten Zellen führte. EGF dagegen bewirkte ein Netzwerk wandernder Zellen (oft mit Fibroblasten-ähnlicher Morphologie) mit zahlreichen Lücken und nur punktuellen Zell-Zell-Kontakten. Mit Hilfe von RT-PCR sollten vergleichende Genexpressionsanalysen von migrierenden/restituierenden und stationären Zellen durchgeführt werden. Dabei wurde in erster Linie die nicht transformierte, intestinale IEC-18-Zelllinie untersucht. Parallel dazu wurden noch weitere Epithelzellen untersucht, nämlich die transformierte Zelllinie BEAS-2B sowie die Krebszelllinien A549 (Lunge) und AGS (Magen).

4.2.1 Charakterisierung von stationären und migrierenden intestinalen IEC-18-Zellen

Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Expressionprofile restituierender bzw. an der Restitution nicht aktiv beteiligter Zellen bezüglich Differenzierung, EMT, Proliferation und Apoptose. Die Transkripte von β -Actin, Rps26 (*ribosomal protein S26*) oder Mrps18a (*mitochondrial ribosomal protein S18A*) fungierten als Kontrollen für die Menge und Integrität der cDNA. Die Actb-Promotor-Sequenz diente dem Nachweis genomischer DNA (mögliche Verunreinigung). Die vorgestellten Ergebnisse sind deshalb als relative Genexpressionsänderungen im Verhältnis zu β -Actin, Rps26 bzw. Mrps18a zu verstehen.

Die Genexpressionsanalyse der IEC-18-Zellen 48 h nach einer Verwundung des konfluenten, langzeitkultivierten Zellrasens offenbarte drei Muster. Die Gentranskription in den stationären und migrierenden Zellen war entweder unverändert (bzw. änderte sich nur sehr wenig) oder wurde deutlich stärker bzw. schwächer.

Die aus Epithelzellen der Ileum-Kryptenregion neugeborener Ratten etablierte Zelllinie ist bekannt für ihre Fähigkeit zur Differenzierung (Shintani et al., 1989, Suh and Traber, 1996; Soubeyran et al., 1999; Gordon et al., 2005) und integriert Vorläuferzellen bzw. Populationen der unterschiedlichen Differenzierungslinien. Die systematische Analyse der getrennten migrierenden und stationären Zellen zeigte während der Restitution Zeichen von Dedifferenzierung. Dabei wurden der Enterozyten-Marker Aminopeptidase N (Anpep), der Becherzellen-Marker Tff3 sowie Lysozym (Lyz) als Marker für Panethzellen stark herunterreguliert. Die Transkription von Markern für enteroendokrine Zellen wie Chromogranin B (Chgb) oder auch Neuropeptid Y (Npy) unterlag dagegen großen Schwankungen. In den restituierenden Zellen ergab sich jedoch die Tendenz zur Hochregulation (Abb. 16).



Die Marker für noradrenerge und serotonerge Neurone wurden während der Restitution herunterreguliert. Die Transkription von neuronspezifischer Enolase2 (Eno2) blieb jedoch (fast) unverändert. Dagegen wurde Nestin (Nes) als Marker für Vorläufer vieler Zelltypen (u.a. des Zentral- und Periphärennervensystems, myogenen und anderen Gewebearten) in den migrierenden Zellen hochreguliert. Die IEC-18-Zellen transkribieren auch *glucagon-like peptide-2 receptor* (Glp2r), welches in den migrierenden Zellen hochreguliert wurde (Abb. 17).

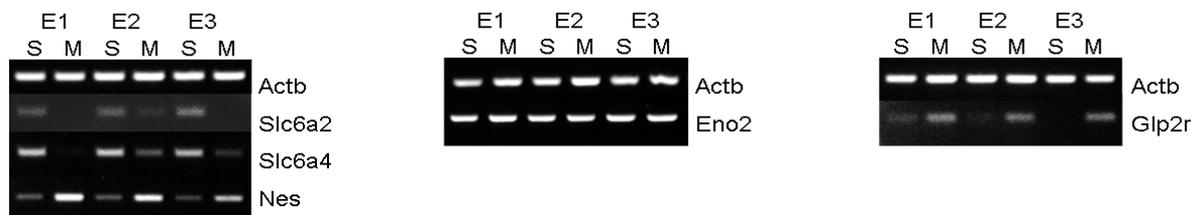


Abb. 17: RT-PCR-Analyse. Expression von Noradrenalin- und Serotonin-Transporter (Slc6a2, Slc6a4), Nestin (Nes), Enolase2 (Eno2) sowie Glp2-Rezeptor (Glp2r) in den stationären (S) und migrierenden (M) IEC-18-Zellen 48 h nach Verwundung (E1, E2, E3: drei unabhängige Experimente). Die Analyse der β -Actintranskripte (Actb) diente als Kontrolle für die Integrität der cDNA (Zykluszahlen: Actb, 23x; Slc6a2, 35x; Slc6a4, 35x; Nes, 30x; Eno2, 33x; Glp2r, 35x).

Unter den detektierten Genen, die bevorzugt auch in den Stammzellen exprimiert werden, befinden sich die Transkriptionsfaktoren Bmi1, Hes1 und Msi1 sowie der G-Proteingekoppelte Rezeptor Lgr5. Während Bmi1 und Hes1 in den migrierten Zellen ohne Veränderung bzw. mit einer Tendenz zum leichten Anstieg (parallel β -Actin) transkribiert wurden, zeigte die Expression von Msi1 und Lgr5 eine Tendenz zur Abnahme. Das überwiegend in terminal differenzierten postmitotischen Zellen exprimierte und sich an der Zellzykluskontrolle beteiligende Klf4 wurde während der Restitution hochreguliert. Die Expression der Transkriptionsfaktoren Gata4 oder Gata6 blieb (fast) unverändert, Gata5 wurde deutlich vermindert (Abb. 18).

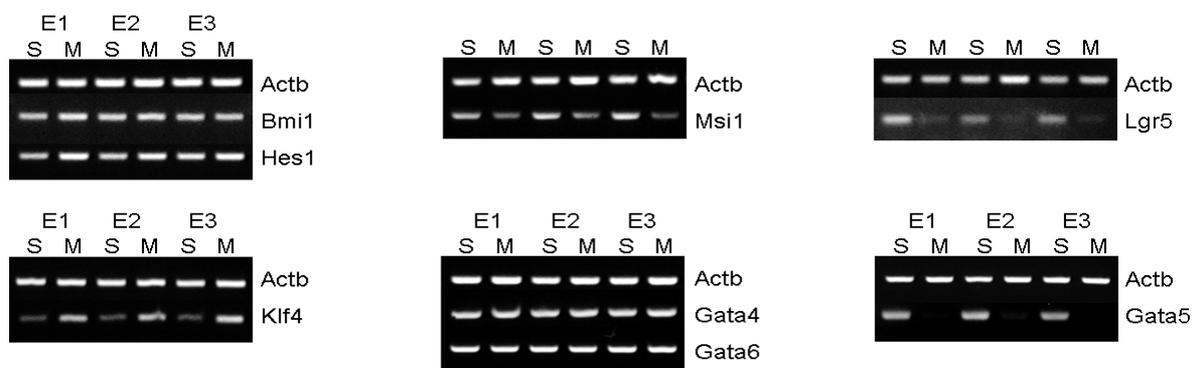


Abb. 18: RT-PCR-Analyse. Expression von Bmi1, Hes1, Msi1, Klf4 und Gata4, -5, -6 sowie Lgr5 in den stationären (S) und migrierenden (M) IEC-18-Zellen 48 h nach Verwundung (E1, E2, E3: drei unabhängige Experimente). Die Analyse der β -Actintranskripte (Actb) diente als Kontrolle für die Integrität der cDNA (Zykluszahlen: Actb, 23x; Bmi1, 30x; Hes1, 35x; Msi1, 35x; Klf4, 30x; Lgr5, 38x; Gata4, 32x; Gata5, 35x; Gata6, 32x).

An der Regulation der Differenzierung im Darm sind auch die Ephrin-Rezeptoren (Ephb) mit ihren Liganden Ephrin-1, -2 und -3 (Efnb) beteiligt. Ihre Transkription variierte in den migrierenden Zellen. Während Efnb1 eine Tendenz zur Minderung aufwies, blieb Efnb2 auf einem unveränderten Niveau bzw. wurde leicht hochreguliert. Die Transkription von Ephb2 und Ephb3 wurde in den migrierenden Zellen vermindert (Abb. 19). Das schwache Signal für Efnb3 und Ephb1 verhinderte eine vergleichende Analyse (Daten nicht gezeigt).

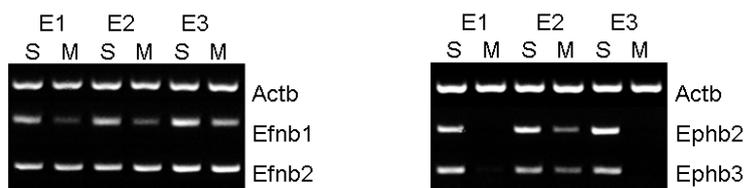


Abb. 19: RT-PCR-Analyse. Expression von Ephrinen B1 und B2 (Efnb1, Efnb2) und den Ephrinrezeptoren (Eph) B2 und B3 in den stationären (S) und migrierenden (M) IEC-18-Zellen 48 h nach Verwundung (E1, E2, E3: drei unabhängige Experimente). Die Analyse der β -Actintranskripte (Actb) diente als Kontrolle für die Integrität der cDNA (Zykluszahlen: Actb, 23x; Efnb1, 35x; Efnb2, 31x; Ephb2, 31x; Ephb3, 35x).

In IEC-18-Zellen, die nur eine moderate E-Cadherin-Expression zeigten (im Vergleich zur IEC-6-Zellen), konnte aufgrund der Varianz der detektierten Transkriptmenge in den migrierenden Zellen nur eine generelle Tendenz zur leichten Herunterregulation beobachtet werden, gelegentlich konnte fast keine Veränderung festgestellt werden.

Für *tight junction protein 1* (Tjp1) wurde ebenfalls eine Minderung der Expression während der Restitution beobachtet, wie auch für Keratin 19 (Krt19). Die Expression von Occludin (Ocln), Twist, Snai2, Vimentin (Vim), sowie Fibronectin (Fn1) blieb auf fast unverändertem Niveau. EMT-Marker, die hochreguliert wurden, waren Acta2 und Acta1. N-Cadherin wurde entweder nicht verändert oder zeigte einen geringen Anstieg. Die Transkriptmenge von Col1a1 (Kollagen Typ1 α 1) änderte sich nur wenig und S100a4 (*S100 calcium binding protein A4*) hatte eine Tendenz zum Anstieg. Auf Proteinebene konnte durch Silberfärbung ein Unterschied in der Gesamt-Proteinverteilung von stationären und migrierenden Zellen beobachtet werden (Abb. 20).

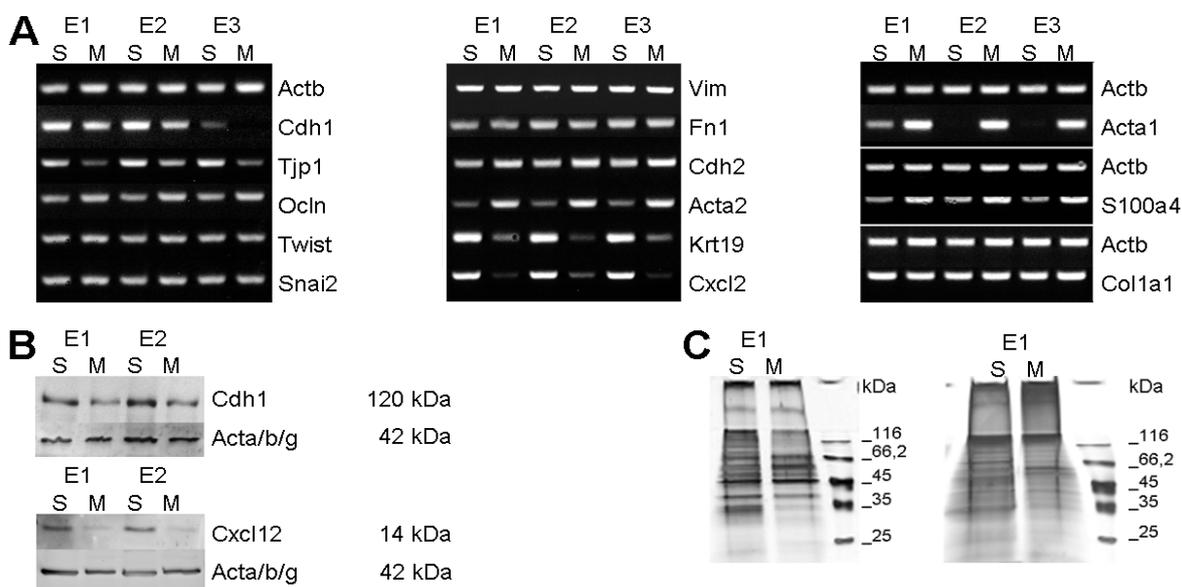


Abb. 20: RT-PCR-Analyse, Western Blots und Silberfärbung. **A:** Expression EMT-relevanter Gene in stationären (S) und in migrierenden (M) IEC-18 Zellen 48 h nach Verwundung (E1, E2, E3: drei unabhängige Experimente): E-Cadherin (Cdh1), *tight junction protein 1* (Tjp-1), Occludin (Ocln), Twist, Snai2, Vimentin (Vim), Fibronectin-1 (Fn1), N-Cadherin (Cdh2), Keratin 19 (Krt19), Acta2 und Acta1 (smooth muscle Actin), Collagen (Col1a1) und S100a4 sowie Cxcl12 (stromal derived factor 1 [Sdf1]). Die Analyse der β -Actintranskripte (Actb) diente als Kontrolle für die Integrität der cDNA (Zykluszahl: Actb, 23x; Cdh1 [MB435/436], 35x; Tjp-1, 27x; Ocln, 28x; Twist 32x; Snai2 32x; Vim, 30x; Fn1, 30x; Cdh2, 32x; Krt19, 35x; Cxcl12, 28x; Acta2, 25x; Acta1, 32x; Col1a1, 30x; S100a4; 30x). **B:** Western Blots unter reduzierenden Bedingungen für E-Cadherin und Cxcl12. **C:** Silberfärbung von aus den stationären und migrierenden IEC-18-Zellen extrahierten Proteinen unter reduzierenden (links) und nicht reduzierenden Bedingungen (rechts).

Ein wichtiges Merkmal der EMT stellt die veränderte, fibroblastenartige Morphologie der Zellen dar. In den durchgeführten Wundheilungsexperimenten nahmen viele migrierende Zellen eine längliche Erscheinungsform an, jedoch zeigten besonders die an der Front migrierende Zellen ein eher gerundetes Aussehen mit einer breiten Front. Durch das Abtragen des Zellrasens mit einer Rasierklinge für die Erzeugung der Wundspalten

entstehen im Migrationssubstrat Vertiefungen (Furchen, Unebenheiten). Diese ermöglichen den Zellen eine stärkere Anbindung an das Substrat und fördern somit die fibroblastoide Migrationsweise. Die hier vorgestellten Ergebnisse bezüglich EMT-Markergene liefern keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich EMT; deuten möglicherweise auf eine partielle EMT der Pionierzellen (bzw. der ihnen angrenzenden Zellen) hin. Dies kann eine vollständige EMT individueller Pionierzellen nicht ausschließen. Die Versuche, ausschließlich die Pionierzellen zu isolieren, lieferten mit der angewandten Methode keine ausreichende Menge von RNA (Überschreitung des Zeitfaktors für das schonende Entnehmen einer ausreichenden Menge von Zellen).

Charakteristisch für die restituierenden IEC-18-Zellen war die Erhöhung der Transkriptmenge für *transforming growth factor α* (Tgfa), *heparin-binding EGF-like growth factor* (Hbegf), Ornithindecaboxylase (Odc), *Serpine1* (Pai1) sowie Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gapdh). Außerdem hochreguliert wurden die Zellzyklus-Proteine wie die Zykline A, D und E (Ccna2, -d1, -e1), *FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila)* (Fat1) und *breast cancer 1* (Brca1). Die untersuchten Caspasen zeigten entweder keine signifikante Veränderung (Casp3, andere Caspasen Daten nicht gezeigt), bzw. einen leichten Anstieg (parallel mit β -Actin). Hochreguliert wurde auch *vascular endothelial growth factor* (Vegf) und *transforming growth factor β 2 und - β 3* (Tgfb2, Tgfb3), Tgfb1 (Tgfb1) wurde dagegen herunterreguliert (Abb. 21).

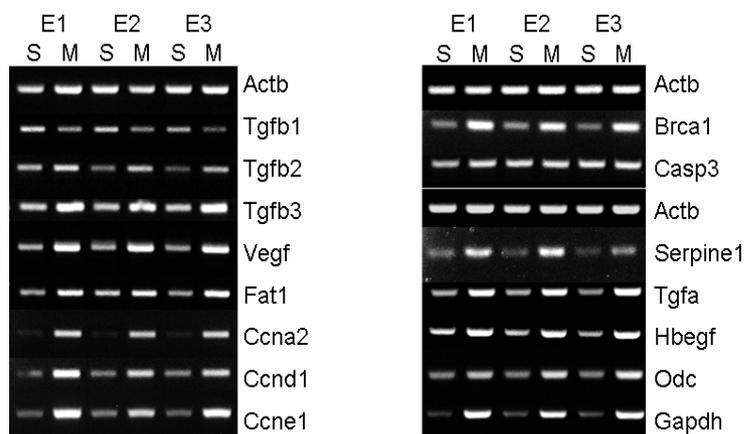


Abb. 21: RT-PCR-Analyse. Expression von Tgf1,-2,-3, Vegf, Fat1, der Zykline Ccna2,-d1, -e1, Apoptose-relevanten Genen Brca1 und Casp3, Serpine1 (Pai1), Tgfa, Hbegf, Odc und Gapdh in stationären (S) und in migrierenden (M) IEC-18 Zellen 48 h nach Verwundung (E1, E2, E3: drei unabhängige Experimente). Die Analyse der β -Actintranskripte (Actb) diente als Kontrolle für die Integrität der cDNA (Zyklenzahlen: Actb:23x, Tgfb1, 33x; Tgfb2, 33x; Tgfb3, 35x; Vegf, 30x; Fat1, 35x; Ccna2, 35x; Ccnd1, 30x; Ccne1, 30x; Brca1, 30x; Casp3, 32x; Serpine1, 27x; Tgfa, 30x; Hbegf, 30x; Odc, 27x; Gapdh, 22x).

Die Expression von Cxcl12 (Sdf1 α) (Abb. 20A, siehe S. 61) und die seines Rezeptors Cxcr4 (Abb. 22A, siehe S. 63) sowie von *epidermal growth factor* (Egf), Egf-Rezeptor (Egfr), Claudinen, *tight junction protein 1,- 2- -3*, *junction adhesion molecule 2* (Jam2), Marvel (Tricellulin), *gap junction protein 1 α* (Gja1/Connexin43), Cingulin (Cng) und Afadin6 (Af6) wurde in migrierenden Zellen ebenfalls erniedrigt. Jam1 (F11r) und Jam3 blieben meistens unverändert. Die Transkription der Catenine α - und β - unterlag Schwankungen (für β -Catenin zeigte sich analog Cdh1 eine leichte Herunterregulation, Daten nicht gezeigt, Immunfluoreszenzfärbung Abb. A6 siehe Anhang), γ -Catenin blieb unverändert. Eine Verringerung der Transkription zeigten auch *myosin light chain kinase 3* (Mylk3) und *myosin VI* (Myo6) (Abb. 22A, siehe S. 63).

4.2.2 Charakterisierung von stationären und migrierenden IEC-18- und IEC-6-Zellen nach EGF-Behandlung

Die 40-48-stündige Behandlung der IEC-18-Zellen mit 1,5-2 μ M TFF3-Dimer oder -Monomer nach Verwundung bewirkte in den restituierenden Zellen keinen (signifikanten) motogenen Effekt. Die Genexpressionsanalyse der untersuchten Gene (Daten nicht vorgestellt) zeigte entweder keine Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen oder unterlag großen Schwankungen. Eindeutige motogene Wirkung zeigte die Behandlung der IEC-18-Zellen

dagegen mit 5 nM EGF. Während der 40-48-stündigen Restitutionsphase in Gegenwart von EGF resultierte diese in einer gesteigerten Restitution/Migration sowie einer signifikanter Erhöhung der Transkription von Claudin-1 und -18, Af6, Marvel (Tricellulin), Cxcr4, Egfr, Egf, Mylk3 (Mlck), Myo6, Cdh17 in den stationären Zellen (Abb. 22A). Zu den Genen, die sowohl in den stationären als auch in migrierenden Zellen hochreguliert wurden gehören Li-Cadherin (Cdh17) und mit leichter Induktion N-Cadherin (Cdh2). Die Transkription von Tff3 und Claudin-2 wurde dagegen erniedrigt.

Ähnliche Wirkung auf die Tff3-Expression hatte die EGF-Inkubation der IEC-6-Zellen. Die Transkription von Tff2 wurde sowohl in den stationären als auch in den migrierenden Zellen induziert, wobei hier eine Minderung der Expression im Vergleich zu den stationären Zellen auf eine Dedifferenzierung hindeutete. Das Transkript von Cldn2 konnte in den IEC-6-Zellen nicht detektiert werden, die Expression von Cldn1 stieg jedoch vergleichbar zu der in den IEC-18-Zellen an. Als weitere Wirkung des EGF zeigte sich die Herunterregulation der Transkription von Acta2 (Abb. 22B).

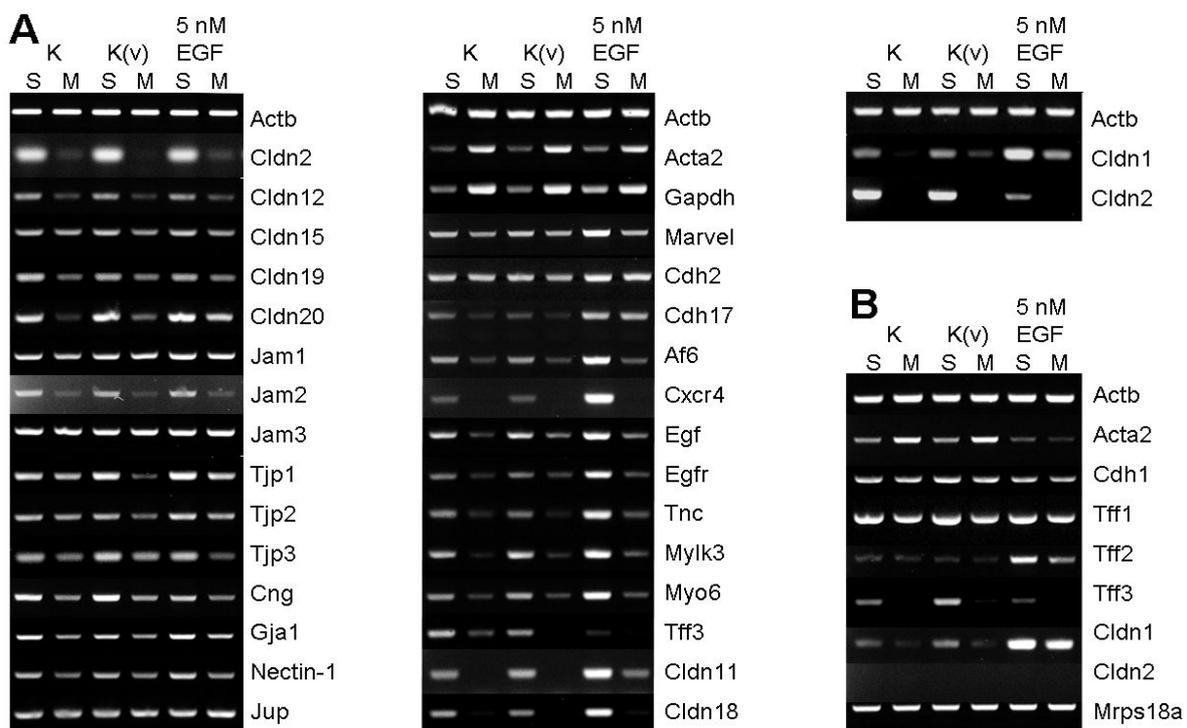


Abb. 22: RT-PCR-Analyse. Expression relevanter Gene für *tight junction*-Verbindungen (Occludin, Claudinen-, Jam-Proteine, Marvel), adherente Verbindungen (E-Cadherin, Li-Cadherin (Cdh17), Nectin-1), *gap-junction*-Verbindungen (Gja1/Connexin43), Adapter und Gerüstproteine (Tjp1,-2,-3/Zonula Occludens (ZO)-Proteine), Cingulin (Cng), Afadin6 (Af6), Jup sowie Cxcr4, Egf, Egf-Rezeptor (Egfr), Tenascin C (Tnc), Mylk3 (Myosin light chain kinase (Mlck), Myosin6 (Myo6), Tff1-3 in IEC-18-Zellen (**A**) und in IEC-6-Zellen (**B**) 48 h nach Verwundung und Inkubation mit 5 nM EGF. β -Actin (Actb) und Mitochondriales Ribosomales Protein S18a (Mrps18a) dienten als Kontrollen für die Integrität der cDNA. Zyklenzahl: Actb, 23x; Cldn6; 35x; Cldn12, 28x; Cldn15, 35x; Cldn19, 35x; Cldn20, 35x; Jam1, 30x; Jam2, 35x; Jam3, 35x; Tjp1, 27x; Tjp2, 28x; Tjp3, 30x; Cng, 28; Gja, 30x; Nectin-1, 30x; Jup, 30x; Acta2, 23x; Gapdh, 22x; Marvel, 28x; Cdh2, 28x; Cdh17, 35x; Af6, 28x; Cxcr4, 35x; Egf, 35x; Egfr, 35x; Tnc[MB729/MB730], 28x; Mylk3, 30x; Myo6, 28x; Tff1-3[MB43/MB44, MB45/MB46, MB47/MB48], 35x; Cldn11, 35x; Cldn18, 35x; Cldn1, 35x; Cldn2, 35x; Cdh1, 28x; Tff1, 35x; Tff2, 35x; Mrps18a, 28x), S: stationäre Zellen, M: migrierende Zellen.

Als Folge der Lösung oder Verminderung von Zell-Zell-Kontakten während der Migration tritt Dedifferenzierung auf. So zeigten auch die in kleinen Dichten ausplattierten Zellen nach der Lösung der Zell-Zell-Kontakte, vergleichbar den migrierenden/restituierenden Zellen, anfänglich eine vorübergehende Minderung oder gänzliche Ausschaltung der Transkription der Differenzierungsmarker im Vergleich mit der ausdifferenzierten Population. Ähnlich den migrierenden Zellen wurde hier die Transkription von Acta2 (α Sma) zunächst hochreguliert. Mit dem Erreichen der Konfluenz und der Ausbildung der Zell-Zell-Verbindungen jedoch wurde sie vermindert, *vice versa* E-Cadherin (Abb. 23, siehe S. 64).

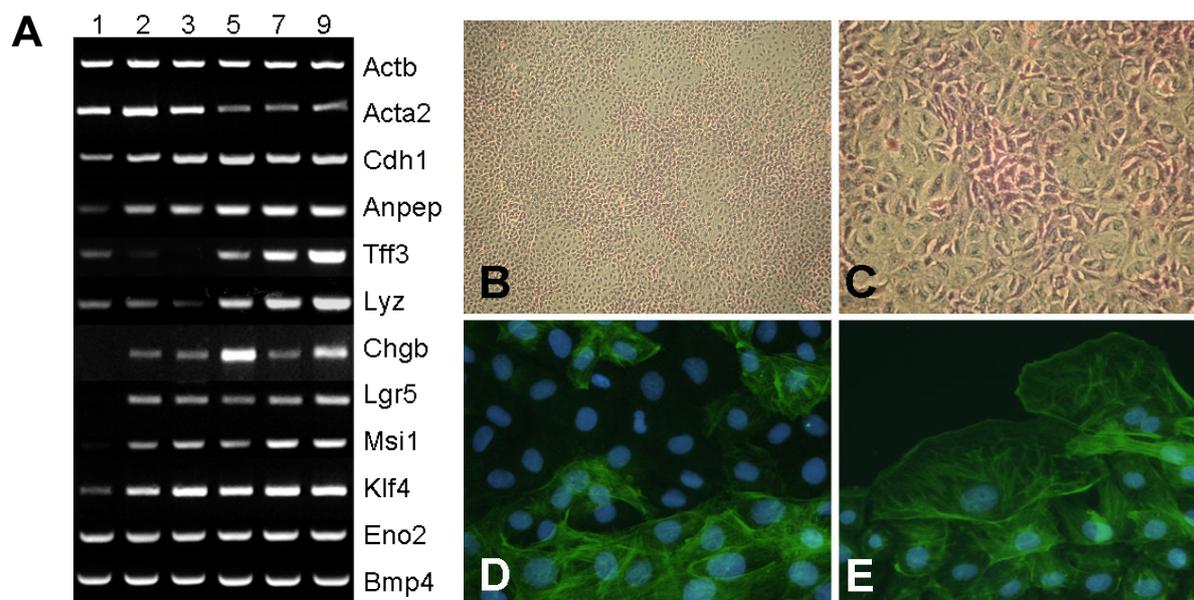


Abb. 23: **A:** RT-PCR-Analyse. Expression von Differenzierungs- und Stammzellen-assoziierten Markern sowie von Acta2 (α Sma) und E-Cadherin (Cdh1) in IEC-18-Zellen während der Langzeitkultivierung. Die IEC-18-Zellen wurden in einer Zelldichte von 0,3 Mio per 100 mm-Zellkulturschale ausplattiert (Tag 0) und nach einer Kultivierungsdauer von einem bis neun Tagen (Tag 1, 2, 3, 5, 7, 9) untersucht. Die Analyse der β -Actintranskripte (Actb) diente als Kontrolle für die Integrität der cDNA. Zykluszahlen: Actb, 23x; Acta2, 21x; Cdh1, 35x; Anpep, 33x; Tff3, 35x; Lyz, 35x; Chgb[MB1904/MB1905], 35x; Lgr5, 35x; Msi1, 35x; Klf4, 31x; Eno2, 30x; Bmp4, 31x). **B** und **C:** PAS-Alcianblaufärbung der IEC-18-Zellen am Tag 6 nach der Ausplattierung in Glas Lab-Tek Chamber-Slides (1 well) in einer Zelldichte von 49500 Zellen (entspricht der Zelldichte von A), in 100- bzw. 200-facher-Vergrößerung. **D** und **E:** Immunfluoreszenz von Acta2 (Sekundärantikörper: FIITC) mit DAPI-Kernfärbung der IEC-18-Zellen in 400-facher-Vergrößerung. Aufnahme am Tag 9 nach 48 h Restitutionsphase. Die Zellen wurden auf Glas Lab-Tek Chamber-Slides (4 wells) in einer Zelldichte von 9500 Zellen ausplattiert (entspricht der Zelldichte von A). Die Verwundung erfolgte am Tag 7 nach Ausplattierung.

4.2.3 BEAS-2B und A549-Zellen

Die aus einem normalen Bronchiepithel hergeleitete und mit SV40/Adenovirus 12 Hybrid immortalisierte BEAS-2B-Zelllinie sowie die aus einem Lungenkarzinom stammende A549-Zelllinie wurden Vergleichsanalysen unterzogen.

Die wenig differenzierten BEAS-2B-Zellen zeigten einheitliche Morphologie und Wachstum. In Serum- oder AC2-freiem Medium wurde fast keine bzw. eine sehr langsame Migration beobachtet. Die Restitution wurde daher mit 1-2% AC-2 bzw. 2% FCS durchgeführt.

Die wenigen positiven Differenzierungsmarker wie TFF1 und SFTPC (*pulmonary surfactant-associated protein C*) als auch SYTL1 (*synaptotogamin-like 1*) wiesen auf eine Dedifferenzierung der migrierenden Zellen hin. Die untersuchten Gene bezüglich EMT (Abb. 24, siehe S. 65) deuteten auf eine partielle Transition hin. Während die typischen EMT-Marker-Gene in den migrierenden Zellen hochreguliert wurden, wie z.B. N-Cadherin (CDH2), SNAI1 oder Fibronectin (FN1), zeigte die ACTA2- und ACTA1-Expression keinen Anstieg. Die Transkription von TWIST unterlag in den einzelnen Experimenten Schwankungen, zeigte aber eine Tendenz zur Abnahme. Die Transkription von E-Cadherin (CDH1) nahm in den migrierenden Zellen ab, die von Occludin (OCLN) blieb aber unverändert. Vimentin (VIM) zeigte in den migrierenden Zellen auf der RNA-Expressionsebene keine starken Veränderungen, der Proteingehalt in den migrierenden Zellen wurde jedoch leicht hochreguliert (Abb. 27B, siehe S. 66).

Die Transkription der Matrixmetalloproteinasen MMP1, MMP3 und MMP9 nahm in den migrierenden Zellen zu, die von MMP2 blieb unverändert und von MMP28 nahm stark ab. Die Transkription von Vitronectin (VTN) sank während der Migration. Die Transkription von Zyklinen CCNA2 und CCNE1 wurde in den migrierenden Zellen nicht verändert, die von CCND1 wurde dagegen erhöht. SERPINE1 (PAI1) sowie HBEGF wurden während der Restitution ebenfalls verstärkt transkribiert (Abb. 24).

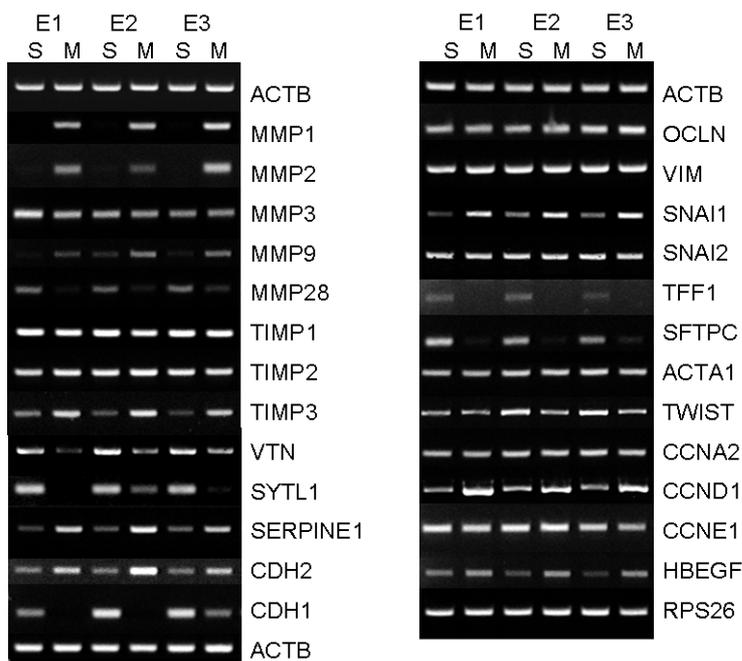


Abb. 24: RT-PCR-Analyse von BEAS-2B-Zellen. Expression von Matrixmetalloproteasen (MMPs), *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMPs), EMT-relevanten Genen (CDH1, CDH2, OCLN, VIM, SNAI1, SNAI2, TWIST; Zykline (CCNA2, CCND1, CCNE1), Differenzierungsmarkern (TFF1, *pulmonary surfactant-associated protein C* [SFTPC]) sowie von SERPINE1 (PAI1), *synaptotagmin-like 1* (SYTL1), Vitronectin (VTN), ACTA1 und HBEGF in stationären (S) und in migrierenden (M) Zellen 72 h nach Verwundung (mit Mediumwechsel nach 48 h; E1, E2, E3: drei unabhängige Experimente). Die Analyse der Transkripte von β -Actin (ACTB) und Ribosomalen Protein 26S (RPS26) dienen als Kontrolle der Integrität der cDNA (Zykluszahlen: ACTB, 30x; RPS26, 30x; MMP1[MB334/MB335], 33x; MMP2, 35x; MMP3[MB1391/MB1392], 35x; MMP9, 35x; MMP28, 33x; TIMP1, 33x; TIMP2, 33x; TIMP3, 33x; VTN, 33x; SYTL1, 35x; SERPINE1 (PAI1), 30x; CDH2, 30x; CDH1, 35x; OCLN, 31x; VIM, 30x; SNAI1, 31x; SNAI2, 31x; TFF1, 35; SFTPC, 35x; TWIST, 32x; CCNA2, 30x; CCND1, 30x; CCNE1, 30x; HBEGF; 28x).

In den migrierenden BEAS-2B-Zellen zeigte sich außerdem eine Verstärkung der Transkription von Tenascin C (TNC), GATA3 und DKK1 (Abb. 27A).

Eine EGF-Behandlung zeigte, im Gegensatz zu einer Stimulation mit TFF3, deutliche Effekte auf die Migrationsstrecke (Abb. 10, siehe S. 53) sowie auf das Erscheinungsbild der restituierenden Zellen (vermehrte Anzahl an individuell migrierenden oder hintereinander migrierenden Zellen, Abb. A4, siehe Anhang). Nur für die Expression von MMP1 konnte eine signifikante Wirkung von EGF festgestellt werden (Abb. 27B, siehe S. 66). Western Blotanalysen von BEAS-2B-Zellen bezüglich MMP1 ergaben keine eindeutigen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt, Immunfluoreszenzfärbung siehe Abb. A5 im Anhang).

Bei den verletzten A549-Zellen verlief die Restitution ohne Serumzusatz sehr langsam. Auch hier wurde für die Migration 2% FCS zugegeben. Für die A549-Zellen konnte ebenfalls keine motogene Wirkung von TFF3-Dimer oder Monomer beobachtet werden, EGF-Behandlung rief dagegen auch hier deutliche motogene Effekte hervor (Abb. 25, Abb. A4, siehe Anhang).

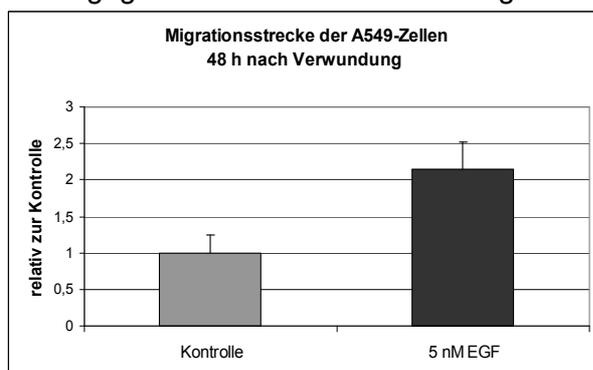


Abb. 25: Migration von A549 Zellen. Migrationstrecke der Pionierzellen nach Verwundung und 48-stündiger Inkubation mit 5 nM EGF im Vergleich zur unbehandelten Kontrollzellen. Diagramm eines repräsentativen 3-fach-Experimentes: dabei wurde die Migrationsstrecke von 15 Pionierzellen pro Bild in regelmäßigen Abständen vermessen.

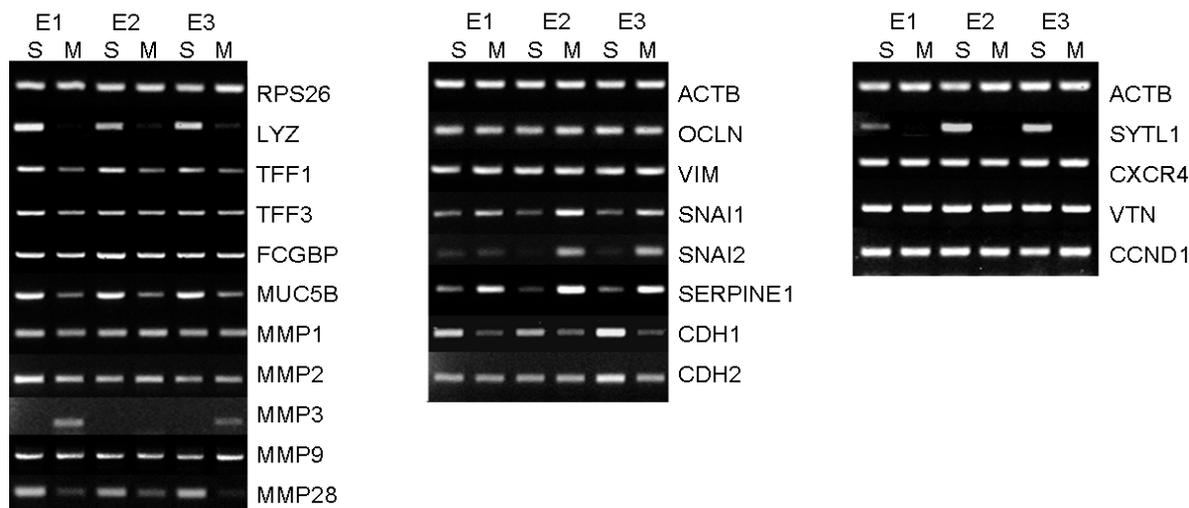


Abb. 26: RT-PCR-Analyse von A549-Zellen. Expression von Differenzierungsmarkern (LYZ, TFF1, TFF3, FCGBP [*lgG Fc binding protein*], MUC5B), Matrixmetalloproteasen (MMPs), EMT-relevanten Genen (OCLN, VIM, SNAI1, SNAI2, CDH1, CDH2 und SERPINE1 (PAI1) sowie SYTL1, CXCR4, Vitronectin (VTN) und CCND1 in stationären (S) und in migrierenden (M) A549-Zellen 72 h nach Verwundung (mit Mediumwechsel nach 48 h; E1, E2, E3: drei unabhängige Experimente). Transkripte von β -Actin (ACTB) und Ribosomalen Protein 26S (RPS26) dienen als Kontrolle der Integrität der cDNA (Zykluszahlen: ACTB, 30x; RPS26, 30x; LYZ, 35x; TFF1, 35x; TFF3, 35x; FCGBP, 35x; MUC5B, 35x; MMP1[MB334/MB335], 33x; MMP2, 35x; MMP3[MB1918/MB1919], 35x; MMP9, 35x; MMP28, 33x; OCLN, 31x; VIM, 30x; SNAI1, 31x; SNAI2, 31x; SERPINE1 (PAI1), 30x; CDH1, 35x; CDH2, 30x; SYTL1, 35x; CXCR4, 35x; VTN, 33x; CCND1, 30x).

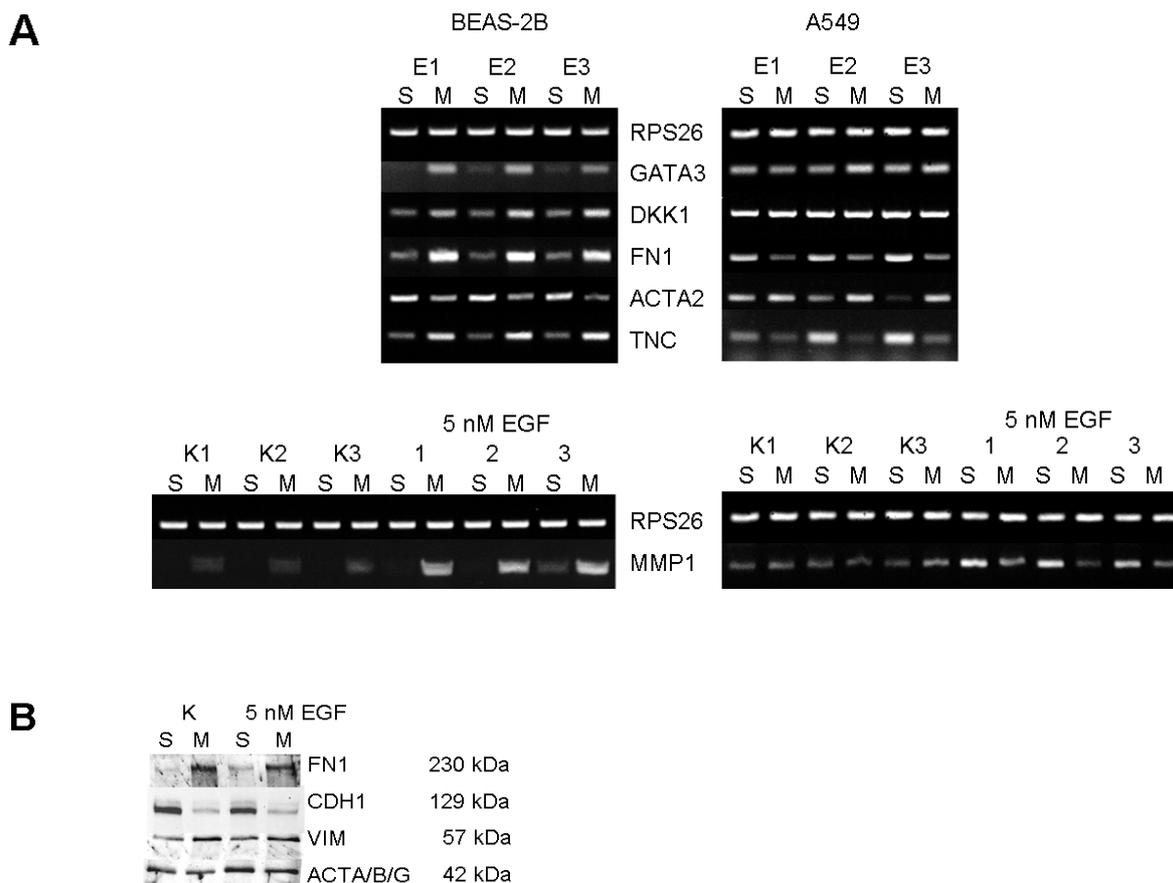


Abb. 27 A: RT-PCR-Analyse von BEAS-2B- (Spalte links) und A549-Zellen (Spalte rechts). Expression von GATA3, DKK1, FN1, ACTA2 und Tenascin C (TNC) in stationären (S) und in migrierenden (M) BEAS-2B- bzw. A549-Zellen 72 h nach Verwundung und von MMP1-Transkription nach Behandlung mit 5 nM EGF (Mediumwechsel nach 48 h; E1, E2, E3, drei unabhängige Experimente bzw. Kontrollen [K] und 3 Experimente unter EGF-Behandlung). Die Expression von Ribosomalem Protein S26 (RPS26) diente als Kontrolle für die Integrität der cDNA (Zykluszahlen: GATA3: 33x; DKK1[1642/MB1643], 33x; FN1, 28x; ACTA2, 30x; TNC[MB1652/MB1653], 33x; MMP1[MB334/MB335], 33x).

B: Western Blot unter reduzierenden Bedingungen für FN1, CDH1, VIM und ACTIN in unbehandelten (Kontrollzellen) und mit 5 nM EGF behandelten BEAS-2B-Zellen.

Auch in dieser Zelllinie zeigte sich die Dedifferenzierung während der Migration (Herunterregulation der Expression von LYZ, TFF1, TFF3, MUC5B und SYTL1, Abb. 26). Die EMT-Marker wie SNAI1 und SNAI2 wurden in den migrierenden Zellen hochreguliert; andere Marker (VIM und N-Cadherin) zeigten hingegen keine für EMT typische Hochregulation bzw. keine Abnahme (OCLN). Die Expression von E-Cadherin nahm hingegen während der Migration ab. Die konstitutive Expression der Matrixmetalloproteasen MMP1, MMP2 und MMP9 wurde während der Migration nicht verändert. MMP28 wurde stark herunterreguliert im Gegensatz zu MMP3-Transkription, die induziert wurde. Während der Migration blieb die Transkription der Zykline (CCNA2, CCNE1, Daten nicht gezeigt), sowie die von VTN und CXCR4 unverändert. Die Transkription von SERPINE1 (PAI1) wurde auch in dieser Zelllinie erhöht (Abb. 26).

Außerdem zeigten sich Unterschiede zu BEAS-2B-Zelllinie u.a. in der Transkription von GATA3 (wurde in den migrierenden Zellen nicht stark verändert), DKK1, FN1 oder TNC (wurde während der Migration eher vermindert) oder des EMT-Markers ACTA2, der stark hochreguliert wurde im Vergleich mit den BEAS-2B-Zellen (Abb. 27A). MMP1 wurde nach EGF-Stimulation der BEAS-2B-Zellen verstärkt in den migrierenden Zellen, in der A549-Zelllinie jedoch verstärkt in den stationären Zellen transkribiert (Abb. 27A).

4.2.4 AGS-Zellen

Die aus einem Magenadenokarzinom stammenden AGS-Zellen zeigten nach der Verwundung in serumfreiem Medium fast keine bzw. nur sehr langsame Migration. Auch hier wurde deshalb 2% FSC dem Medium während der Restitution zugegeben. Bevor die AGS-Zellen die Konfluenz erreichten, lösten sich viele der überwachsenden Zellen vom Zellrasen ab. Dies erschwerte die Analyse, weil es nicht möglich war mit Sicherheit zwischen weit migrierten und bereits vorher vom Zellrasen abgelösten Zellen zu unterscheiden.

AGS-Zellen zeigten während der Migration die Merkmale der Dedifferenzierung. Dazu gehörte u.a. die Verringerung der Transkription von Pepsinogen A (PGA3 und PGA5) sowie Pepsinogen C (PGC), Lipase F (LIPF) oder TFF-Peptiden. Die EMT-Marker wie ACTA2, VIM oder OCLN sowie SERPINE1 veränderten sich in den migrierenden Zellen nicht signifikant. Die Transkription anderer, während der EMT typischerweise hochregulierten Gene, wie z.B. N-Cadherin- (CDH2), SNAI1, SNAI2, TWIST oder MMP9, war nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Die konstitutiv exprimierte MMP1 unterlag keiner Veränderung während der Migration; wohingegen MMP2 schwach induziert wurde. Ebenfalls zeigte DKK1 in migrierenden Zellen keine signifikante Veränderung (Abb. 28).

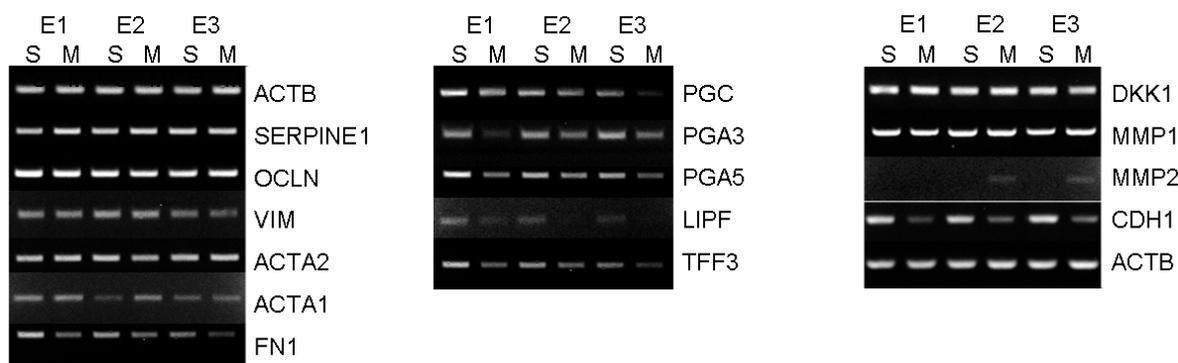


Abb. 28: RT-PCR-Analyse von AGS-Zellen. Expression von SERPINE1 (PAI1), EMT-relevanten Genen (OCLN, ACTA2, ACTA2, FN1, VIM, CDH1), Differenzierungsmarkern (Pepsinogen C [PGC], Pepsinogen A [PGA3, PGA5], Lipase F [LIPF], TFF1, TFF3), sowie DKK1 und Matrixmetalloproteinasen MMP1 und MMP2 in AGS-Zellen 48 h nach Verwundung (E1, E2, E3, drei unabhängige Experimente). Die Analyse der Expression von β -Actin (ACTB) diente als Kontrolle für die Integrität der cDNA (Zykluszahlen: ACTB, 30x; SERPINE1, 31x; OCLN, 31x; ACTA2, 31x; ACTA1, 31x; FN1, 31x; VIM, 31x; PGC[MB1795/MB1796], 35x; PGA3, 35x; PGA5, 35x; LIPF, 35x; TFF3, 35x; DKK1[MB1642/MB1643], 35x; MMP1[MB334/MB335], 35x; MMP2, 35x; CDH1, 35x).

4.2.5 Primäre Zellkulturen

Aus Biopsieproben vom Corpus und Antrum des humanen Magens (jeweils aus dem Bereich der großen und kleinen Krümmung) konnten primäre Zellkulturen angelegt werden, welche den epithelialen Phänotyp aufwiesen. Sie zeigten eine Transkription sowohl von E-Cadherin (CDH1) und TFF-Peptiden als auch von Magen-relevanten Genen wie MUC5AC, Pepsinogen oder speziell Gastrin in antralen Zellen (Abb. 29). Im Gegensatz zu den Zellen des Corpus, die nur eine sehr mäßige bis keine Proliferation zeigten, wiesen dagegen die Zellen des Antrums jeweils ein relativ kontinuierliches wenn auch langsames Wachstum auf und konnten bis zu zweimal im Laufe von vier Wochen passagiert werden. Es war jedoch nicht möglich, aus den einzelnen endoskopisch entnommenen Biopsieproben Zellen in einem für Verwundungsexperimente ausreichendem Maße zu gewinnen, da die Anfangszellmengen sehr gering waren bzw. es nur wenige nichtpathologische Proben gab.

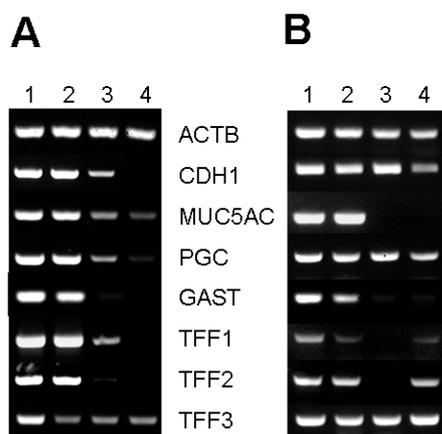


Abb. 29: RT-PCR-Analyse. Primäre Zellkulturen aus humanen Biopsieproben aus der großen Krümmung des Antrum (1) und des Copus (3), sowie aus der kleinen Krümmung des Antrums (2) und des Corpus (4) nach einer Woche Kultivierung (A, Passage 1) bzw. nach 4-Wochen (B, Passage 2): Die Expression von β -Actin (ACTB) diente als Kontrolle der Integrität der cDNA. Zyklenzahlen: ACTB, 38x; CDH1, MUC5AC, PGA, PGC[MB366/MB367], GAST, TFF1, TFF2, TFF3, 40x.

Eine ausreichende Menge lieferte dagegen die Anzucht der primären Zellkulturen aus Mägen von Mäusen. Hier wurden pro Maus jeweils Kulturen von Corpus und Antrum angelegt, wobei die Zellen des Antrums eine sehr gute Proliferation zeigten, im Gegensatz zu denen des Corpus, bei denen ein nur geringeres Wachstum stattgefunden hatte und die Proliferation nach wenigen Tagen eingestellt wurde. Diese Beobachtung deckt sich mit den humanen Corpuszellen aus den Biopsieproben. Für die Verwundungsexperimente konnten hier nur die antralen Zellen in ausreichender Menge vermehrt werden. Die Zellen zeigten auch nach mehrmonatiger Kultivierung und mehreren Passagen die Genexpression von Magenepithel-relevanten Genen.

Während der Restitution der Primärzellkulturzellen des murinen Antrums dedifferenzierten die migrierenden Zellen. Dies wurde durch eine deutliche Abnahme der Transkription von Gastrin (Gast), Tff1, Tff2, Tff3, Cathepsin E (CtsE) und von Lyz1 sichtbar. Auch Pdx1(*pancreatic and duodenal homeobox 1*) nahm stark in den migrierenden Zellen ab. Hinweise auf eine EMT lieferten die verringerte Expression von E-Cadherin (Cdh1) und Occludin (Ocln) sowie die gleichzeitige Zunahme von Acta1 und Acta2. N-Cadherin-Transkripte wie auch die von Vimentin (Vim), Tjp1(Zo-1), Snai1 und Snai2 zeigten keine deutlichen Unterschiede zwischen den stationären und migrierenden Zellen. Jam1/Jam2 wurde dagegen während der Migration stark reduziert. Die Transkripte der Zykline Ccnd1 und Ccne1 wurden in migrierenden Zellen erhöht, für Ccna2 ergaben sich keine eindeutigen Veränderungen. Die Transkription der Matrixmetalloproteinasen Mmp3 oder 13 veränderte sich in den migrierenden Zellen nicht, wohl aber die Transkription von Mmp2. Serpine1 wurde in migrierenden Zellen hochreguliert (Abb. 30).

Die Behandlung der verwundeten Zellen mit 5 nM EGF (48 h) bewirkte eine merkliche Zunahme der restituierten Fläche und hatte vor allem auf die Matrixmetalloproteinasen Mmp1a und Mmp-9 eine induzierende Wirkung, wobei in den migrierenden Zellen eine leicht erhöhte Transkription festgestellt wurde (Abb. 30).

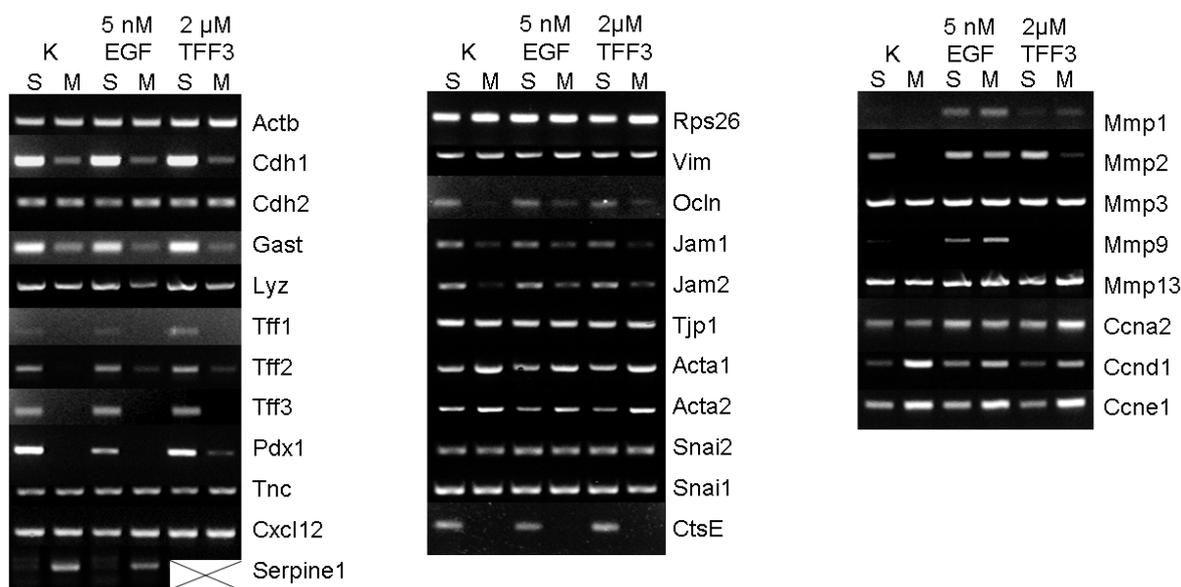


Abb. 30: RT-PCR-Analyse von Primärzellkulturen. Expression von Differenzierungsmarkern (Gast, Lyz1, Tff1, Tff2, Tff3, Pdx1), EMT-relevanten Genen (Vim, Ocln, Tjp-1, Acta2, Snai1, Snai2) sowie Jam1, Jam-2, Acta1, CtsE, Mmps und Zyklinen (Ccna2, -d1, e1) in stationären (S) und in migrierenden (M) primären Zellkulturen des murinen Antrums 48 h nach Verwundung und Behandlung mit 5 nM EGF oder 2 μM TFF3-Dimer (Mediumwechsel nach 24 h). Die Expression von β-Actin (Actb) und Ribosomalem Protein S26 (Rps26) diente als Kontrolle für die Integrität der cDNA (Zyklenzahlen: Actb, 25x; Rps26, 30x; Cdh1, 35x; Gast, 35x; Lyz, 35x; Tff1, 35x; Tff2, 35x; Tff3[MB1847/MB1848], 35x; Pdx1, 35x; Tnc, 32x; Cxcl12, 33x; Serpine1 35x; Vim, 30x; Ocln, 35x; Jam, 33x; Jam2, 33x; Tjp-1, 33x; Acta1 33x; Acta2, 33x; Snai1, 33x; Snai2, 33x; Mmp1, 35x; Mmp2, 35x; Mmp3, 33x; Mmp9, 35x; Mmp13, 33x; Ccna2, 35x; Ccnd1, 31x; Ccne1, 31x).

Die Behandlung der Zellen mit 2 μM TFF3-Dimer während der Restitution zeigte keine motogene Wirkung und die Muster der wandernden Zellen wurden im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen nicht verändert. Alle migrierenden Zellen der primären Zellkulturen zeigten eine längliche (fibroblastoide) Form (Abb. A4, siehe Anhang).

4.3 Expression der TFF-Peptide in IEC-18- bzw. BV2-Zellen nach LPS-Stimulation

Die Stimulation der Zellkulturen mit Lipopolysaccharid diente hier als *in vitro*-Modell einer bakteriellen Infektion (Cario et al., 2000; Waterhouse et al., 2001; Liu et al., 2003; Lu et al., 2003). Dabei sollte die Wirkung auf die Expression der TFF-Gene untersucht werden.

Die schwache Expression von Tff3 in den untransformierten, epithelialen IEC-18-Zellen wurde durch eine 24-stündige Inkubation mit 100-500 ng/mL LPS nicht signifikant verändert; die Expression von Tff1 und Tff2 war dagegen nicht nachweisbar. Auf Proteinebene waren die TFF-Peptide mit Hilfe von Western Blotanalysen nicht detektierbar.

Bei den über 24 h mit 100 ng/mL LPS behandelten murinen Mikrogliazellen der BV-2-Zelllinie wurde dagegen die RNA-Expression von Tff1 und Tff2 sowohl in serumhaltigem als auch in serumfreiem Medium erhöht (Abb. 31). Eine Tff3-Expression konnte jedoch nicht detektiert werden. Auf Proteinebene konnten die TFF-Peptide mit Hilfe von Western Blotanalysen nicht nachgewiesen werden.

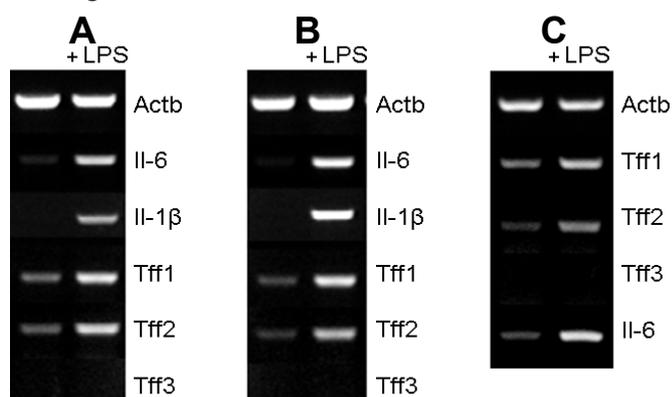


Abb. 31: RT-PCR-Analyse. Expression von Interleukin 6 (IL-6) bzw. IL-1β sowie Tff1, Tff2 und Tff3 in BV-2-Zellen nach 24-stündiger Inkubation ohne und mit 100 ng/mL LPS in 10% FCS-haltigem Medium (jeweils 3 unabhängige Experimente A-C). Die Analyse der β-Actintranskripte (Actb) diente als Kontrolle für die Integrität der cDNA. Zyklenzahlen: Actb, 30x; IL-6, 35x; IL-1β, 35x; Tff1, 35x; Tff2, 35x; Tff3[MD3/MD4], 35x.

5 Diskussion

5.1 Präparativer Scratch Assay: methodische Aspekte

Die Migration der epithelialen Zellen stellt die Hauptkomponente der mukosalen Restitution dar, die ebenfalls in der frühen Phase der mukosalen Reparatur stattfindet. Unter Umständen können die epithelialen Zellen während der Wanderung zur verwundeten Region die epithelial-mesenchymale Transition erfahren (Hay, 1995; Savanger et al., 2005; Moreno-Bueno et al., 2008). Generelle Vergleiche der Genexpression zwischen migrierenden und stationären Zellen sind zum genauen Verständnis der ablaufenden Prozesse von immenser Bedeutung. Nur sehr wenige Publikationen über systematische Untersuchungen zur Expressionsänderung einzelner Gene in migrierenden Zellen sind bisher erschienen (Gross et al., 2008; Babbín et al., 2007).

Zur Untersuchung der Wundheilung bzw. Migration *in vitro* wurden viele Methoden wie z.B. Scratch Assays etabliert. Zusätzlich kann mittels Zeitraffer-Videomikroskopie der zeitliche Verlauf unter normalen Zellkulturbedingungen dokumentiert werden. Für die Genanalysen der restituierenden/migrierenden Zellen sind diese Methoden jedoch überwiegend ungeeignet.

In dieser Arbeit wurde ein präparativer Scratch Assay angewandt. Dieser ermöglichte eine getrennte Sammlung von restituierenden/migrierenden Zellen und stationären (nicht an der artifiziellen Restitution beteiligten) Zellen. Die aus diesen Zellen extrahierte RNA erlaubte eine systematische Untersuchung der Expressionsprofile bezüglich Differenzierung, EMT und Proliferation. Die Integrität der cDNA wurde mit Hilfe der Transkripte von β -Actin, RPS26 (*ribosomal protein S26*) oder MRPS18a (*mitochondrial ribosomal protein S18A*) überprüft; die Actin-Promotor-Sequenz diente zum Nachweis genomischer DNA. Da die absoluten Mengenverhältnisse der RNA-Transkripte der migrierenden zu stationären Zellen nicht bekannt sind, lassen die auf β -Actin normierten Ergebnisse nur relative Aussagen über die Änderung der Transkriptmenge zu. Gleiches gilt für Veränderungen der Proteinverteilung. Mit Hilfe von Western Blots lassen sich im Gegensatz zu Immunfluoreszenzfärbungen auch schwächere Unterschiede in der Proteinverteilung in den stationären und migrierenden Zellen detektieren. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen kann dagegen meist nur eine starke bzw. eine *de novo* Induktion oder ein totaler Verlust der Expression sicher nachgewiesen werden. Die mit dieser Methode erhaltenen Genexpressionsmuster können somit als Grundlage für weiterführende Untersuchungen der Restitution *in vitro* dienen (z.B. unter dem Einfluss von TFF-Peptiden).

5.2 Vergleich der Genexpression von stationären und migrierenden IEC-18-Zellen

5.2.1 Differenzierungsprozesse

Eines der am besten untersuchten *in vitro* Modelle für die mukosale-intestinale Wundheilung nach Verwundung durch Deepithelialisierung (Scratch-Assay) sind migrierende IEC-6- und IEC-18-Zellen (McCormack et al., 1992). Bezeichnend für diese Systeme ist die kollektive Migrationsweise (Friedl, 2004). Dabei sind diese Zellen in unterschiedlichem Maße auf die Proteinsynthese angewiesen (McCormack et al., 1992). IEC-6- und IEC-18-Zellen repräsentieren epithelioide, nicht-transformierte Zelllinien aus den Krypten des Dünndarms von adulten bzw. neugeborenen Ratten (Quaroni et al., 1979; 1981). Sie weisen Merkmale von undifferenzierten Kryptenzellen auf und werden als Vorläuferzellen aufgefasst. Sie bewahren aber das Potential in diverse Zelllinien zu differenzieren, darunter Enterozyten, Becherzellen, endokrine und Paneth-Zellen (Soubeyran et al., 1999, Gordon et al., 2005). Bislang wurden zahlreiche Peptide auf ihre motogene Wirkung in diesen Zelllinien untersucht (Dignass and Podolsky, 1993; Dignas et al., 1994a; 1994b; 1994c). Es gibt nur wenige umfassende Berichte über die Unterschiede in der Genexpression von stationären (die weit entfernt von Läsion sind) und migrierenden (restituierenden) Zellen (Babbín et al., 2007; Gross et al., 2008). Mit Hilfe des modifizierten Scratch-Assays konnte im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten in den IEC-18-Zellen 48 h nach Verwundung eine systematische Genexpressionsanalyse der voneinander getrennten stationären und migrierten Zellen durchgeführt werden.

Es wurde berichtet, dass die an das Verwundungsgebiet grenzenden Zellen durch Dedifferenzierung und nachfolgende Migration an der Reepithelialisierung *in vivo* teilnehmen (Erjefält et al., 1995). Der Begriff Dedifferenzierung ist jedoch vage und hat eine Vielzahl alternativer Bedeutungen, die ursprünglich aus der Forschung an der Regeneration von Pflanzen und Amphibien stammen. Darunter wird z.B. der Verlust von eindeutigen Eigenschaften differenzierter Zellen, der Wiedereintritt von sich nicht mehr teilenden Zellen in den Zellzyklus und somit der Erwerb der Fähigkeit zur Proliferation oder Umkehrung zu früheren Differenzierungszuständen verstanden (Graf, 2004). Es wird diskutiert, ob die Dedifferenzierung während der Regeneration nicht besser als Transdifferenzierung, d.h. als ein Wechsel von einem differenzierten Typ zu einem anderen, zu bezeichnen wäre (Sugimoto et al., 2011). Dies geschieht durch eine Umprogrammierung mittels eines Schaltsystems aus wenigen Faktoren, z.B. infolge einer Verwundung und ohne Rückkehr zum Zustand der Vorläuferzelle (Sugimoto et al., 2011).

Der Differenzierungszustand wird ebenfalls durch das Vorhandensein oder das Fehlen von extrazellulärer Matrix beeinflusst. So zeigen Zellen auf Plastikzellkulturgefäßen oft einen weniger oder völlig undifferenzierten Zustand im Vergleich zu Zellen, die auf einer Matrixbeschichtung aufwachsen (Sanderson et al., 1996). Die unvermeidliche Teil-Abtragung der (auch von Zellen selbst sezernierten) Matrix während der Deepithelialisierung könnte ebenfalls für den Verlust der Differenzierungsmarker während der Migration von Bedeutung sein, zusätzlich zu bzw. daraus folgender EMT. Eine Abtragung der Zellschicht mit einer Rasierklinge hinterlässt auf dem Plastikuntergrund jedoch meistens eine dreidimensionale Vertiefung, die den Zellen wiederum die Anhaftung ermöglicht und für die Migrationsart von Relevanz ist (Friedl and Wolf, 2009).

Die verwundeteten IEC-18-Zellen wiesen nach einer Restitutionsphase von 40 bis 48 h (in serumreduziertem bzw. -freiem aber auch -haltigem Medium) einen Status der Trans- bzw. Dedifferenzierung auf. Vergleichbare Ergebnisse der Dedifferenzierung wurden auch erzielt, wenn die Zellen mit Mitomycin vorbehandelt wurden, um so die Zellproliferation zu hemmen (Daten nicht gezeigt). Die erneute Expression der Differenzierungsgene wurde nach langzeitkultiviertem „Wundschluss“ beobachtet und verlief ähnlich wie in Differenzierungsexperimenten.

Die Expression von Lysozym (LYZ) in stationären Zellen lieferte einen Hinweis darauf, dass die IEC-18-Zellen einige Eigenschaften von Paneth-Zellen angenommen haben und die migrierenden Zellen diese Charakteristika verlieren (Abb. 16). Andere Panethzellmarker wie DEFA (*defensin, alpha 5, Paneth cell-specific*), DEFCR4 (*defensin-related cryptdin peptide-4*) oder PLA2G2A (*phospholipase A2, group IIA*) konnten nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der für die Differenzierung zur Paneth-Zellen im Darm erforderliche Transkriptionsfaktor SOX9 (Bastide et al., 2007) konnte ebenfalls nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Darüber hinaus zeigten die IEC-18-Zellen durch die Expression von Transkripten für Aminopeptidase N auch Anzeichen für die Differenzierung zu Enterozyten. Diese war in den wandernden Zellen vermindert (Abb. 16). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für intestinale Caco-2-Zellen beschrieben, welche die Expression von Sucrase-Isomaltase (SI, als Marker für Enterozyten) in den migrierenden Zellen einstellen (Gross et al. 2008). Weitere Enterozytenmarker, wie Sucrase Isomaltase (SI), FABP (*fatty acid binding protein 2, intestinal*), Villin1 (VIL1) oder AKP3 (*alkaline phosphatase 3, intestine, not Mn requiring*) konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Hinweise auf eine weitere Differenzierungslinie in den IEC-18-Zellen lieferte die Transkription von Becherzellmarkern wie TFF3, Muzin MUC2 sowie der Transkriptionsfaktor CDX-2 (Daten nicht gezeigt), welcher die Expression von MUC2 reguliert (Yamamoto et al., 2003). Die Expression dieser Gene war allerdings nur sehr schwach ausgeprägt. Ihr unregelmäßiger Nachweis erlaubte keine Vergleiche von stationären und migrierenden Zellen bezüglich dieser Gene. Nur für die schwache Expression von TFF3 ergab sich während der Restitution eine reproduzierbare Abnahme (Abb. 16).

Schließlich transkribierten die IEC-18-Zellen auch Marker für enteroendokrine Zellen. Dazu zählen Chromogranin A (CHGA, nur schwache Transkription, Daten nicht gezeigt) und B (CHGB), die außer in neuroendokrinen Zellen auch in neuronalen Zellen vorkommen. Ferner konnte auch eine schwache Transkription von Neuropeptid Y (NPY) nachgewiesen werden. Für CHGB und NPY konnte zumeist eine Hochregulation während der Migration/Restitution festgestellt werden (Abb. 16). Die Synthese der Neuropeptide und Chromogranine wurde außer in den enteroendokrinen auch in einigen anderen Zelltypen gefunden, einschließlich Immunzellen (Day and Salzet, 2002). Dieses Phänomen ist ein Beispiel für eine Überkreuzung der phänotypischen Differenzierungen (durch Aktivierung gleicher nukleärer Faktoren), die in spezielle Funktionen, z.B. die Kommunikation zwischen neuroendokrinen Zellen und Immunzellen mittels gemeinsamer Signalmoleküle involviert ist (Day and Salzet, 2002).

Die RNA-Expression der neuronspezifischen Enolase (ENO2, *gamma, neural*), die primär in Neuronen und neuroendokrinen Zellen vorkommt und als Marker für intrinsische intestinale Innervierung fungiert, zeigte beinahe keine Veränderung in migrierenden Zellen. Dagegen wurden sowohl der Noradrenalin- (SLC6A2) als auch Serotonintransporter (SLC6A4) herunterreguliert (Abb. 17). SLC6A4 wird sowohl von Enterozyten als auch von serotonergen Neuronen im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert. Er dient der Serotoninaufnahme bzw. -wiederaufnahme, die eine entscheidende Rolle für die Modulation der Darmmotilität und den Transport von Flüssigkeiten und Elektrolyten spielt. In der Ratte wurde die höchste Immunoreaktivität von SLC6A4 im Epithelium der basolateralen Region der Krypte beobachtet (Gill et al., 2007).

Nestin (NEST), das während der embryonalen Entwicklung in migrierenden und proliferierenden Zellen exprimiert wird, findet sich im adulten Gewebe hauptsächlich in auf Regeneration spezialisierten Bereichen. In Vorläuferzellen, die das Potenzial entwickeln, in neuroektodermale, entodermale und mesodermale Linien zu differenzieren, wird es verstärkt exprimiert (Wiese et al., 2004). In IEC-18-Zellen wurde die Nestin-Transkription während der Migration/Restitution erhöht und bestätigt (als ein charakteristischer Marker für *multi-lineage* Vorläuferzellen) das starke, regenerative Potential der IEC-18-Zellen (Abb. 17).

Das wachstumsfaktorähnliche *glukagon like peptide-2* (GLP-2) wird von intestinalen endokrinen Zellen (und Neuronen im Zentralnervensystem) in Reaktion auf die luminaire Freisetzung von Fett und Kohlenhydraten sezerniert. Bjerkes and Cheng identifizierten 2001 die enterischen Neurone als Zellen, die den GLP-2 Rezeptor (GLP2R) exprimieren. Zusätzlich konnten Drozdowki and Thompson (2009) und Guan et al. (2006) im Jejunum (Ursprung der IEC-6-Zelllinie) eine hohe Expression von GLP2R auch auf enteroendokrinen Zellen nachweisen. Die Aktivierung des GLP2R fördert indirekt das epitheliale Wachstum durch Aktivierung der Proliferation und anti-apoptotischer Signalwege. Die erhöhte Expression von GLP2R in migrierenden IEC-18-Zellen (Abb. 17) könnte darauf hindeuten, dass im Unterschied zu anderen Differenzierungslinien der enteroendokrine Charakter während der Migration beibehalten wird. Über dieses Charakteristikum der IEC-18-Zelllinie wurde bereits von Gordon et al. (2005) berichtet.

Die stationären IEC-18-Zellen transkribieren sowohl BMI1 (*polycomb ring finger oncogene*), ein postulierter intestinaler Stammzellmarker (Sangiorgi et al., 2000), als auch LGR5 (*leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5*), dies jedoch nur schwach und nach Langzeitkultivierung. LGR5 wird ausschließlich von Zellen der Kryptenbasis in diversen Gewebetypen exprimiert und wurde ebenfalls als Stammzellmarker (Barker et al., 2007) identifiziert. Auffallend für LGR5 ist, dass es mit Paneth-Zellen (in Mäusen *in vitro* und *in vivo*) assoziiert ist (Sato et al., 2011).

In vivo markieren BMI1 und LGR5 zwei funktionell unterschiedliche intestinale Stammzellenpopulationen. LGR5 kennzeichnet die mitotisch aktiven Stammzellen, die eine ausgeprägte Empfindlichkeit gegenüber der kanonischen WNT-Modulation aufweisen und in hohem Maße zur stetigen homöostatischen Regeneration beitragen (Sei et al., 2011). Im Gegensatz dazu markiert BMI1 die ruhenden intestinalen Stammzellen (oberhalb der LGR5+-Zellpopulation, Potten et al., 1997), die unempfindlicher gegen Störungen des WNT-

Weges sind, allerdings einen schwächeren Beitrag zur homöostatischen Regeneration leisten. Im Gegensatz zu den LGR5+-Zellen zeichnen sich die BMI1-exprimierenden Zellen durch eine höhere Resistenz gegenüber radioaktiver Bestrahlung aus. Diese Zellen sind es, die danach die Regeneration massiv vorantreiben, einschließlich der Erneuerung der LGR5+-Population (Yan et al., 2012).

Interessanterweise blieb in den IEC-18-Zellen während der Migration die Transkription von BMI1 auf annähernd gleichem Niveau im Vergleich zu stationären Zellen. Hingegen erfuhr LGR5 meistens eine Herabregulation in migrierenden Zellen (Abb. 18). Dies könnte darauf hindeuten, dass auch hier die zwei Stammzellpopulationen unterschiedliche Funktionen ausüben, wobei LGR5-positive Zellen in der Restitution/Migration eventuell eine untergeordnete Rolle spielen. Für BMI1 wurde zusätzlich eine fördernde Rolle für die epithelial-mesenchymalen Transition gezeigt (Song et al., 2009; Yu et al. 2011).

Ähnlich wie IEC-6-Zellen transkribieren die stationären IEC-18-Zellen auch die Stammzellenmarker Musashi-1 (MSI1) und HES1 (*hairy enhancer of split*) (Kayahara, 2003). Musashi-1 ist u.a. in Darmkrypten als positiver Regulator des NOTCH-Signalweges (Scoville et al., 2008, Brabletz et al., 2009) an der Regulation der asymmetrischen Zellteilung beteiligt (Nishimura et al., 2003). Zu den Aufgaben von MSI1 zählt die Expansion der frühen multipotenten Vorläuferzellpopulation (Glazer et al., 2008). HES1 reguliert die Gewebemorphogenese durch Aufrechterhaltung von undifferenzierten Zellen und wird ebenfalls von den Vorläufern vieler Zelltypen exprimiert und somit als negativer Regulator der Differenzierung angesehen (Kageyama et al., 2000). Es spielt eine Rolle in der Spezifizierung der Vorläuferzellen zu Enterozyten (van der Flier and Clevers, 2007). In den IEC-18-Zellen konnte nach Verwundung meistens eine gleichbleibende (bzw. leicht erhöhte) Transkription von HES1 beobachtet werden, was den de- bzw. undifferenzierten Zustand während der Migration widerspiegelt. Allerdings deutet die Herabregulation von MSI1 darauf hin, dass während der Restitution/Migration HES1 die bedeutendere Rolle gegenüber MSI1 zur Beibehaltung des dedifferenzierten Zustandes spielt (Abb. 18).

Im Darm wird der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor KLF4 überwiegend in den differenzierten Epithelzellen exprimiert, wo er besonders bei der Differenzierung der Becherzellen eine wichtige Rolle spielt (Katz et al., 2002). Dies stimmt mit der spontanen Differenzierung der IEC-18-Zellen nach Langzeitkultivierung überein (Abb. 23A; ähnliche Ergebnisse in Caco-2 und HT29 Cl16E; Flandez et al., 2008). Es gibt Hinweise, dass dieser Faktor, abhängig von Gewebe, Zelltyp und der Expression von p21 und p53, sowohl in einer tumorsuppressiven als auch in einer onkogenen Weise wirkt (Rowland et al., 2006); zu seinen Zielgenen gehören einige EMT-betreffende Gene. So kann er zur Inhibierung der EMT durch Regulation des E-Cadherins beitragen (Yori et al., 2010). Ebenfalls verhindert er übermäßige Proliferation in der intestinalen Homöostase und reguliert die apikal-basale Polarität der epithelialen Zellen (Yu et al., 2012). Beachtenswerterweise wurde KLF4 in den migrierenden IEC-18-Zellen heraufreguliert (Abb. 18), was auf seine migrationsfördernde Wirkung hindeuten könnte. KLF4 kommt im gesunden Ileum hauptsächlich in der Villusregion vor (Flandez et al., 2008).

Die hohe Expression des GATA5-Transkriptionsfaktors in den IEC-18-Zellen deutet auf eine terminale Differenzierung zu Paneth-Zellen hin, was durch Differenzierungsexperimente in HAT-29-Zellen unterstützt wird (Gao et al., 1998). Eine mäßige Expression findet sich in Becher- und enteroendokrinen Zellen, in Enterozyten konnte GATA5 bisher nicht nachgewiesen werden. Die GATA6-Transkription dagegen ist im Duodenum und proximalen Jejunum auf enteroendokrine Zellen beschränkt (Dusing et al., 2003). GATA4 wird verhältnismäßig stark im proximalen Ileum und gleichartig sowohl in Kryptenzellen als auch in der Villusregion exprimiert (Bosse et al., 2006). Neben CDX2 und HNF-1 spielt GATA4 eine Schlüsselrolle in der Induktion der Differenzierung in den Vorläuferzellen (Benoit et al., 2010). In wandernden IEC-18-Zellen wurde ein Rückgang des GATA5-Transkriptes festgestellt (Abb. 18), was als weiteres Indiz dafür betrachtet werden kann, dass zumindest ein Teil des terminalen Differenzierungsprogrammes nicht mehr aktiv ist. Die unveränderte Expression von GATA4 und -6 (Abb. 18) deutet darauf hin, dass sich unter den migrierenden

Zellen Vorläuferzellen als auch solche mit enteroendokrinem Charakter befinden.

Ephrin-Rezeptoren (als größte Familie der Tyrosinkinase) und Ephrin-Liganden dienen als Leitsystem zur Positionierung der Zellen während des Differenzierungsprozesses entlang der Krypt-Villus-Achse. Ihre Aktivierung kann bidirektional (interzellulär) eine breite Palette zellulärer Reaktionen hervorrufen, darunter Beeinflussung der Zelladhäsion, Motilität und Austritt aus dem Zellverband. Diese Interaktionen können sowohl abstoßende als auch anziehende Zell-Zell-Interaktionen, abhängig von der Zellpopulation, auslösen (Lee and Daar, 2009). Die Segregation dieser Zellen erfolgt via den WNT-Signalweg durch die Expression von Ephrin und ihrer Rezeptoren EPHB2 und EPHB3 (Sei et al., 2011).

Der Ephrin-Rezeptor-B3 (EPHB3) wird in Paneth- und Vorläuferzellen am Boden der Krypte exprimiert, Ephrin-Rezeptor-B2 (EPHB2) hingegen in allen proliferierenden Kryptenzellen in einem abnehmenden Gradienten entlang der Krypt-Villus-Achse. Ihre Liganden EphrinB1 und EphrinB2 werden im Kontrast dazu stark durch die differenzierten Villusepithelzellen in einem entgegengesetzten Gradienten exprimiert (Clevers and Battle, 2006).

EphrinB1 reguliert mittels reverser Signaltransduktion (Murai and Pasquale, 2003; Lee and Daar, 2009) die tight junctions durch die Interaktion mit dem Polaritätsprotein PAR-6. Eine Herunterregulierung der Expression stört die Lokalisation der tight junction-assoziierten Proteine wie TJP1 und Cingulin und resultiert in der Lösung der Zell-Zell-Kontakte. Eine Blockade der EphrinB1-Expression kann die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen fördern (Qiu et al., 2008). Für IEC-18-Zellen wurde berichtet, dass der reverse Signalweg die Expression von Genen induziert, die in der Wundheilung/Migration involviert sind (Hafner et al., 2005). Hier kann für migrierende IEC-18-Zellen ein direkter Zusammenhang zwischen der abnehmenden Expression von Ephrin1 und der Lösung bzw. Lockerung der Zell-Zell-Kontakte während Restitution und Förderung des neuroendokrinen Phänotyps vermutet werden. Die Herunterregulation von EPHB2 und EPHB3 in migrierenden Zellen korreliert wiederum mit der Dedifferenzierung (Abb. 19). Die Ephrin-Rezeptor/Ephrin-Wechselwirkungen definieren zwar nicht die Entstehungsmuster der Zellverteilung in der Krypt-Villus-Achse, stabilisieren jedoch ihre Anordnung (Battle et al., 2002). Desweiteren fördert der Verlust von EPHB2-Expression das invasive Verhalten der Zellen (Holmberg et al., 2006).

Bei der Migration von intestinalen Epithelzellen (im Rahmen der Gewebshomöostase) stellt die Apoptose ein wichtiges regulatorisches Element dar, da sie zur Aufrechterhaltung einer konstanten Zellzahl essentiell ist (Grossmann et al., 2002). Während der Wundheilung spielt dieser kontrollierte Prozess eine wichtige Rolle, da er keine übermäßige Immunantwort hervorruft (Greenhalgh, 1998). Die untersuchten Apoptose-assoziierten Gene zeigten meist eine konstante Expression während der Migration (CASP3, Abb. 21). Eine weiterführende Charakterisierung der Apoptose-Gene bedarf jedoch einer weiteren Verfeinerung der Methode, um so eine mögliche Induktion von Apoptosegenen, sog. „immediately genes“, zu verhindern, die bereits durch die Manipulation bei der Zellentnahme induziert werden könnten.

Für die E3-Ubiquitin-Ligase BRCA1, ein Tumorsuppressor bekannt für seine Rolle in der Aufrechterhaltung genomischer Integrität (DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle, Apoptose) (Wu et al., 2010), berichteten Coene et al. (2011) über eine neue Funktion: in migrierenden Zellen reguliert BRCA1 an den fokalen Adhäsionen (Interaktion mit Ezrin, Radixin und Moesin) die gespreitete, abgeflachte Morphologie und beugt einer spontanen Motilität (einzelner Zellen) vor. Dies könnte zusätzlich zur Zellzykluskontrolle auch die gesteigerte Expression von BRCA1 in migrierenden IEC-18-Zellen erklären (Abb. 21).

5.2.2 EMT

Die Analyse der Expression von Genen, die für die epithelial-mesenchymale Transition relevant sind, lassen lediglich auf eine wenig ausgeprägte, partielle Typ2-EMT vermutlich der Pionierzellen während der Restitution/Migration schließen. Eine eindeutige EMT der Gesamtpopulation migrierender Zellen konnte nicht festgestellt werden. E-Cadherin (CDH1), als Bestandteil der Adhäsionsverbindungen, wurde während der Migration in unterschiedlich

starker Ausprägung herunterreguliert (Abb. 20); gelegentlich konnte jedoch fast keine Veränderung im Vergleich mit den stationären Zellen beobachtet werden. Zudem war das Transkriptlevel von E-Cadherin in den IEC-18-Zellen niedriger als beispielweise in den IEC-6-Zellen (Abb. 22B), bei denen während der Migration CDH1 ebenfalls nicht stark herunterreguliert wurde. Eine E-Cadherin-Immunfluoreszenzfärbung migrierender IEC-18-Zellen (Dürer et al., 2007) bestätigt auch, dass die Verringerung des E-Cadherin-Signals nur auf Pionierzellen bzw. einige ihnen angrenzende Zellen beschränkt ist.

Die Transkriptionsfaktoren SNAI1, SNAI2 und TWIST, welche die Verminderung von E-Cadherin vermitteln (Peinado et al., 2007), waren jedoch in migrierenden IEC18-Zellen nicht hochreguliert, sondern in migrierenden und stationären Zellen entweder auf annähernd gleichem Niveau exprimiert (SNAI2 und TWIST) (Abb. 20A) oder in migrierenden sogar vermindert (SNAI1, Daten nicht gezeigt). Diese Daten stützten jedenfalls nicht die These einer während der Migration ablaufenden EMT. Eine wesentliche Steigerung von N-Cadherin (CDH2) als Anzeichen einer EMT bzw. *de novo*-Expression konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (Abb. 20A), hingegen erfuhren MMP2 und MMP9 meistens eine leichte Induktion (Daten nicht gezeigt), wobei die IEC-18-Zellen eher eine schwache Expression von MMPs aufwiesen.

Ebenso wurde der für eine EMT charakteristische Anstieg der Genexpression von Vimentin, Fibronectin1 und Kollagen1 nicht beobachtet. Auch die für EMT typische Senkung der Expression von Occludin (OCLN) wurde nicht beobachtet (Abb. 20A). Die hier vorgestellten Ergebnisse stehen damit im Gegensatz zu einer Studie von migrierenden Caco2-Zellen, bei der die wandernden Zellen Anzeichen einer vollen EMT, d.h. Herunterregulation von E-Cadherin und gleichzeitige Hochregulation von N-Cadherin, SNAI1 und SNAI2, zeigten (Gross et al., 2008). Ein Grund für diese Diskrepanz könnte der Charakter der IEC-18-Zellen sein, die im Gegensatz zu den aus einem Kolonkarzinom abgeleiteten Caco2-Zellen nicht transformiert sind. Eine fibroblastoide Morphologie der IEC-18-Zellen während der überwiegend kollektiven Wanderung konnte meistens nur an der Migrationsfront, vorrangig bei den Pionierzellen, beobachtet werden; die anderen Zellen zeigten dagegen eine eher amöboide Erscheinung mit einem breiten Frontbereich. In den nachfolgenden Migrationsreihen blieben die Zell-Zell-Kontakte meistens erhalten, jedoch gelockert. Entsprechend kann eine weitergehende EMT der Pionierzellen an der Migrationsfront nicht vollständig ausgeschlossen werden.

In den migrierenden IEC-18-Zellen wurde ein deutlicher Abfall der Transkription von Keratin-19 (KRT19), eines für intestinale Epithelzellen spezifischen Zytokeratins (Enterozyten, darunter M-Zellen, Kucharzik et al., 1998), festgestellt (Abb. 20A). Die Herunterregulation von KRT19 könnte hier als Dedifferenzierung der Enterozyten- und möglicherweise als EMT-Zeichen interpretiert werden.

Auch die erkennbare Erhöhung von S100A4 (FSP1) und vor allem der deutliche Anstieg von ACTA2 (α -SMA) wie auch von ACTA1 (Abb. 20A) deuten auf einen EMT-Prozess hin. ACTA2 gehört zu den Markern für Myofibroblasten, die aus Fibroblasten über eine mechanische Zugspannung und Aktivierung durch TGF β 1 entstehen können (Tomasek et al., 2002). Dieser Prozess ist für den Umbau des Bindegewebes während der Wundheilung obligat. Darüber hinaus kann der myofibroblastenartige Phänotyp auf eine TGF β 1-ausgelöste epithelial-myofibroblastoide Transdifferenzierung zurückzuführen sein. Dies entspricht einem typischen EMT-Prozess und spielt bei pathologischen Zuständen der Organfibrose, z.B. in Lunge oder Leber, eine Rolle (Rieder et al, 2007, Willis et al., 2005). Die ACTA2-Expression ist mit der Erzeugung von erhöhten kontraktile Kräften und einer Ausbildung von Stressfasern assoziiert und wird durch TGF β 1 reguliert (Masszi et al., 2003). Die kraftinduzierte Regulation der ACTA2-Expression ist außerdem mit der Aktivierung von MAPK1 verbunden (Wang et al., 2005).

TGF β als Schlüsselmediator der Induktion von EMT reguliert die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren (u.a. SNAI1, SNAI2, TWIST), die insbesondere an der Repression von E-Cadherin beteiligt sind. Zusätzlich wurde berichtet, dass TGF β die Expression von Isoformen (alternatives Spleißen) zahlreicher Gene induziert, die für EMT eine Rolle spielen

(Horiguchi et al., 2011; Shi and Massague, 2003). Die IEC-18-Zellen exprimieren alle drei Isoformen von TGF β . Während der Migration wurde die Expression von TGF β 2 und TGF β 3 deutlich erhöht, wohingegen die Expression von TGF β 1 leicht erniedrigt wurde (Abb. 21).

Da TGF β an einer Vielzahl von biologischen Funktionen wie Wachstumskontrolle, Zelldifferenzierung, Immunreaktion und Apoptose beteiligt ist (Vignais and Fafet, 2000), kann nicht nur auf eine EMT-fördernde Wirkung geschlossen werden.

Für TGF β wurde auch eine induzierende Wirkung auf die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), ein potenter pro-angiogener und EMT-fördernder Faktor (Roskoski, 2007), gezeigt (Renner et al., 2002; Nakagawa, 2004). Ferner wurde berichtet, dass eine Stimulierung mit VEGF die Migration von IEC-18- und Caco2-Zellen, die VEGF-Rezeptoren exprimieren, erhöht. Außerdem wurde dabei die TGF β 1-Expression gesteigert und VEGF hemmte auch die Zellproliferation (Bulut et al., 2006). In Übereinstimmung mit diesen Berichten konnte auch in den migrierenden IEC-18-Zellen eine erhöhte Transkription von VEGF beobachtet werden (Abb. 21).

Zu den hochregulierten Genen in den migrierenden IEC-18-Zellen gehört auch SERPINE1 (PAI1); ähnliches wurde für migrierende Keratinozyten berichtet (Fitsialos et al., 2007; Pawar et al., 1995). Eine anhaltende SERPINE1-Expression ist für die epidermale Wundheilung von wesentlicher Bedeutung (Providence and Higgins, 2004). Sie fördert das invasive Potential der Epithelzellen durch die Beeinflussung des Matrixumbaus; zu den wichtigsten Induktoren von SERPINE1 zählen die EGFR-Liganden HBEGF und TGF α (Wilkins-Port et al., 2007), deren Transkription in den migrierten IEC-18-Zellen ebenfalls erhöht war (Abb. 21). Dies steht im Einklang mit einer Untersuchung über eine erhöhte Expression von HBEGF nach Verwundung intestinaler Epithelzellen (Ellis et al., 2006). Über HBEGF wurde berichtet, dass es fördernd auf die intestinale Restitution wirkt (El-Assal et al., 2005) und eine zytoprotektive Funktion während einer Hypoxie in IEC-18-Zellen ausübt (Pillai et al., 1998). Darüber hinaus fördert das im Darm nachgewiesene TGF α (Barnard et al., 1991) die Restitution von IEC-6-Zellen (Dignass et al., 1993) und führt in diesen Zellen zur autokrinen Stimulation der TGF α -Expression (Suemori et al., 1991).

FAT1 (Protocadherin), das im Leitsaum einer migrierenden Zelle lokalisiert ist und dort an der Polarisierung und der gerichteten Zellmigration beteiligt ist (Hou et al., 2006), zeigte in migrierenden IEC18-Zellen eine erhöhte Expression (Abb. 21). Dies steht in Übereinstimmung mit der veränderten Polarisierung/Morphologie migrierender Zellen im Vergleich zu stationären Zellen.

Die Koordination der antagonistischen Prozesse der Differenzierung und Zellproliferation ist für den Migrationsvorgang von entscheidender Bedeutung. Deshalb wird die Differenzierung durch Proliferation inhibiert und *vice versa*. Dabei spielen die Zellzyklusproteine (Zyklone), zyklinabhängige Kinasen (CDKs) und ihre Inhibitoren (CKIs) eine gewichtige Rolle. Zu den Genen, die während der Restitution in den migrierenden IEC-18-Zellen hochreguliert wurden, zählen die Zyklone A2, D1, und E1 (CCNA2, CCND1, CCNE1). In vielen Organismen wird die Progression des Zellzyklus von Phase G1 zu S durch die Aktivitäten der CDKs und ihrer Partner-Zyklone gesteuert. Die Zyklone E als die typischen Phase-G1-Zyklone sind für eine normale Zellteilung jedoch entbehrlich [z.B. zeigen CCNE1- und CCNE2-defiziente Mäuse eine normale Entwicklung (Geng et al., 2003)]. Für Zyklin E1 wurde zusätzlich eine weitere Funktion erkannt. Das Gleichgewicht zwischen Zyklin E1 und CKI determiniert drei charakteristische Zustände der Zelle: den terminal-differenzierten, den ruhenden bzw. auf eine Differenzierungslinie noch nicht festgelegten und den proliferierenden Zustand (Fujita et al., 2007). Zyklin D1 zeigt neben der Beteiligung an der Zellzyklusprogression noch eine migrationsfördernde Wirkung (inhibierende Effekte auf den RHO/ROCK-Signalweg bzw. Repression von Thrombospondin-1) und ist in invasiven Tumoren erhöht (Li et al., 2006; Fernández et al., 2011). Für Zyklin A2 wurde ebenfalls eine direkte Interaktion mit RHOA nachgewiesen. Eine Herunterregulation von CCNA2 verzögert den Eintritt in die Mitose (CCNA2-negative Zellen sind fähig zu proliferieren, akkumulieren jedoch im G2/M-Übergang) und induziert eine Veränderung der Zellmorphologie durch den direkten Einfluss auf die

RHO-GTPasen (Inhibierung von GEF oder Aktivierung von GAP). Im Gegensatz zu Zyklin D1 zeigt sich für CCNA2 eine migrationsmindernde Wirkung (auch hier findet sich eine Herunterregulation in Tumoren; Arsic et al., 2012).

Aufgrund der Kontaktinhibition der Proliferation ist eine Langzeitkultivierung von IEC-18-Zellen bei gleichbleibender Zellgröße ohne Ablösung der Zellen möglich. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Mehrheit der Zellen den Zellzyklus verlassen hat. Hinsichtlich der Steigerung der Transkription der Zykline CCNA2, CCND1 und CCNE1 in migrierenden IEC-18-Zellen (Abb. 21) kann deshalb geschlossen werden, dass die restituierenden IEC-18-Zellen wieder in den Zellzyklus finden. Aufgrund der ausgeführten zusätzlich zur Zellzykluskontrolle vorhandenen Funktionen der Zykline kann die Steigerung der Zyklinexpression Bedeutung für die direkte Regulation der Migration haben. Zellen reagieren unterschiedlich stark auf die Stimulation mit Wachstumsfaktoren, je nachdem in welcher Phase des Zellzyklus sie sich befinden (Bonneton et al., 1999). Dabei dürfte die G1-Phase die wichtigste Phase während der induzierten Migration im Zuge einer epitheloid-fibroblastoiden Transition sein.

Die Transkription von ODC (Ornithindecaboxylase), eines an der Polyamin-Biosynthese beteiligten Enzyms, wurde in den migrierenden IEC-18-Zellen ebenfalls gesteigert (Abb. 21). Dies kann sowohl die Restitution als auch die Proliferation unterstützen (Lan et al., 2005). Eine Erhöhung der ODC-Expression wurde auch in epidermalen Keratinozyten nach „*scratch wounding*“ gezeigt (Providence and Higgins, 2004). Eine Hemmung der ODC stört dagegen die Wundheilung im gastrointestinalen Trakt sowie die Migration von IEC-6-Zellen (McCormack and Johnson, 2001; Seiler and Raul, 2007; Ray et al., 2003). Die erhöhte Transkription von ODC in migrierenden Zellen könnte auch das Resultat der gestiegenen Expression von TGF α und HBEGF sein, wie dies für IEC-6-Zellen berichtet wurde (Wang et al., 1998).

GAPDH (Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase) als Enzym der Glykolyse, das neben β -Actin oder RPS26 lange als invariante Kontrolle in Genexpressionsstudien verwendet wurde, stellt sich hier als sehr variabler Faktor dar, dessen Gen-Expression während der Zellmigration zunimmt (Abb. 21). Dies wurde schon in mehreren Arbeiten beschrieben, wonach die GAPDH-Transkription in Abhängigkeit von der Zellproliferation, Differenzierung (Gong et al., 1996; Sirover, 1999), sowie der Zellmobilität variiert (Epner et al., 1993). Deshalb hat sich GAPDH als interner Standard für Genexpressionsanalysen als ungeeignet erwiesen.

5.2.3 Zell-Zell-Kontakte

Generell wurde die Transkription vieler Gene, die an der Zell-Zell-Kontaktbildung beteiligt sind, in migrierenden IEC-18-Zellen erniedrigt. Während der Restitution wurden die Transkripte zahlreicher Gene für *tight junction*-Verbindungen meist vermindert. Dies ist insbesondere für Claudine, den wichtigsten Determinanten der Barrierfunktion (Smith et al., 2005), sichtbar (Abb. 22A). Zu den sehr stark herunterregulierten Claudinen gehören CLDN2 (erniedrigt den transepithelialen Widerstand) und CLDN6, dessen Überexpression eine Barrierestörung induziert (Oliveira and Morfado-Diaz, 2007). Die Herunterregulation spezifischer Claudine während der Migration könnte auch mit der verringerten Transkription von Adaptorproteinen wie TJPs in Zusammenhang stehen (Abb. 22A). So spielt TJP1 (ZO-1) eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Polymerisierung der Claudine während der Ausbildung von *tight junctions* (Umeda et al., 2004, 2006). Eine Herunterregulation von TJP3 (ZO-3) kann, aufgrund der engen Assoziation, wiederum mit der von TJP1 verbunden sein (Umeda et al., 2006). Interessant ist die Herabsetzung der JAM2-Expression während der Migration, da es in stationären Zellen nur an der apikalen TJP1-positiven Region angereichert ist und für seine heterophile Interaktion sowohl mit JAM3 als auch mit Integrinen bekannt ist (Shin et al., 2006). Zusätzlich ist TJP1 unverzichtbar für die Rekrutierung von Cingulin (Umeda et al., 2006); deswegen kann die Erniedrigung der Cingulin-Expression direkt mit einer TJP1-Senkung verbunden sein. Von besonderer Bedeutung ist dabei, dass Cingulin eine wichtige verknüpfende Funktion zwischen *tight*

junction-Signaltransduktion und der Genexpression, besonders für Claudin-2 und TJP3, hat (Balda and Matter, 2009).

Ebenfalls wurde in migrierenden Zellen die Transkription von MYLK3 (*myosin light chain kinase 3*) deutlich herunterreguliert (Abb. 22A). Dies stimmt mit der reduzierten terminalen Differenzierung der migrierenden Zellen gut überein, wobei MYLK auf differenzierte Enterozyten beschränkt ist (Clayburgh et al., 2004). Eine Senkung der MYLK3-Expression ist außerdem deshalb bemerkenswert, da dieses Protein für seine fördernde Wirkung auf die Zellmigration bekannt ist (Klemke et al., 1997). Ferner ist MYLK für die Regulation der intestinalen *tight junctions*-Permeabilität, besonders in Enterozyten, bedeutsam (Clayburgh et al., 2004); die Senkung der Permeabilität ist für die Restitution von Bedeutung.

Während β -Catenin als Bestandteil des Cadherin-Komplexes die Zell-Zell-Adhäsion reguliert und als Signalmolekül im kanonischen WNT-Signalweg beteiligt ist, scheint α -Catenin in erster Linie als molekularer Schalter zu wirken, der die stabilen Zell-Zell-Verbindungen fördert (Drees et al. 2005). Zusätzlich zu seiner regulierenden Funktion in der Zelladhäsion (als Bestandteil sowohl von Adhäsionsverbindungen als auch von Desmosomen) hat γ -Catenin (Plakoglobin, JUP) durch seine Rolle bei der Signaltransduktion ebenfalls einen direkten Einfluss auf die Genexpression. Doch im Gegensatz zu β -Catenin, das durch Beteiligung am WNT-Signalweg onkogenes Potenzial besitzt, wirkt Plakoglobin generell als Tumor/Metastasen-Suppressor (Aktary and Pasdar, 2012). Die gleich bleibende Transkription von γ -Catenin während der Migration von IEC-18-Zellen (Abb. 22A) könnte einen hemmenden Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit und somit auf die EMT ausüben (Todorović et al., 2010). α - (CTNNA1) und β -Catenine (CTNNB1) zeigten dagegen während der Migration entweder keine Änderung oder eine leichte Herunterregulation und gehörten zu den Genen, die wie z.B. E-Cadherin eine variable Expression erkennen ließen (Daten nicht gezeigt, β -Catenin-Immunfluoreszenzfärbung Abb. A6 siehe Anhang).

Die Verringerung der CXCR4-Transkription in migrierenden IEC-18-Zellen (Abb. 22A) geht parallel mit der seines Liganden CXCL12 (SDF-1) (Abb. 20A und 20B). Ferner ist auch die Transkription von EGF wie die seines Rezeptors in migrierenden Zellen herunterreguliert (Abb. 22A). Dies wirkt überraschend, da die anderen Liganden des EGFR wie TGF α und HBEGF hochreguliert wurden (Abb. 21). Somit scheint hier EGF in seiner Funktion eher einen Beitrag zur Förderung der Proliferation der IEC-18 zu leisten, während TGF α und HBEGF zur verbesserten Restitution beitragen.

5.2.4 EGF-induzierte Änderungen in der Genexpression der IEC-18-Zellen

Nach den Zeitrasterstudien von migrierenden/restituierenden IEC-18-Zellen (Dürer et al., 2007), stellte sich die Frage, ob die typischen moto- und morphogenen Auswirkungen von EGF von spezifischen Veränderungen der Genexpression, besonders in wandernden Zellen, begleitet werden. Die Analyse der Transkripte von einigen ausgewählten Zell-Zell-Kontaktprotein-kodierenden Genen offenbarte, dass die meisten EGF-induzierten Transkriptionsveränderungen die stationären Zellen betrafen. EGF zeigte meist keine Auswirkungen auf die Genexpression migrierender Zellen mit Ausnahme von N-Cadherin und Li-Cadherin.

Die EGF-Behandlung verursachte eine charakteristische, inverse Regulation der Claudine -1 und -2, wobei CLDN1 stark hoch- und CLDN2 stark herunterreguliert wurde (Abb. 22A). Dies ist stimmig mit der Beobachtung, dass der MAPK-Signalweg die CLDN2-Expression erniedrigt (Chiba et al., 2008). Die unterschiedliche Regulation der Claudin-Expression wurde, konform mit Ergebnissen an MDCK-Zellen (Singh et al., 2004), nicht von einer Veränderung der Expression anderer *tight-junction*-Proteine wie Occludin begleitet. Diese beobachtete inverse Veränderung der Expression dieser Claudine in IEC-18-Zellen nach EGF-Zugabe könnte zu einer synergistischen Erhöhung des transepithelialen elektrischen Widerstandes beitragen (Oliveira and Morgado, 2007; Singh et al., 2004). Eine entgegengesetzte Regulation findet sich in Patienten mit Colitis ulcerosa (Heller et al., 2005). Paradoxerweise konnte eine CLDN1-Erhöhung bei kolorektalen Tumoren beobachtet

werden. Metastasen von CLDN1-überexprimierenden Primärtumoren korrelieren mit einem fehlregulierten Aufbau der *tight junctions* (Oliveira and Morgado, 2007).

Andere *tight junction*-Gene, die durch EGF in den migrierenden IEC-18-Zellen hochreguliert wurden, sind Claudin-18, das ein typisches Claudin des Magens (Matsuda et al., 2006) darstellt, sowie Tricellulin (Abb. 22A), das als Bestandteil der epithelialen Barriere an der Bildung der bi- und trizellulären *tight junctions* beteiligt ist (Chiba et al., 2008). In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass die MYLK-Transkription nach EGF-Behandlung ebenfalls hochreguliert wurde; dieses Protein ist an der Steuerung der intestinalen Permeabilität beteiligt (Clayburgh et al., 2004).

Die Li-Cadherin-Transkription (CDH17) wurde in den IEC-18-Zellen nach EGF-Zugabe sowohl in stationären als auch migrierenden Zellen erhöht, wobei ohne EGF-Behandlung ein deutlicher Abfall in migrierenden Zellen zu beobachten war (Abb. 22A). Dieses atypische Cadherin, ausschließlich im Darm mit E-Cadherin co-exprimiert (Angres et al., 2001), wird mit Lymphknotenmetastasen des Magenkarzinoms assoziiert und seine Expression korreliert z. B. mit der Tumorinvasion und einer schlechteren Prognose (Motoshita et al., 2006). Deshalb könnte die erhöhte CDH17-Transkription die Tendenz der EGF-behandelten IEC-18-Zellen teilweise erklären, sich vom Zellverband zu lösen und mit Fibroblasten-ähnlicher Morphologie zu migrieren (Dürer et al., 2007). Induzierende Wirkung hatte EGF auch auf die Transkription von N-Cadherin, die ebenfalls in migrierenden Zellen leicht erhöht war (Abb. 22A) und als Zeichen von EMT zu bewerten ist.

Das Protein Afadin-6 stellt eine Verbindung zwischen zellmembranassoziierten Proteinen und dem Actinzytoskelett her und dient als negativer Regulator der (Rap-induzierten) Zelladhäsion (Zhang et al., 2005). Seine Reduktion beschleunigt dabei die Schließung epithelialer Wunden, indem es die E-Cadherin-abhängigen interzellulären Verbindungen beeinträchtigt (Lorger et al., 2006). Übereinstimmend geht die Migration der IEC-18-Zellen mit einer deutlichen Verringerung des Transkriptes von AF-6 einher. Eine EGF-Behandlung bewirkte eine deutliche Erhöhung der Expression von Afadin-6 ausschließlich in stationären Zellen (Abb. 22A).

Während der Migration ist die Endozytose ein wichtiger Schritt, um die Adhäsionsproteine (Integrine und Cadherine) oder Signalmoleküle (Chemokine) zu recyceln. Bei diesen Prozessen spielt Myosin-6 eine maßgebliche Rolle (Frank et al., 2004). Dieses besondere Motorprotein, das sich im Gegensatz zu anderen Myosinen zum Minus-Ende von Actinfilamenten bewegt, trägt durch seine biophysikalischen Eigenschaften zur Vernetzung, Stabilisierung und Organisation des Actinnetzwerkes bei. Es ist an der starken Haftung der E-Cadherine während der Ausbildung der kohäsiven Zell-Zell-Kontakte und Aufrechterhaltung der apikalen Adhärensverbindungen beteiligt (Maddugoda et al., 2007) und wird während der Migration benötigt (Geisbrecht and Montell, 2002). In den migrierenden IEC-18-Zellen wurde die Transkription von Myosin-6 verringert. Analog zu Afadin-6 hatte EGF in stationären Zellen hingegen eine induzierende Wirkung (Abb. 22A).

Tenascin C als Komponente der extrazellulären Matrix fördert die Expression von MSI1 und LGR5 (Oskarsson et al., 2011). Der beobachtete Rückgang der Tenascin C-Transkription geschah parallel zu einer Herunterregulation dieser Gene. (Abb. 22A, Abb. 18). In den EGF-behandelten Zellen wurde die TNC-Transkription verstärkt. Als typisches mesenchymales, durch EMT induzierbares Protein, das eine bedeutsame Rolle während der Wundheilung und Metastasierung spielt (Jechlinger et al., 2003, Hsia and Schwarzbauer, 2005) und über den ERK/MAPK-Signalweg reguliert wird (Maschler et al., 2004), könnte es zu den Genen gehören, die den morphogenen Effekt von EGF auf wandernde IEC-18-Zellen auslösen (Dürer et al., 2007).

Ein weiteres Gen, das in IEC-18-Zellen durch EGF-Zugabe hochreguliert wurde, ist CXCR4. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen an Fibrozyten (Mehrad et al., 2009). Erhöhte CXCR4-Expression wurde in malignen Tumoren beobachtet und leistet dort einen Beitrag zur metastatischen Tumorkapazität (Fulton, 2009). Eine Verringerung der CXCR4-Expression

in MDA-MB231 (humane Brustkrebszellen) resultierte in reduzierter Migration und Invasion *in vitro* und die Zellen bildeten weniger Metastasen *in vivo* (Liang et al., 2007).

Ferner wurde auch die Transkription von EGFR und seines Liganden EGF erhöht (Abb. 22A). Diese autokrine Stimulation steht im Einklang mit den Beobachtungen an IEC-6-Zellen (Suemori et al., 1991).

Die EGF-Behandlung hatte auch einen dämpfenden Effekt auf die TFF3-Transkription, sowohl in IEC-18- als auch in IEC-6-Zellen. Ob dieser Effekt von physiologischer oder pathologischer Bedeutung sein könnte, ist noch nicht geklärt. Allerdings könnte es die reduzierte TFF3-Konzentration bei Colitis ulcerosa erklären (Longman et al., 2006). Im Gegensatz dazu wurde die TFF2-Transkription durch EGF in den IEC-6-Zellen erhöht, nicht jedoch in IEC-18 (Abb. 22A und 22B). Eine ähnliche Steigerung der TFF2-Transkription nach EGF-Behandlung wurde für AGS-Zellen beschrieben (Tu et al., 2007).

Zusammenfassend konnte in IEC-18-Zellen nach Langzeitkultivierung und Verwundung eine Dedifferenzierung während der 40 bis 48 h dauernden Restitution/Wundheilung festgestellt werden. Dabei verloren die Zellen allmählich besonders die Merkmale von Paneth-, und Becherzellen sowie von Enterozyten. Dagegen zeigte sich, dass die Zellen während der Restitution den (neuro)endokrin-ähnlichen Differenzierungszustand beibehalten bzw. zu Krypten-Vorläuferzellen zurückdifferenzieren. Ferner konnten charakteristische Veränderungen in der Genexpression der Zell-Zell-Kontakte und der epithelialen Barriere festgestellt werden. Hier wurden die entsprechenden Gene in migrierenden Zellen meistens herunterreguliert. Viele dieser Gene haben einen direkten Einfluss auf die Durchlässigkeit der *tight junctions*. Für die untersuchte Population der migrierenden IEC-18-Zellen kann lediglich auf eine wenig ausgeprägte/partielle Typ2-EMT geschlossen werden, die sich in der Nähe der Migrationsfront vollzieht (möglicherweise auf Pionierzellen beschränkt) und nach Reepithelialisierung wieder rückgängig gemacht wird (z.B. Senkung der ACTA2-Expression nach Langzeitkultivierung der geschlossenen "Wunde"; Daten nicht gezeigt). Übereinstimmend mit der überwiegend kollektiven Migrationsweise konnten keine eindeutigen Anzeichen einer (vollen) EMT beobachtet werden. Die Isolierung von Zellen innerhalb der Verwundungszone lieferte für die meisten untersuchten Gene ähnliche Ergebnisse wie für Zellen der Migrationsfront, mit dem Unterschied, dass die Differenzen zwischen den stationären und Zellen dieser Zone nicht so stark ausgeprägt waren (Daten nicht gezeigt).

Die Behandlung der Zellen mit EGF resultierte in der Induktion von Genen, die wichtig für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten sind. Diese spielen eine bedeutende Rolle für die zelluläre Kommunikation, die Aufrechterhaltung der *tight junction*-Permeabilität, den transepithelialen Widerstand, die EMT sowie für die Metastasierung. Dies ist übereinstimmend mit der lockeren Migrationsweise und fibroblastenartigen Morphologie besonders der Pionierzellen (Dürer et al., 2007; Tézreault et al., 2005). Die relativ geringe Responsivität von migrierenden Zellen auf EGF lässt sich mit einer Herabregulation des EGFR in diesen Zellen erklären.

5.3 Andere Zelllinien im Vergleich

Bei nicht geschlossen kollektiv wandernden Zellen zeigte sich oft ein nicht konstantes Genexpressionsprofil innerhalb der Parallelexperimente oder zwischen Experimenten mit verschiedenen Zell-Passagen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nur Gene mit einem reproduzierbaren Expressionsprofil berücksichtigt. So konnten charakteristische Gemeinsamkeiten wie auch Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien beobachtet werden. Für vergleichende Analysen von getrennten stationären und migrierenden Zellen wurden die humanen bronchialen- bzw. alveolären epithelialen Zelllinien BEAS-2B und A549 verwendet. Außerdem wurden Migrationsexperimente mit AGS-Zellen (Magenadenokarzinom) und primären Zellkulturen des murinen Magens durchgeführt.

5.3.1 BEAS-2B und A549

Die immortalisierte normale BEAS-2B-Zelllinie (Reddel et al., 1988) als Modell für die Restitution des Lungenepithels (Oertel et al., 2001; Spurzem et al., 2002; Slager et al., 2007) unterschied sich im Migrationsverhalten erheblich von IEC-18-Zellen. Während die IEC-18-Zelllinie überwiegend kollektiv, als großer Zellrasen, die artifizielle Wunde schloss, zeigten die BEAS-2B-Zellen während der Restitution eine ausgeprägte längliche Morphologie sowie eine Migration in einem lockeren Verband an der Migrationsfront mit vielen einzelnen Pionierzellen, die sich oft vom Zellverband deutlich lösten (Abb. A4, siehe Anhang). Dabei zeigte sich, dass diese Zelllinie in stark serumreduziertem Medium (bzw. mit stark reduziertem Serumersatz) und ohne Matrixbeschichtung nur eine sehr schwache Migration aufweist. Deshalb waren viel höhere Mengen an Serumzusatz nötig, um die Reepithelialisierung der Zellen zu ermöglichen.

Eine ähnliche Situation wurde bei der Krebszelllinie A549 beobachtet. Diese Zellen weisen morphologische sowie funktionelle Charakteristika von Typ II-Pneumozyten auf (Giard et al., 1973; Lieber et al., 1976). Auch diese Zellen wanderten in einem lockeren Zellverband und mit einer deutlich fibroblastoiden Morphologie sowie mit individuellen Pionierzellen (Abb. A4, siehe Anhang).

Differenzierung und klassische EMT-Marker

Bei der Langzeitkultivierung stationärer Zellen zeigten die BEAS-2B- wie auch A549-Zellen eine spontane Differenzierung; die entsprechenden Marker in BEAS-2B-Zellen wurden im Vergleich mit A549-Zellen aber eher schwach exprimiert. Migrierende Zellen zeigten dagegen Zeichen von Dedifferenzierung. Dabei wurden in BEAS-2B-Zellen beispielweise die Transkripte von TFF1, SFTPC (*pulmonary surfactant protein C*) oder SYTL1 (*synaptotagmin-like 1*) sowie in A549-Zellen Lysozym (LYZ), MUC5B, TFF3 und SYTL1 herunterreguliert (Abb. 24).

Einerseits zeigten BEAS-2B-Zellen stärkere Anzeichen für eine EMT (Herunterregulation von E-Cadherin und Anstieg des N-Cadherins und SNAI1) als IEC-18-Zellen; andererseits fehlte die typische Erhöhung der Transkription von ACTA2, ACTA1, SNAI2, TWIST, Vimentin und Occludin (Abb. 24). Dieses Ergebnis ist für Occludin, Vimentin und TWIST zu den Ergebnissen der IEC18-Zelllinie konsistent.

Für eine EMT in A549-Zellen ließen sich auf der Ebene der Genexpression deutlichere Hinweise finden. So wurde E-Cadherin in migrierenden Zellen stark herunterreguliert; SNAI1, SNAI2 und ACTA2 wurden dagegen erhöht. Während der Restitution wurde N-Cadherin meistens nicht stark verändert auch hier blieb die Expression von Occludin und Vimentin unverändert (Abb. 26).

Occludin als typisches *tight junction*-Protein rekrutiert am Leitsaum der migrierenden Zellen den Polaritätsprotein-Komplex aPKC-Par3/PATJ zur Membran. Zusätzlich regelt es die Aktivierung von PI3K und fördert somit die Protrusion (Du et al., 2010). Eine sich nur gering ändernde Expression von Occludin in migrierenden Zellen könnte deshalb auf eine Beteiligung an gerichteter (durch Chemotaxis bedingte) und überwiegend kollektiver Migration hinweisen. Dies würde eine Typ2-EMT implizieren.

Durch eine direkte Bindung an das Polaritätsprotein Scribble und dessen Stabilisierung regelt auch Vimentin die anterior-posteriore Zellpolarität sowie die gerichtete Motilität. Durch seine Interaktion mit Integrinen (via Plectiniform) hat es einen indirekten Einfluss auf die Genexpression von EMT-ausführenden Proteinen. Eine Phosphorylierung von Vimentin durch Akt1-Kinase (PKB) verhindert die Caspase-induzierte Proteolyse, fördert somit die Zellmigration und Metastasierung (Ivaska, 2011). Bei den hier untersuchten Zelllinien konnte keine deutliche Erhöhung des Vimentin-Transkriptes in migrierenden Zellen festgestellt werden. Auf Proteinebene dagegen wurde in BEAS-2B-Zellen ein leichter Anstieg beobachtet (Abb. 27B). Auch hier könnte deshalb auf eine partielle EMT geschlossen werden. Allerdings werden die für mesenchymale Zellen typischen Marker sehr oft von *in vitro* kultivierten epithelialen Zelllinien exprimiert. Umgekehrt weisen oft mesenchymale Zelllinien *in vitro* epitheliale Marker auf (Pieper et al., 1992; Chai et al., 2010). Diese

Tatsache demonstriert auch die Einschränkung der Übertragbarkeit von *in vitro*-Erkenntnissen auf *in vivo* ablaufende Prozesse.

Da BEAS-2B-Zellen bei Langzeitkultivierung die Proliferation nicht einstellen (im Unterschied zu IEC-18-Zellen, die eine deutliche Kontaktinhibition der Proliferation zeigen), war in migrierenden Zellen auch keine deutliche Änderung der Transkription der Zykline CCNA2 und CCNE1 erkennbar; im Gegensatz dazu stieg CCND1 an (Abb. 24). Proliferation aufgrund einer Beeinträchtigung der Kontaktinhibition konnte in den stationären A549-Zellen noch deutlicher beobachtet werden, was sich im erkennbaren Ablösen von Zellen manifestierte. Hier konnten jedoch keine signifikanten Expressionsänderungen der Zykline während der Migration festgestellt werden (Daten nicht gezeigt; für CCND1 siehe Abb. 26). Das aus dem E-Cadherin-Komplex freigesetzte β -Catenin aktiviert durch die Teilnahme am Transkriptionskomplex TCF/LEF die Transkription von CCND1, das als eines der (kanonischen) frühen (1-6 h) WNT-Zielgene identifiziert wurde (Röhrs et al., 2009). Damit könnte der Zusammenhang zwischen der verminderten Transkription von E-Cadherin und der Erhöhung des CCND1-Transkriptes in migrierenden BEAS-2B-Zellen erklärt werden.

Eine Heraufregulation des konstitutiv exprimierten N-Cadherins in migrierenden Zellen (Abb. 24) könnte jedoch einen Teil der frei werdenden β -Catenine durch neue homophile N-Cadherin-Verknüpfungen ausgleichen. Dabei zeigte sich die Transkription von β -Catenin (CTNNB1) in BEAS-2B-Zellen während der Migration meistens unverändert (Daten nicht gezeigt). Da A549-Zellen keinen deutlichen Anstieg von N-Cadherin bei einer starken Herunterregulation von E-Cadherin und unverändertem Verlauf der Expression von CCND1 vorwiesen, muss bei dieser Zelllinie ein anderer Regulationsmechanismus dieses Zyklus vorliegen (Abb. 26).

MMPs

Die vermehrte Expression einiger Matrixmetalloproteasen während der Reepitheliasierung ist ein weiteres Merkmal der BEAS-2B-Zellen. Zu den heraufregulierten MMPs in migrierenden Zellen gehören vor allem MMP1 (Kollagenase-1) und MMP3 (Stromelysin-1) sowie MMP9 (Gelatinase B) (Abb. 24). Die festgestellte inverse Korrelation zwischen der Expression dieser MMPs und E-Cadherin wurde von vielen Arbeitsgruppen bei invasiven Tumorzellen beobachtet, so z.B. für MMP1 im Nierenzellkarzinom (Morell-Quadreny et al., 2003), für MMP3 in Brustkrebszellen (Fuchs et al., 2005), für MMP9 in Brustkrebsmetastasen (Wang et al., 2002) oder im Pankreas- und Prostatakarzinom (Kuniyasu et al., 1999, 2003); dies korreliert mit schlechteren klinischen Prognosen. Auch konnten Nawrocki-Raby et al. (2003) die in bronchialen Tumorzelllinien hochexprimierten MMPs -1, -3 und -9 durch eine Transfektion mit E-Cadherin deutlich herabregulieren und dadurch den invasiven Charakter dieser Zellen mindern.

Im Gegensatz dazu wurde die Expression von MMP28 (Epilysin) in migrierenden Zellen immer herunterreguliert (Abb. 24). Im Unterschied zu den übrigen MMPs wird MMP28 in vielen Geweben konstitutiv exprimiert, was auf seine Rolle bei der Gewebshomöostase hinweist (Lohi et al., 2001; Saarialho-Kere et al., 2002; Bister et al., 2006). Eine verstärkte Expression von MMP28 wurde in basalen Keratinozyten während der Wundheilung beobachtet (Lohi et al., 2001). Die Expression von MMP28 in Tumoren ist unterschiedlich. So konnte sowohl eine Reduktion (z.B. bei Kolonkarzinomen, Bister et al., 2006) als auch eine Expressionssteigerung (Magentumor, Jian et al., 2011) festgestellt werden; letztere korreliert mit dem invasiven Verhalten. Eine Überexpression von MMP28 in A549-Zellen induziert eine EMT (Illmann et al., 2006). Außerdem dürfte MMP28 eine Rolle bei der Restrukturierung der sich neu formierenden Basalmembran während der Wundheilung spielen (Saarialho-Kere et al., 2002). Die beobachtete Herabregulation von MMP28 in migrierenden BEAS-2B-Zellen könnte aufgrund einer Verringerung der Zellhaftung einen fördernden Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit haben (verstärkte Adhäsion bei Überexpression; Rodgers et al., 2009). Andererseits könnte es einer EMT entgegenwirken. Für A549-Zellen sind ebenfalls diese beiden Möglichkeiten denkbar (Abb. 26).

MMP3 wurde meistens in migrierenden A549-Zellen (wie auch in BEAS-2B-Zellen)

heraufreguliert; es zeigte sich jedoch im Gegensatz dazu eine konstitutive Expression von MMP1 und MMP9 (Abb. 26), die bei migrierenden und stationären Zellen etwa gleich war. Dies unterstreicht den transformierten Charakter der A549-Zellen als eine Krebszelllinie im Vergleich zu BEAS-2B-Zellen.

GATA3

Die epithelialen Zellen besitzen auch die Charakteristika einfacher Immunzellen. Sie erkennen Pathogen-assoziierte Muster auf Mikroben durch Oberflächen-Rezeptoren wie CD14 und TLRs (die typisch für Zellen des angeborenen Immunsystems sind) und können somit aktiv eine Immunantwort regulieren (Diamond et al., 2000). Die bronchialen Epithelzellen (u.a. BEAS-2B-Zellen) können durch Regulation der Expression von TLR1-6 und -9 eine spezifische Antwort auf das mikrobielle Milieu schaffen und einer Überreaktion der nativen Immunzellen entgegenwirken (Mayer et al., 2007). Nach TNF α -Induktion wurde sowohl in BEAS-2B- (Boero et al., 2010) als auch in A549-Zellen eine Erhöhung der konstitutiven Sekretion von typischen Th2-Zellen-Zytokinen (u.a. IL-5) beobachtet (Salvi et al., 1999).

Zusätzlich zu hämatopoetischem Gewebe wurde der Transkriptionsfaktor GATA3 (Rolle in der Differenzierung der Th2-Zellen, Chou et al., 2010) u. a. in bronchialen Epithelzellen (Caramori et al., 2001) nachgewiesen. Sowohl BEAS-2B- als auch A549-Zellen exprimieren GATA3 und unterstützen somit diesen Befund. Die gesteigerte Expression von GATA3 in migrierenden Zellen korreliert in BEAS-2B-Zellen mit gesteigerter Transkription von CCND1 (Abb. 27A, Abb. 24), als dessen vorgeschalteter positiver Regulator es identifiziert wurde (Neuroblastome, Molenaar et al., 2010). In A549-Zellen blieb die Transkription von GATA3 in den migrierenden Zellen unverändert und verlief auch hier übereinstimmend mit der sich nicht ändernden Transkription von CCND1 (Abb. 27A, Abb. 26).

Eine Expression von GATA3 in verschiedenen Brustkrebszelllinien steht in reziproker Beziehung zur Metastasierungsfähigkeit (Kouros-Mehr et al., 2008). Auch wurde die suppressive Wirkung von GATA3 auf Lungenmetastasen beschrieben (Kouros-Mehr et al., 2008; Dydensborg et al., 2009). Die ektope Expression von GATA3 in stark invasiven MDA-MB-231-Krebszellen (normalerweise negativ für GATA3) veränderte den Phänotyp hin zu einer kuboidal-ähnlichen epithelialen Form mit reduzierter invasiver Aktivität. Außerdem zeigte sich eine Hochregulation von E-Cadherin und eine Umkehrung der EMT, d.h. einer MET (Yan et al., 2010). Somit könnte die gesteigerte Expression von GATA3 in BEAS-2B-Zellen als EMT-hemmender Faktor betrachtet werden.

DKK1 und ACTA2

BEAS-2B- und A549-Zellen unterscheiden sich nicht nur in Bezug auf die GATA3-Expression, sondern auch bezüglich DKK1 (*dickkopf 1 homolog [Xenopus laevis]*). Während sich die Transkription des negativen Regulators des WNT-Signalweges DKK1 in A549-Zellen nicht deutlich zwischen stationären und migrierenden Zellen unterschied, wurde in den migrierenden BEAS-2B-Zellen eine Hochregulation sichtbar (Abb. 27A, in IEC-18-Zellen konnte dagegen generell nur eine marginale DKK1-Transkription nachgewiesen werden; Daten nicht gezeigt).

DKK1 kodiert für ein sezerniertes Protein, das den WNT/ β -Catenin-Signalweg inhibiert (Niehrs, 2006). Die unterbrochene WNT-Signalweiterleitung resultiert dann in einem Abbau des ungebundenen β -Catenins (Mao et al., 2002). So wurden für DKK1 durch Förderung des Abbaus der E-Cadherin/ β -Catenin Komplexe migrationsfördernde Effekte beschrieben (Kuang et al. 2009). DKK1 kann überdies unabhängig von β -Catenin den WNT-Signalweg modulieren und Apoptose- sowie Proliferationsunterdrückung veranlassen (Orme et al., 2003; Lee et al., 2004). Andererseits konnte gezeigt werden, dass DKK1 von epithelialen Zellen (migrierenden IEC-6- und Caco-2-Zellen) nach Verwundung sezerniert wird, wo es die Zellwanderung durch Einflussnahme am CDC42 erschwert. Dies geht mit einer Dislokation des Polaritätsproteins Par6 vom Leitsaum einher und bringt einen Anstieg der Caspase-3-Aktivität sowie vermehrte Apoptose mit sich. (Koch et al., 2009). Es konnte auch eine

inhibierende Wirkung von DKK1 auf die Proliferation, Migration und Invasion via Hemmung der EMT (verminderte Expression der EMT-Transkriptionsfaktoren SNAI1 und TWIST sowie Vimentin, Fibronectin und CCND1) gezeigt werden (Qi et al., 2007, 2012). Diese Befunde präsentieren den Antagonisten des WNT-Signalwegs DKK1 als ein Protein mit Doppelfunktion, das im Falle von BEAS-2B-Zellen die EMT möglicherweise negativ beeinträchtigt (in dem es in migrierenden Zellen eine erhöhte Expression von TWIST und SNAI2 verhindert). In A549-Zellen, die eine deutliche Steigerung von SNAI2 und ACTA2 in migrierenden Zellen aufweisen, zeigt sich die DKK1-Transkription eher unverändert und korreliert mit stärkeren Anzeichen der EMT.

Auch der leichte Rückgang von ACTA2 in migrierenden BEAS-2B-Zellen (Abb. 27A) könnte durch eine Hemmung der EMT erklärt werden. ACTA2 gilt als Marker (zusätzlich zu Myofibroblasten) der differenzierten myoepithelialen Zellen. Während der TGF β 1-induzierten EMT wird dieses hochreguliert (Doerner and Zuraw, 2009). Das von stationären BEAS-2B-Zellen exprimierte ACTA2 könnte deshalb für eine Differenzierung zumindest eines Teiles der Zellpopulation sprechen, welcher die Charakteristika der myoepithelialen submukosalen Drüsenzellen aufweist (DiMeo et al., 2009). Eine Herunterregulation von ACTA2 in migrierenden Zellen würde dann auf die De- bzw. Transdifferenzierung hindeuten. Dies könnte in migrierenden Zellen durch die gesteigerte GATA3-Expression erklärt werden, da GATA3 beispielsweise in den ausdifferenzierten Mamma-Drüsenzellen vorgefunden wurde, nicht jedoch in den ausdifferenzierten Myoepithelzellen (Kouros-Mehr et al., 2008).

Tenascin C und Fibronectin

In BEAS-2B- und A549-Zellen werden Fibronectin (FN1) und Tenascin C (TNC) parallel exprimiert. Auffallend ist, dass in migrierenden BEAS-2B-Zellen die Transkription dieser beiden Proteine hochreguliert wird, während sie in migrierenden A549-Zellen herunterreguliert werden (Abb. 27).

Die Bindungsmöglichkeiten mit einer Vielzahl an ECM-Molekülen (z.B. Fibronectin, Perlecan und Aggrecan) sowie die Interaktion über Zelloberflächenrezeptoren (z.B. Integrine, Syndekane oder EGFR) ermöglicht es Tenascin C, die EMT-Signalwege zu regulieren (WNT-, EDNRA-, PDGFR α -, NOTCH-, TGF β - und EGFR-; Midwood and Orend, 2009). Die Effekte von Tenascin C auf die Zellmigration sind deshalb sehr zellspezifisch. Die fördernden oder hemmenden Effekte von Tenascin C sind abhängig von der Zusammensetzung der ECM, verschiedenen Spleißvarianten und Glykosylierungsformen (Trebault et al., 2007). Derzeit ist noch wenig über die Wechselwirkung (Interdependenz) von Tenascin-C und Fibronectin bekannt. So überschneidet sich ihre Expression und beide scheinen eine Schlüsselrolle in der Tumorgenese und Metastasierung zu spielen (Van Obberghen-Schilling, 2011). Tenascin C kann DKK1 reprimieren, was nachfolgend die Fibronectin-Expression via den WNT-Signalweg induziert (Ruiz et al. 2004).

In migrierenden BEAS-2B-Zellen, die sowohl Tenascin C als auch Fibronectin vermehrt aufweisen, spricht dies für eine EMT (regulierende Rolle von DKK1), wohingegen sich in den A549-Zellen keine Expressionssteigerung dieser Gene zeigt (DKK1 aber auch nicht merklich heraufreguliert wurde). Für die Migration der BEAS-2B-Zelllinie scheint daher die gleichzeitig gesteigerte Expression aller dieser Gene erforderlich zu sein.

Serpin peptidase inhibitor clade E, Vitronectin

Während der Migration zeigten sowohl BEAS-2B- als auch IEC-18-Zellen eine deutliche Hochregulation von HBEGF und SERPINE1 (PAI1), bei gleichzeitiger Erniedrigung von Vitronectin (VTN) (Abb. 24). Letzteres wird in IEC-18-Zellen nur marginal exprimiert (Daten nicht gezeigt). Auch die migrierenden A549-Zellen wiesen eine Steigerung der Expression von SERPINE1 auf, Vitronectin blieb jedoch unverändert (Abb. 26).

Die unterschiedlichen Konformationen von SERPINE1 (aktive, latente, gespaltene) interagieren mit LRP1 (*low density lipoprotein receptor-related protein 1*) und tragen zur Stimulation der Zellwanderung bei. Außerdem interagiert SERPINE1 mit Vitronectin und beeinflusst dadurch die Haftung der Zellen an die extrazelluläre Matrix (Czekay et al., 2011).

Vitronectin fördert dabei die zelluläre Fortbewegung über eine RGD-abhängige Interaktion mit den Integrinen $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$, sowie durch seine Bindung an den Plasminogen Aktivator-Rezeptor (uPAR). Eine Bindung mit SERPINE1 reguliert die Fähigkeit dieser Integrine an Vitronectin zu binden (Zhou et al., 2003; Czekay et al., 2011). An Vitronectin gebundenes SERPINE1 kann nicht mehr mit LRP1 interagieren, während das nicht gebundene SERPINE1 über den LRP1-abhängigen Signalweg (u.a. uPAR-Internalisierung) zur Zellbewegung führt. Somit könnte die deutliche Herabregulation von Vitronectin in BEAS-2B-Zellen (Abb. 24) dazu führen, dass das nun ungebundene SERPINE1 verstärkt motogen wirken kann (Smith and Marshall, 2010).

Die normalen BEAS-2B- und A549-Zellen zeigten im Vergleich zu nicht transformierten IEC-18-Zellen unter stark Serum- bzw. Serumersatz-reduzierten Bedingungen nur eine relativ geringe Migration. Während der Migration (2% FCS bzw. AC-2) wurden deutlichere Zeichen einer EMT als bei IEC-18-Zellen beobachtet. Dies wurde durch die gelockerte Migrationsweise und fibroblastoide Form der Zellen der vorderen Migrationsreihen sichtbar. Auf der Genexpressionsebene konnte zusätzlich zu der Transkripterniedrigung von typischen Differenzierungsgenen eine deutliche Induktion von klassischen EMT-fördernden Genen beobachtet werden. Auch konnte in stationären A549-Zellen die konstitutive Expression von EMT-fördernden Genen festgestellt werden, was durch den Krebszellcharakter erklärt werden könnte.

Zwischen den migrierenden Zellen beider Zelllinien konnten für eine Reihe von Genen deutliche Unterschiede in der Expression festgestellt werden, die vermutlich mit dem Migrationscharakter bzw. der Zellherkunft korrelieren (normale Zellen/Krebszellen). Die EGF-Behandlung resultierte in der Induktion von MMP1. Dabei zeigte sich, dass die migrierenden A549-Zellen weniger responsiv auf EGF waren und die MMP1-Hochregulation im Gegensatz zu BEAS-2B-Zellen hauptsächlich auf stationäre Zellen beschränkt wurde.

5.3.2 AGS-Zellen

Es wurden ebenfalls Migrationsexperimente mit gastralen AGS-Zellen durchgeführt. Auch mit Serumzusatz zeigten die AGS-Zellen nur eine relativ langsame Migration. Aufgrund der Ablösung der stationären Zellen nach Langzeitkultivierung (durch das für Krebszellen typische Fehlen der Kontaktinhibition der Proliferation) eignete sich diese Zelllinie nur bedingt für Wundheilungsexperimente. Bemerkenswerterweise unterschieden sich die migrierenden AGS-Zellen mit ihrer Kettenmigrationsweise unter überwiegender Beibehaltung der polygonalen Morphologie stark von A549-Zellen (Abb. A4, siehe Anhang).

Übereinstimmend mit allen anderen untersuchten Zelllinien wurden auch in AGS-Zellen während der Migration Anzeichen einer Dedifferenzierung gefunden [Herabregulation von Pepsinogen -C, -A3 und -A5, LIPF (*lipase, gastric*) oder TFF3; (Abb. 28)]. Trotz Dedifferenzierungszeichen lässt die relativ hohe konstitutive Expression einiger EMT-Marker und deren nicht veränderte Expression in migrierenden Zellen (ACTA2, Vimentin, Occludin) keinen Rückschluss auf eine EMT während der Migration zu. Der Rückgang von E-Cadherin und der leichte Anstieg von ACTA1 könnten dagegen auf eine EMT hinweisen; allerdings konnte die Transkription von SNAI2, TWIST, aber auch von N-Cadherin und Tenascin C in AGS-Zellen weder nachgewiesen noch induziert werden (Daten nicht gezeigt).

Ähnlich zu A549-Zellen wiesen die AGS-Zellen eine konstitutive und sich während der Migration nicht ändernde Transkription von MMP1 und DKK1 sowie eine Herabregulation von Fibronectin auf. Im Gegensatz zu allen anderen Zelllinien blieb die Expression von SERPINE1 in AGS-Zellen während der Migration auf einem annähernd konstanten Niveau.

5.3.3 Primäre gastrale Zellkulturen

Im Gegensatz zu den immortalisierten Zelllinien zeigen primäre Zellen und Zellkulturen oft eine größere Ähnlichkeit zu intaktem Organewebe. Aus diesem Grunde wurden Primärkulturen aus humanem und murinem Magen angelegt. Aufgrund eines Mangels an histologisch unauffälligen Biopsieproben sowie der geringeren Zellmenge war es nicht möglich, langlebige humane Primärkulturen gastraler nicht-neoplastischer Epithelzellen in einem für Wundheilungsexperimente ausreichendem Maße zu gewinnen. Auffallend war

jedoch, dass die Antrumproben sich wesentlich besser kultivieren ließen als Corpusbiopsien. Eine mögliche Erklärung ist der erhöhte Umsatz antraler Oberflächenepithelzellen im Vergleich zum Magencorpus. So ist auch die Zahl der proliferierenden Vorläuferzellen im Antrum wesentlich größer als im Corpus (Kouznetsova et al., 2004, 2011). Erfolgreicher verlief die Etablierung langlebiger Primärkulturen aus den Epithelzellen des murinen Antrums. Auch hier ließen sich diese ebenfalls besser als murine Corpuszellen kultivieren und nur aus dem Antrum konnte eine für Verwundungsexperimente ausreichende epitheliale Zellzahl erhalten werden. Die Verunreinigung der aus dem Magen gewonnenen Epithelzellen mit anderen, u.a. mesenchymalen Zelltypen, konnte mit der Sedimentationsmethode deutlich minimiert werden. Diese mesenchymale Komponente wirkt sich jedoch, sofern sie nicht Überhand nimmt, auf das Wachstum und Differenzierung der epithelialen Zellen fördernd aus (Kedinger et al., 1986, 1987); dies konnte durch die Differenzierungsmarker (Abb. 30) belegt werden. Die im Quantum-286-Medium auf Kollagen Typ I kultivierten Zellen wuchsen als Monolayer eng angelagerter polygonaler Zellen und zeigten eine epithelioide Zellmorphologie (Perreault and Beaulieu, 1988). Für die Wundheilungsexperimente wurden die Zellen (ohne Matrixbeschichtung) an DMEM-Medium mit 5% FCS gewöhnt um die Assays unter serumreduzierten Bedingungen durchführen zu können. Die fibroblastoide Morphologie der migrierenden Zellen lieferte einen ersten Hinweis auf eine ablaufende EMT. Die verminderte Expression der Differenzierungsmarker und die damit einhergehende Dedifferenzierung stehen damit im Einklang. Zusätzlich zum Abfall von E-Cadherin und der Heraufregulation von ACTA1 und 2 sowie SERPINE1 in migrierenden Zellen zeigte sich erstmals auch eine reduzierte Expression von Occludin; ungeachtet dessen blieb die Vimentin-, SNAI1-, SNAI2-, Tenascin- und N-Cadherin-Expression konstant (Abb. 30). Daher kann auf eine partielle Typ2-EMT geschlossen werden. Ebenso wie IEC-18-Zellen, die die Charakteristika normaler Zellen zeigen, wiesen die murinen Zelllinien eine Kontaktinhibition des Wachstums auf. Außerdem konnte wie bei den IEC-18-Zellen während der Reepithelialisierung eine deutliche Steigerung der Zykline D1 und E1 beobachtet werden. Das Potenzial, ähnlich wie IEC-18- oder IEC-6-Zellen, in serumreduziertem oder serumfreiem Medium zu wandern, macht die primären gastralen Zellkulturen zu einem geeigneten Modellsystem für die Untersuchung der Wirkung von Effektormolekülen auf die Restitution.

5.3.4 Wirkung von EGF auf BEAS-2B- und A549-Zellen sowie Primärkulturen

Obwohl nach Stimulation mit 5 nM EGF sich die Migrationsstrecke der BEAS-2B- und A549-Zellen deutlich vergrößerte und sich das Migrationsverhalten änderte, konnten für die diversen untersuchten Differenzierungsmarker, Zykline, Zell-Zell-Kontaktproteine und EMT-Marker keine reproduzierbaren Änderungen auf Genexpressionsebene festgestellt werden. Eine mögliche Ursache könnte der Einfluss des Serumzusatzes während der Migration sein, da verschiedene Serumchargen eine leicht unterschiedliche Zusammensetzung der Bestandteile aufweisen könnten. Eine Ausnahme bildete hier jedoch die Induktion von MMP1 in migrierenden BEAS-2B-Zellen (in den stationären schwächer). In A549-Zellen zeigte sich dagegen eine Induktion von MMP1 hauptsächlich in den stationären Zellen, während die migrierenden Zellen auf EGF nicht ansprachen (Abb. 27A). Bemerkenswerterweise zeigte die in BEAS-2B-Zellen durchgeführte Behandlung mit einem MMP1-Inhibitor (GM 1489, Calbiochem) keine signifikanten Anzeichen einer Verlangsamung der Migration sowie keine Effekte auf die Transkription der untersuchten Gene (Daten nicht gezeigt).

Auch primäre epitheliale Zellkulturen des murinen Antrums wiesen nach EGF-Behandlung eine Hochregulation von MMP1 auf; die migrierenden Zellen zeigten jedoch analog zu BEAS-2B-Zellen eine stärkere Induktion als die stationären Zellen. Zusätzlich wurde die Expression von MMP9 verstärkt (Abb. 30).

Im Vergleich mit IEC-18-Zellen, bei denen EGF die Zell-Zell-Kontakte und die Expression ausgewählter Gene beeinflusste, konnte eine ähnliche Wirkung in den BEAS-2B-Zellen und A549-Zellen nicht festgestellt werden. Für die motogenen Effekte von EGF auf die beiden Lungenzelllinien scheint die Genexpression deshalb nicht entscheidend zu sein.

5.4 Motogene Wirkung von rekombinatem TFF2-glyk und TFF3-Dimer

Neben ihren vielfältigen molekularen Funktionen, u.a. als Bestandteile der Mukusschicht und die Förderung mukosaler Reparatur, wurden in zahlreichen *in vivo* und *in vitro*-Studien TFF-Peptide als Faktoren beschrieben, die während der epithelialen Restitution die Zellmigration steigern und eine schnelle Wundheilung fördern (Wong et al., 1999; Göke et al., 2001; Paulsen et al., 2008; Hoffmann, 2012).

Die durchgeführten *in vitro* Wundheilungsexperimente zur Untersuchung der motogenen Wirkung von rekombinanten TFF2 und TFF3 in Anlehnung an Vorarbeiten von Oertel et al. (2001), Chwieralski et al. (2004) und Dürer et al. (2007) mit bronchialen BEAS-2B-Zellen sowie mit nicht transformierten intestinalen IEC-18-Zellen zeigten in migrierenden Zellen keine signifikanten Effekte (Abb. 8, Abb. 10). Auch waren die in dieser Dissertation beschriebenen primären Zellkulturen des murinen Magens nicht responsiv gegenüber rekombinatem TFF3.

Bislang existieren nur unzulängliche Ergebnisse bezüglich der motogenen Eigenschaften von TFF2 und TFF3. Auch wenn motogene Effekte in unterschiedlichen *in vitro* Wundheilungsmodellen gezeigt werden konnten (Dignass et al., 1994; Kato et al., 1999; Paulsen et al., 2008), sind diese Effekte mit denen anderer motogener Peptide, wie z.B. EGF (5 nM), nicht vergleichbar. Deutlich wird dies vor allem daran, dass zur Erzielung ähnlicher motogener Effekte etwa die 360-fache Menge an rekombinatem TFF2 (1,6 µM, Chwieralski et al., 2004) oder die 400-fache Menge an rekombinatem TFF3-Dimer eingesetzt werden musste (2 µM; Dürer et al., 2007). Neuerdings konnten Zhang et al. (2010) mit gereinigtem nativem TFF2 aus der Haut von *Bombina maxima* eine motogene Wirkung im Bereich von 10 nM erzielen.

Oertel et al. (2001) und Dürer et al. (2007) konnten relativ schwache motogene Effekte von TFF-Peptiden in Wundheilungsexperimenten nachweisen und Chwieralski et al. (2004) zeigten in haptotaktischen Assays eine chemotaktische Aktivität. Kollagen 1 schien hier die beste migrationsfördernde Wirkung zu haben.

Die *in vivo* hauptsächlich vorkommenden TFF2- und TFF3-Formen im Menschen unterschieden sich klar von den rekombinanten Formen. Im Magen findet sich fast kein TFF2-Monomer sondern ist assoziiert mit einem hochmolekularen Partner (Kouznestova et al., 2007). Potentielle Bindungspartner für TFF2 sind MUC6 und hochmolekulares oligomerisiertes DMBT1 (*deleted in malignant brain tumors 1*) (Thim and Mørtz, 2000; Mollenhauer et al., 2007). Lediglich in BEAS-2B-Zellen konnte eine schwache Transkription von DMBT1 nachgewiesen werden; sowohl BEAS-2B- als auch IEC18-Zellen zeigten keine Transkription von MUC6 (Daten nicht gezeigt).

Auch humanes TFF3 liegt im Darm hauptsächlich (ca. 85%) als disulfidverknüpftes hochmolekulares Heteromer mit FCGBP (*IgG Fc binding protein*) vor (Albert et al., 2010). Im Gegensatz dazu liegt rekombinantes TFF3 aus *Saccharomyces cerevisiae* vor allem als Dimer und Monomer vor (Thim et al., 1995). Außerdem ergaben sich erste Hinweise auf mögliche posttranslationale Modifikationen der niedermolekularen TFF3-Formen im humanen Kolon (Albert et al., 2010, 2012).

Das in den Wundheilungsexperimenten verwendete rekombinante humane TFF3-Dimer wies in Western Blots sowohl unter reduzierenden als auch nichtreduzierenden Bedingungen noch zusätzliche Nebenbanden über der zu erwartenden Molekülmasse M_R (ca. 7,5 kDa bzw. ca. 15 kDa) auf (Abb. A2, siehe Anhang). Ob dies von funktioneller Bedeutung ist, ist unklar.

Die Testung der motogenen Aktivität sowohl von TFF3-FCGBP-Heteromer als auch der *in vivo* vorkommenden niedermolekularen TFF3-Formen aus dem menschlichen Kolon lieferte in ersten Pilotexperimenten in mit IEC-18-Zellen durchgeführten Scratch- und Boyden-Kammer-Assays nach 12 oder 24 h jedenfalls keine signifikanten Effekte (Daten nicht gezeigt).

Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit keine signifikanten motogenen Effekte von TFF-Peptiden nachgewiesen werden; allerdings ist eine erneute Austestung mit noch weiter gereinigten TFF-Formen aus menschlichem Gewebe erstrebenswert.

5.5 Einfluss von rekombinantem TFF3 auf TNF α -induzierte Entzündungsmarker

Durch TNF α -induzierte Entzündungsprozesse wird die Expression einer Reihe von Genen gesteigert. Unter ihnen sind IL-6 und IL-8 (Allen et al., 2000; Schlaepfer et al., 2007), CXCL2 (Driscoll et al., 1995), PTGS2 (COX2; Chen et al., 2000), SERPINE1 (PAI1; Liu et al., 2005) ebenso wie die Matrixmetalloproteinasen MMP1 (Kollagenase-1), -3 (Stromelysin-1), -10 (Stromelysin-2), -9 (Gelatinase B) und -13 (Kollagenase-3) (Li et al., 2003, Scott et al., 2004). Auch für TFF3 wurde von einer genexpressionsinduzierenden Wirkung auf die Matrixmetalloproteinasen MMP1, -3, -13 (Rösler et al., 2010) und zusätzlich auf MMP9 (Schulze et al., 2010) berichtet.

Die durchgeführten totalen *in vitro*-Verwundungsexperimente, bei denen durch mehrfache Verwundung ein stark restituierendes System geschaffen wurde, zeigten, dass die Wirkung von TFF3(-Monomer) davon abhängig ist, ob sich die Zellen in einem unversehrten, verwundeten oder in einem mittels TNF α induzierten Zustand befinden. Alleine die Verwundung hatte bereits einen induzierenden Effekt auf viele untersuchte Gene (nach 8 h), z. B. in der IEC-18-Zelllinie PTGS und SERPINE1 und in den Lungenzelllinien BEAS-2B und A549 die Matrixmetalloproteasen. Die zusätzliche Gabe von TNF α wirkte teils stärker (z. B. IL-6 in IEC-18-Zellen) oder schwächer (z.B. CXCL2 in IEC-18 und A549) induzierend auf verwundete Zellen.

Die TNF α -vermittelte Induktion von NF- κ B führt zu einer Verminderung der Transkription von TFF-Peptiden. Dies wurde für gastrointestinale Zellen berichtet und konnte für TFF3 auch im Darmgewebe von Ratten mit experimentell induzierter Kolitis beobachtet werden (Dossinger et al., 2002; Loncar et al. 2003). In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zellen konnte keine solche Wirkung von TNF α beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Andererseits können die anti-inflammatorischen Zytokine (IL-6) die Expression von TFF-Peptide steigern (Tebbutt et al., 2002). So wirkte sich die TNF α -Stimulation von BEAS-2B und A549-Zellen (unabhängig ob verletzt oder unverletzt, Abb. 14 und Abb. 15) auf die Expression von TFF1 positiv. Dies kann auch mit der gesteigerten Expression von IL-6 zusammenhängen.

Während TFF3-Monomer in IEC-18-Zellen einen schwach induzierenden Effekt auf unverwundete Zellen (bezüglich CXCL2, PTGS, SERPINE1) oder verwundete Zellen (bezüglich MMP9) zeigte (Abb. 12, Abb. 13), konnte keine analoge Wirkung in den Lungenzelllinien beobachtet werden. Für IEC-18-Zellen wurde schon in der Vergangenheit eine PTGS(COX2)-induzierende Wirkung beschrieben (Tan et al., 2000). Am Beispiel der gesteigerten PTGS-Expression (Schlüsselenzym der Prostaglandin-Biosynthese, welches zur Herabregulation der Entzündungsreaktion beiträgt) durch TFF3 kann hier eine protektive Wirkung von TFF3 vor allem auf die Integrität der unverletzten Zellen gezeigt werden. Nach einer Verletzung zeigte TFF3 keine induzierende Wirkung.

Auf die durch TNF α hochregulierten Gene konnte ein schwach hemmender Einfluß von TFF3-Monomer festgestellt werden, wobei es sowohl auf unverwundete (IEC-18: CXCL2, SERPINE1, PTGS, IL-6; A549: IL-6, IL-8, CXCL2) als auch auf verwundete (IEC-18: SERPINE1; A549: CXCL2) Zellen Effekte zeigte (Abb. 13, Abb. 15). Nach Verwundung hatte TFF3-Monomer einen induzierenden Effekt auf die durch TNF α erhöhte Expression von MMP9 (Abb. 15). Dieser schwach modulierende Effekt von TFF3 konnte somit überwiegend erst nach vorangegangener Behandlung mit TNF α und konsekutiver Hochregulation der Entzündungsgene gezeigt werden. Dies könnte die oft unterschiedliche Wirkung von TFF3 erklären (anti- oder pro-apoptotisch; Paulsen et al., 2008; Rösler et al., 2010).

Eine entzündungsmodulierende Funktion von TFF3 konnte über eine transiente Aktivierung von NF- κ B beobachtet werden (Chen et al., 2000; Zhu et al., 2005). Eine anhaltende Aktivierung von NF- κ B (z.B. via TNF α) während der frühen Phase der Entzündung verstärkt Entzündungsreaktionen *in vivo*. Im Gegensatz dazu resultiert eine transiente Aktivierung von NF- κ B in einer anti-entzündlichen Reaktion. Dies könnte die anti-inflammatorischen Effekte

auf der Transkriptebene erklären. Graness et al. (2002) konnten immunregulierende Eigenschaften von TFF3 (wie auch von TFF2) im Synergismus mit TNF α auf die Sekretion von IL-6 und IL-8 beobachten. Auf der RNA-Ebene wurde in BEAS-2B und A549-Zellen dieser synergistische Effekt dagegen nicht beobachtet (ähnliche Ergebnisse mit TFF3-Dimer, Daten nicht gezeigt). Mit TFF3(-Monomer) wurde vielmehr eine signifikante Abnahme des TNF α -induzierten Transkriptes von IL-8 in BEAS-2B gezeigt (Abb. 14). Somit wird deutlich, dass die Korrelationen von Transkripten und Proteinen je Zelltyp bzw. Gewebeart und Entzündungsstatus variiert (Ghazalpour et al., 2011).

In Anbetracht der Unterschiede zwischen den rekombinanten Peptiden und *in vivo* vorkommenden Formen von TFF3 stellt sich die Frage ob die gezeigten Effekte, die rekombinantes TFF3 auf die Immunantwort hervorrufen konnte, auch mit denen der nativen Formen vergleichbar sind. Weitere Versuche zur Validierung dieses Sachverhaltes sind deshalb vonnöten.

5.6 CXCR4: ein möglicher Rezeptor von TFF2?

Obwohl über die Fähigkeit der TFF-Peptide berichtet wurde, Signaltransduktionswege zu aktivieren (Baus-Loncar, 2005b), konnten der TFF-Signaltransduktion bis heute keine direkten Zelloberflächenrezeptoren zugewiesen werden. Lediglich Dubeykovskaya et al. (2009) haben in Lymphozyten- und Krebszelllinien nach Stimulation mit rekombinantem TFF2 über eine Aktivierung eines Ca²⁺-abhängigen Signalweges via niederaffinen Chemokinrezeptor CXCR4 berichtet.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit den CXCR4-exprimierenden HEK.CXCR4- und HEK.CD4.403/CXCR4-Zellen (Ahr et al., 2005) konnte die durch den einzigen sicher bekannten CXCR4-Liganden SDF-1 α hervorgerufene Steigerung der Expression von Genen wie CXCL1 (Abb. 9) oder CCL2 (Dwinell et al., 1999; Crane et al., 2000) durch TFF2-glyk-Gabe nicht hervorgerufen werden. Auch konnten in BEAS-2B- und IEC-18-Zellen nach Vorbehandlung mit IL-1 β (um die CXCR4-Expression zu steigern; Eddleston et al., 2002) keine solchen Effekte beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Entdeckung des mutmaßlichen TFF2-Rezeptors CXCR4 hatte große Erwartungen in der TFF-Forschung geweckt; vier Jahre später sind verifizierende Berichte darüber jedoch rar. Lediglich wenige Arbeitsgruppen hatten zwischen CXCR4-Rezeptor und via rekombinantem TFF2 vermittelten Effekten einen Zusammenhang erkennen können (Wills-Karp et al., 2012, Orime et al., 2012).

Da außer bei den o. g. möglichen SDF1 α -Zielgenen keine signifikante Steigerung der Transkripte durch SDF1 α festgestellt wurde [IL-8, IL-6, SNCAIP (*synuclein, alpha interacting protein (synphilin)*), BMP-6 (*bone morphogenetic protein 6*), CCL26 (*chemokine (C-C motif) ligand 26*), MMP2 (Dwinell et al., 1999; Oh et al., 2001; Lin et al., 2000; Stich et al. (2009), Daten nicht gezeigt)], kann die beschränkte Responsivität der Zellen unter den hier gewählten Bedingungen nicht ausgeschlossen werden. Unter der Annahme, dass die biologische Funktion nativer TFF2-Formen von einem Partner in Form eines Heteromers anhängig ist, könnte die Wirkung von SDF α zusätzlich mit dem aus Gewebe aufgereinigtem TFF2 (zur Zeit in Vorbereitung am Institut) verglichen werden.

5.7 Beteiligung von TFF-Peptiden an der Immunantwort im zentralen Nervensystem

Zu den wichtigsten immunkompetenten Zellen im zentralen Nervensystem gehören die eng mit Makrophagen verwandten Mikrogliazellen. Pathologische Reize führen zu ihrer Aktivierung und ermöglichten es, eine spezifische Immunreaktion zu initiieren oder zu vermitteln (Saijo et al., 2011). Entzündung und Aktivierung der Mikrogliazellen stellt eine Komponente für die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen dar. Während eine Aktivierung der Mikroglia notwendig und entscheidend für die Immunabwehr ist, ruft eine andauernde Aktivierung von Mikrogliazellen Neurotoxizität hervor (Qin et al., 2007). In Tierversuchen zeigt sich, dass hohe Dosen systemisch applizierten Lipopolysaccharides (LPS, Endotoxin aus gram-negativen Bakterien) über eine Bindung von TNF α an seine

Rezeptoren der Blut-Hirn-Schranke eine anhaltende Entzündung und progressive Neurotoxizität hervorrufen (Qin et al., 2007).

Als Ersatz für primäre Mikrogliazellen für *in vitro* Studien eignen sich die BV-2 Zellen (primäre Maus-Mikrogliazellen, die durch eine stabile Transfektion mit einem v-raf/v-myc rekombinanten Retrovirus immortalisiert wurden, Blasi et al., 1990). Diese können mit LPS aktiviert werden (Henn et al., 2009). Die in Rahmen dieser Arbeit in den BV-2-Zellen nach LPS-Behandlung nachgewiesene Steigerung der Transkripte von TFF1 und TFF2 (Abb. 31) impliziert eine Rolle der TFF-Peptide in Entzündungsprozessen des zentralen Nervensystems.

Die Expression von TFF-Peptiden wurde in verschiedenen Regionen des Gehirn nachgewiesen (Hirota et al., 1995; Probst et al., 1995; Jagla et al., 2000; Hoffmann et al., 2001) und es gibt Hinweise auf ihre Rolle während der Hirnentwicklung (Hinz et al., 2004). Ihre Aufgabe im zentralen Nervensystem ist jedoch weitgehend nicht geklärt; eine Funktion als Neuropeptid wird vermutet (Probst et al., 1996). Eine modulierende Wirkung der Immunantwort (analog der festgestellten Wirkung von TFF3 auf die TNF α -induzierte Genexpression) im Gehirn wäre denkbar. Jedenfalls lassen die ersten Zwischenergebnisse laufender Tierversuche (Toxoplasma-Infektion) auf eine Beteiligung der TFF-Peptide, besonders TFF1, an inflammatorischen Prozessen im Gehirn schließen (Znalesniak, Fu, 2011-2012; unveröffentlichte Daten).

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu etablieren, die eine *in vitro* Trennung von migrierenden/restituierenden und stationären Zellen ermöglicht und somit einen Einblick in die Genexpressionsprofile dieser Zellen während der Restitutionsprozesse erlaubt. Mit Hilfe eines präparativen Scratch-Assays konnten systematische Genexpressionsprofile während der Migration gewonnen werden und mit Expressionsprofilen nach der Stimulation mit verschiedenen Motogenen wie EGF verglichen werden. So war es möglich, unterschiedliche Effekte von EGF auf stationäre und migrierende Zellen nachzuweisen. Außerdem gelang es, primäre epitheliale Zellkulturen des murinen Magens als vielversprechendes *in vitro*-Modellsystem für die Untersuchung der schnellen Reparaturvorgänge durch die Migration stabil zu etablieren. Ebenso wurden für alle untersuchten Zelllinien Hinweise auf eine Dedifferenzierung und partielle epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) während der Migration erhalten.

Im Fokus dieser Arbeit lag die vergleichende Transkript-Analyse der migrierenden und stationären Zellen der nichttransformierten intestinalen IEC-18-Zelllinie. Nach Langzeitkultivierung und Verwundung verloren die migrierenden Zellen allmählich speziell die Merkmale von Paneth-, Becherzellen und von Enterozyten sowie einige Merkmale neuro/endokriner Kommunikation (Herunterregulation von LYZ, ANPEP, TFF3, SLC6A2, SLC6A4). Dagegen behielten die Zellen während der Restitution den neuroendokrinen ähnlichen Differenzierungszustand bei bzw. differenzierten zurück zu Krypten-Vorläuferzellen (HES1, ENO2, NES, GLPR2, CHGB, NPY). In migrierenden Zellen zeichnete sich eine untergeordnete Rolle der LGR5-Stammzellproliferation (Herunterregulation von LGR5) gegenüber BMI1-exprimierenden Zellen und eine Hochregulation von Zyklinen (CCNA2, CCD1, CCE1) ab. Weiterhin konnten charakteristische Veränderungen in der Genexpression von Zell-Zell-Kontakten festgestellt werden. Hier wurden die entsprechenden Gene in migrierenden Zellen meist herunterreguliert (CDH17, CLDN1, -2, -6, -12, -15, -19, -20, JAM2, TJP1, -2, -3, GJA1/CX43, Nectin, MYO6, MYLK3). Viele dieser Gene haben einen direkten Einfluss auf die Durchlässigkeit der *tight junctions*. OCLN zeigte jedoch keine verringerte Expression. Für die überwiegend geschlossen-kollektiv migrierenden IEC-18-Zellen konnte keine eindeutige EMT beobachtet werden. Lediglich eine leichte Tendenz zu wenig ausgeprägter/partieller Typ2-EMT (Hochregulation von ACTA1, -2) konnte festgestellt werden. Diese vollzieht sich in der Nähe der Migrationsfront und wird nach Reepithelialisierung wieder rückgängig gemacht. Außerdem konnte eine unterschiedliche Regulation von Spleißvarianten von TGF β in migrierenden Zellen sowie eine Induktion von TGFA, HBEGF, ODC und SERPINE1 festgestellt werden.

Nach Behandlung der IEC-18-Zellen mit EGF wurden Gene induziert, die eine wichtige Rolle in der zellulären Kommunikation, der Aufrechterhaltung der *tight junction*-Permeabilität, der EMT sowie in der Metastasierung spielen, darunter CLDN18, AF6, MYO6, TNC, EGF, EGFR, CXCR4 (hauptsächlich in stationären Zellen) sowie CDH17, CLDN1, (auch in migrierenden Zellen). CDLN2 wurde dagegen herunterreguliert. Dies stimmt überein mit der aufgelockerten Migrationsweise und fibroblastenartigen Morphologie speziell der Pionierzellen überein. Die geringe Responsivität von migrierenden IEC-18-Zellen auf EGF lässt sich mit einer Herunterregulation des EGFR erklären. Die EGF-Behandlung hatte auch einen dämpfenden Effekt auf die TFF3-Transkription.

Neben IEC-18-Zellen wurden noch weitere epitheliale Zelllinien untersucht, darunter transformierte bronchiale Zellen (BEAS-2B), Krebszellen (A549, Alveolaradenokarzinom; AGS, Magenadenokarzinom) sowie primäre Zellkulturen (Magen). In Übereinstimmung mit der aufgelockerten (teilweise individuellen) Migrationsweise und der fibroblastoiden Erscheinungsform der BEAS-2B- und A549-Lungenzellen konnten Hinweise auf eine weitergehende EMT erhalten werden (Herunterregulation von E-Cadherin, Hochregulation von SNAI1). OCLN und VIM waren jedoch von der Migration unbeeinflusst. Für eine Reihe von Genen konnten deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien festgestellt werden. Dazu zählen (in migrierenden Zellen) ACTA2, FN1, TNC, MMP1, MMP9, DKK1, GATA3, CCND1 und VTN. Beide Lungenzelllinien wiesen eine Dedifferenzierung auf (TFF1

und SFTPC in BEAS-2B oder TFF1, TFF3, LYZ, MUC5B in A549). SERPINE1 erfuhr bei beiden eine Hochregulation, wohingegen MMP28 stark herunterreguliert wurde.

Im Gegensatz zu den Lungenzelllinien zeigten die oft kettenartig migrierenden AGS-Zellen eine nur leicht gestreckte Form während der Migration auf. E-Cadherin wurde dabei herunterreguliert. Interessanterweise waren viele EMT-Marker weder in stationären noch in migrierenden Zellen nachweisbar (CDH2, SNAI2, TWIST, MMP9 oder auch TNC), andere EMT-Marker waren wiederum von der Migration unbeeinflusst und in den stationären Zellen konstitutiv exprimiert und (ACTA2, OCLN, VIM, MMP1, MMP9 wie auch SERPINE1) was auf den Krebszellcharakter der AGS-Zellen hinweist. Außerdem konnten abermals Anzeichen einer Dedifferenzierung während der Migration gefunden werden (PGA, PGC, LIPF, TFF3).

Dagegen lieferte die fibroblastoide Morphologie der migrierenden Zellen langlebiger Primärkulturen aus den Epithelzellen des murinen Antrums einen ersten Hinweis auf eine ablaufende EMT. Die verminderte Expression von Differenzierungsmarkern (GAST, PDX-1, TFF1-3, LYZ) und die Expression von EMT-relevanten Genen stehen damit im Einklang (Herunterregulation von E-Cadherin und OCLN, sowie Heraufregulation von ACTA1 und 2. Hingegen war die VIM-, SNAI1-, SNAI2-, TNC- und CDH2-Expression in migrierenden Zellen aber nicht verändert. Dies lässt auf eine partielle Typ2-EMT schließen. Wie schon die nicht transformierten IEC-18-Zellen wiesen auch die Primärkulturen eine Kontaktinhibition des Wachstums auf. Außerdem konnte in migrierenden Zellen wie bei IEC-18-Zellen, eine deutliche Steigerung der Zyklone D1 und E1 beobachtet werden. Das Potenzial, in stark serumreduziertem oder serumfreiem Medium zu wandern (ähnlich wie IEC-18- oder IEC-6-Zellen und im Gegensatz zu BEAS-2B, A549 oder AGS, die auf einen höheren Serum-/Serumersatzspiegel angewiesen sind) macht die primären gastralen Zellkulturen zu einem interessanten Modellsystem für zukünftige Untersuchungen.

Neben einem motogenen Effekt induzierte die EGF-Behandlung vor allem die Transkription von MMP1. Dabei zeigten migrierende im Vergleich zu stationären BEAS-2B-Zellen eine größere Responsivität gegenüber EGF. In A549-Zellen zeigte sich dagegen eine Induktion von MMP1 hauptsächlich in den stationären Zellen. Die primären Zellkulturen des murinen Antrums wiesen nach EGF-Behandlung ebenfalls eine deutliche Hochregulation von MMP1, aber auch von MMP9 auf. Die migrierenden Zellen zeigten dabei (analog zu BEAS-2B-Zellen) eine stärkere Induktion als die stationären Zellen.

Rekombinantes TFF2 und TFF3 zeigte im Scratch-Assay keinen signifikanten motogenen Effekt. Jedoch hatte rekombinantes TFF3 nach mechanischer Verletzung (multi-Scratch-Assay) modulierende Effekte auf verschiedene inflammatorische Gene, abhängig vom „Verletzungsgrad“ des Zellverbandes (IEC-18: SERPINE1, PTGS, CXCL2). Es zeigte sich ein leichter, inhibitorischer Einfluss von TFF3 auf durch TNF α hochregulierte Gene, wobei TFF3 sowohl auf unverwundete (IEC-18: CXCL2, SERPINE1, PTGS, IL-6; A549: IL-6, IL-8, CXCL2) als auch auf verwundete (IEC-18: SERPINE1; A549: CXCL2) Zellen Effekte aufwies. Nach Verwundung hatte TFF3 einen induzierenden Effekt auf die durch TNF α erhöhte Expression von MMP9.

Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode können nun in Zukunft Genexpressionsprofile von migrierenden Zellen erstellt werden, die z.B. aus Zellkulturen von Tff-KO-Mäusen stammen. Dies könnte u.a. dazu beitragen, die Rolle von TFF-Peptiden im Zuge der Restitution besser zu verstehen. Interessant wäre es auch, die Korrelation von RNA-Transkripten und Proteingehalt in stationären/migrierenden Zellen zu untersuchen.

Aufgrund von neuen Erkenntnissen von Albert et al. (2010, 2012), Hanisch et al. (2012) und Ragge et. al. (unveröffentlichte Daten 2012), die starke Unterschiede von *in vivo* vorkommenden TFF-Formen zu den rekombinanten TFF-Peptiden beschreiben, ist eine funktionelle Analyse der nativen Formen von TFF-Peptiden besonders vielversprechend. Der nachgewiesene Anstieg der Expression von TFF1 und TFF2 in der Mikroglia-Zelllinie BV-2 nach LPS-Behandlung unterstreicht die mögliche Rolle von TFF-Peptiden in der Regulation von inflammatorischen Prozessen des zentralen Nervensystems. Eine weitere Untersuchung dieses Sachverhaltes sollte deshalb in entsprechenden Tiermodellen realisiert werden.

6.1 Summary and outlook

The aim of this study was to establish a method that allows the *in vitro* separation of migratory and stationary cells and thus to provide insights into the gene expression profiles of these cells during the process of restitution. Using a preparative scratch assay, systematic gene expression profiles during migration were obtained and compared with the expression profiles after stimulating with various motogenes such as EGF. With the described method it was possible to detect different effects of EGF on stationary and migratory cells. Further, the successful establishment of primary epithelial cell cultures from the murine antrum allowed the creation of a promising non-transformed model system to study the rapid gastric repair after injury by cell migration. The evidence of dedifferentiation and partial epithelial-mesenchymal transition (EMT) during the migration was obtained from all the tested cell lines.

The focus of this study was the comparative gene transcript analysis of separated stationary and migratory cells from the non-transformed intestinal IEC-18 cell line. After a long-term cultivation and wounding, the migrating cells gradually lost most of the features of Paneth cells, goblet cells, enterocytes and some markers of neuro/endocrine communication (down-regulation of LYZ, ANPEP, TFF3, SLC6A2, SLC6A4). However, during the restitution, the cells retained the neuroendocrine-like state of differentiation or differentiated back to crypt progenitor cells (HES1, ENO2, NES, GLPR2, CHGB, NPY). In migrating cells the only minor role of the LGR5-stem cell population (down-regulation of LGR5) compared to BMI1-expressing cells and up-regulation of cyclins (CCNA2, CCD1, CCE1) became apparent.

Furthermore, many genes involved in cell-cell contacts were down-regulated in migratory IEC-18 cells (CDH17, CLDN -2, -6, -12, -15, -19, -20, JAM2, TJP1, -2, -3, GJA1/CX43). The afadin-6/nectin complex as well as MYO6 and MYLK3 were also down-regulated. Occludin however showed no reduction in the expression level. For the collectively (mostly coherent) migrating IEC-18 cells there were no unequivocal signs of EMT. Only a slight tendency for a less pronounced/partial type 2 EMT (e.g. up-regulation of ACTA2), which is probably limited to the migration front and reverses after re-epithelialization, was found. Besides the induction of TGFA, HBEGF, ODC and SERPINE1, a different regulation of splice variants of TGF β was detected during migration.

EGF treatment severely affected the expression of genes important for cell-cell contacts, cell communication, maintenance of tight junction permeability and involved in EMT and metastasis. Among them CLDN18, AF6, MYO6, TNC, EGF, EGFR, CXCR4 (mainly in stationary cells) and CDH17, CLDN1 (also in migrating cells) were induced. CDLN2 was down-regulated. This is consistent with the migration in a less collective/coherent manner and with fibroblast-like morphology, particularly of pioneer cells. The low responsiveness of migrating IEC-18 cells to EGF can be explained by a down-regulation of EGFR. EGF treatment resulted also in a markedly decreased expression of TFF3.

Besides IEC-18 cells, further epithelial cell lines were examined, including transformed bronchial cells (BEAS-2B), cancer cells (A549, alveolar adenocarcinoma; AGS gastric adenocarcinoma) and primary cell cultures (gastric/stomach).

In accordance with the loosened (partially individual) way of migration and fibroblastoid appearance of migrating BEAS-2B and A549 lung cells, there were indications of a more pronounced EMT (clear down-regulation of E-cadherin, up-regulation of SNAI1), but OCLN and VIM were unaltered. For some genes clear differences in expression during migration were detected between the investigated cell lines. These included ACTA2, FN1, TNC, VTN, MMP1, MMP9, DKK1, GATA3 and CCND1. Both lung cell lines showed the up-regulated expression of SERPINE1, decrease in MMP28 expression and dedifferentiation during migration (down-regulation of TFF1 und SFTPC in BEAS-2B or TFF1, TFF3, LYZ, MUC5B in A549).

AGS cells often showed (in contrast to the lung cells) chain migration with only slightly elongated shape. Interestingly, while E-cadherin was down-regulated, many of the EMT markers were undetectable in stationary or were not induced in migratory cells (CDH2, SNAI2, TWIST, MMP9 and also TNC); others, (ACTA2, OCLN, VIM, MMP1, MMP9,

SERPINE1), were not affected by migration indicating the nature of cancer cells. In addition, signs of dedifferentiation during migration were also found (PGA, PGC, LIPF, TFF3).

The decreased expression of differentiation markers (GAST, PDX-1, TFF1-3, LYZ) was also found in migrating primary cell cultures (murine antrum). Here the fibroblastoid morphology of migrating cells as a first indication for an undergoing EMT and the expression of some EMT-relevant genes are thus in line (down-regulation of E-cadherin and occludin and up-regulation of ACTA2). On the other side VIM, SNAI1, SNAI2, TNC and CDH2 expression in migrating cells was not altered. This suggests a partial Typ2 EMT. Like the non-transformed IEC-18 cells, the primary cultures also showed contact inhibition of growth and in the migrating cells a significant increase in expression of cyclins D1 and E1 was observed. The potential to migrate in serum-reduced or serum-free medium (similar to IEC-18 and IEC-6 cells and in contrast to BEAS-2B, A549 or AGS, which rely on a higher serum/serum substitute level) makes the primary gastric cell cultures an interesting model system for future studies.

In addition to the motogenic and migration-pattern altering effects, EGF treatment particularly induced the transcription of MMP1. However migratory BEAS-2B cells showed a higher responsiveness to EGF than the stationary cells; in the A549 cell line mainly the stationary cells were responding. In primary cells EGF treatment caused an induction of MMP9, besides a significant upregulation of MMP1 (analogous to BEAS-2B cells).

Recombinant TFF2 and TFF3 showed no significant motogenic effects in scratch assay. But the multi scratch assay with recombinant TFF3 revealed its modulating effects on various inflammatory genes, depending on the wounded-state of the cell monolayer (IEC-18: SERPINE1, PTGS, CXCL2, MMP9). TFF3 showed also a slight inhibitory effect on genes up-regulated by TNF α , both in un-wounded monolayers (IEC-18: CXCL2, SERPINE1, PTGS, IL-6; A549: IL-6, IL-8, CXCL2) and in wounded cells (IEC-18: SERPINE1; A549: CXCL2). TFF3 showed after wounding also a slightly synergistic effect with TNF α inducing the transcription of MMP9.

In the future the presented method can be used to study the gene expression profiles of migratory cells derived from cell cultures of Tff-KO mice. This could help to better understand the role of TFF peptides during the restitution. It would also be interesting to investigate the correlation of RNA transcripts and protein content in stationary and migratory cells. Based on new findings from Albert et al. (2010, 2012), Hanisch et al. (2012) and Ragge et al. (unpublished data, 2012), where major differences between *in vivo* forms of TFFs and recombinant peptides are described, functional analysis with the native forms of the peptides are particularly promising.

The detected increase in the expression of TFF1 and TFF2 in the microglia cell line BV-2 after LPS treatment underlines the potential role of TFF peptides in the regulation of inflammatory processes of the central nervous system. A further examination of this situation should therefore be implemented in appropriate animal models.

7. Literaturverzeichnis

- Acloque** H, Adams M S, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto M A; Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease; *J Clin Invest.*, 2009,119: 1438-1449.
- Adams** J C; Molecular organisation of cell-matrix contacts: essential multiprotein assemblies in cell and tissue function; *Expert Rev Mol Med.*, 2002, 4: 1-24.
- Ahr** B, Denizot M, Robert-Hebmann V, Brelot A, Biard-Piechaczyk M; Identification of the cytoplasmic domains of CXCR4 involved in Jak2 and STAT3 phosphorylation; *J Biol Chem.*, 2005, 25: 6692-6700.
- Aktary** Z, Pasdar M; Plakoglobin: role in tumorigenesis and metastasis; *Int J Cell Biol.*, 2012, 2012:189521.
- Alattia** J R, Kurokawa H, Ikura M; Structural view of cadherin-mediated cell-cell adhesion; *Cell Mol Life Sci.*, 1999, 55: 359-367.
- Albert** T K, Laubinger W, Müller S, Hanisch F G, Kalinski T, Meyer F, Hoffmann W; Human intestinal TFF3 forms disulfide-linked heteromers with the mucus-associated FCGBP protein and is released by hydrogen sulfide; *J Proteome Res*, 2010, 9: 3108-3117.
- Albert** T; Biosynthese von TFF3 im humanen Gastrointestinaltrakt; *Disserationsschrift, Fakultät für Naturwissenschaften der Otto-von Guericke-Universität Magdeburg*, 2012, Unversitätsbibliothek.
- Allen** G L, Menendez I Y, Ryan M A, Mazor R L, Wispé J R, Fiedler M A, Wong H R; Hypoxia synergistically increases TNF-alpha-induced interleukin-8 gene expression in A549 cells; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 2000, 278: L253-260.
- Angres** B, Kim L, Jung R, Gessner R, Tauber R; LI-cadherin gene expression during mouse intestinal development; *Dev Dyn.*, 2001, 221: 182-193.
- Arsic** N, Bendris N, Peter M, Begon-Pescia C, Rebouissou C, Gadéa G, Bouquier N, Bibeau F, Lemmers B, Blanchard J M; A novel function for Cyclin A2: control of cell invasion via RhoA signaling; *J Cell Biol.*, 2012, 196: 147-162.
- Babbitt** B A, Parkos C A, Mandell K J, Winfree L M, Laur O, Ivanov A I, Nusrat A; Annexin 2 regulates intestinal epithelial cell spreading and wound closure through rho-related signaling; *Am J Pathol.*, 2007, 170: 951-966.
- Bailly** M, Condeelis J; Cell motility: insights from the backstage; *Nat Cell Biol.*, 2002, 4: 292-294.
- Balda** M S, Matter K; Tight junctions and the regulation of gene expression; *Biochim Biophys Acta.*, 2009, 1788: 761-767.
- Barker** N, J van Es J H, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegbarth A, Korving J, Begthel, Peters P J, Clevers H; Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5; *Nature*, 2007, 449: 1003-1007.
- Barnard** J A, Polk W H, Moses H L, Coffey R A; Production of transforming growth factor- α by normal rat small intestine; *Am J Physiol.* 1991; 261: C994-C1000.
- Bastide** P, Darido C, Pannequin J, Kist R, Robine S, Marty-Double C, Bibeau F, Scherer G, Joubert D, Hollande F, Blache P, Jay P; Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium; *J Cell Biol.*, 2007, 178: 635-648.
- Battle** E, Henderson J T, Beghtel H, van den Born M M, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, Clevers H; Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB; *Cell*, 2002, 111: 251-263.
- Baum** B, Georgiou M; Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling; *J Cell Biol.*, 2011, 192: 907-917.
- Baus-Loncar** M, Giraud AS; Multiple regulatory pathways for trefoil factor (TFF) genes; *Cell Mol Life Sci.*, 2005b, 62: 2921-2931.
- Baus-Loncar** M, Kayademir T, Takaishi S, Wang T; Trefoil factor family 2 deficiency and immune response; *Cell Mol Life Sci.*, 2005a, 62: 2947-2955.
- Beck** P L, Podolsky D K; Growth factors in inflammatory bowel disease; *Inflamm Bowel Dis.*, 1999; 5: 44-60.
- Benoit** Y D, Paré F, Francoeur C, Jean D, Tremblay E, Boudreau F, Escaffit F, Beaulieu J F; Cooperation between HNF-1alpha, Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line; *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2010, 298: G504-517.
- Bergmann** A, Steller H; Apoptosis, Stem Cells, and Tissue Regeneration; *Sci. Signal.*, 2010, 145, p. re8
- Bister** V O, Salmela M T, Karjalainen-Lindsberg M L, Uria J, Lohi J, Puolakkainen P, Lopez-Otin C, Saarialho-Kere U; Differential expression of three matrix metalloproteinases, MMP-19, MMP-26, and MMP-28, in normal and inflamed intestine and colon cancer; *Dig Dis Sci.*, 2004, 49: 653-661.
- Bjerknes** M, Cheng H; Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons; *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2001, 98:12497-12502.
- Blanchard** C, Durual S, Estienne M, Bouzakri K, Heim M H, Blin N; IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis; *J. Immunol.*, 2004, 172: 3775-3783.
- Blasi** E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F.; Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus; *J Neuroimmunol.*, 1990, 27: 229-237.
- Böcker** W, Denk H, Heitz P U, Moch H; Pathologie, Auflage 4, 2008; Urban & Fischer in Elsevier; ISBN 978-3-437-42382-6.

- Boero S, Silvestri M, Ullmann N, Rossi G A;** Modulation by flunisolide of tumor necrosis factor-alpha-induced stimulation of airway epithelial cell activities related to eosinophil inflammation; *J Asthma.*, 2010, 47: 381-397.
- Bonneton C, Sibarita J B, Thiery J P;** Relationship between cell migration and cell cycle during the initiation of epithelial to fibroblastoid transition; *Cell Motil Cytoskeleton*, 1999, 43: 288-295.
- Bonventre J V;** Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure; *J Am Soc Nephrol.*, 2003, 1: 55-61.
- Bosse T, Piaseckyj C M, Burghard E, Fialkovich J J, Rajagopal S, Pu W T, Krasinski S D;** Gata4 is essential for the maintenance of jejunal-ileal identities in the adult mouse small intestine; *Mol Cell Biol.*, 2006, 26: 9060-9070.
- Brabletz S, Schmalhofer O, Brabletz T;** Gastrointestinal stem cells in development and cancer; *J Pathol.*, 2009, 217: 307-317.
- Brand S, Beigel F, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte J M, Diepolder H, Marquardt A, Jagla W, Popp A, Leclair S, Herrmann K, Seiderer J, Ochsenkuhn T, Goke B, Auernhammer CJ, Dambacher J;** IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration; *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2006, 290: 827-883.
- Bryant D M, Mostov K E;** From cells to organs: building polarized tissue; *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2008, 9: 887-901.
- Bulut K, Pennartz C, Felderbauer P, Ansorge N, Banasch M, Schmitz F, Schmidt W E, Hoffmann P;** Vascular endothelial growth factor (VEGF164) ameliorates intestinal epithelial injury in vitro in IEC-18 and Caco-2 monolayers via induction of TGF-beta release from epithelial cells; *Scand J Gastroenterol*, 2006, 41: 687-692.
- Caramori G, Lim S, Ito K, Tomita K, Oates T, Jazrawi E, Chung K F, Barnes P J, Adcock I M;** Expression of GATA family of transcription factors in T-cells, monocytes and bronchial biopsies; *Eur Respir J.*, 2001, 18: 466-473.
- Cario E, Rosenberg I M, Brandwein SL, Beck P L, Reinecker H C, Podolsky D K;** Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors; *J Immunol.*, 2000, 164: 966-972.
- Chai J, Modak C, Mouazzen W, Narvaez R, Pham J;** Epithelial or mesenchymal: Where to draw the line?; *BioScience Trends.*, 2010, 4: 130-142.
- Chandran P, Sathaporn S, Robins A, Eremin O;** Inflammatory bowel disease: dysfunction of GALT and gut bacterial flora (II); *Surgeon.*, 2003, 1: 125-136.
- Chen C C, Sun Y T, Chen J J, Chang Y J;** Tumor necrosis factor-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression via sequential activation of ceramide-dependent mitogen-activated protein kinases, and IkkappaB kinase 1/2 in human alveolar epithelial cells; *Mol Pharmacol.*, 2001, 59: 493-500.
- Chen Y H, Lu Y, De Plaen I G, Wang LY, Tan X D;** Transcription factor NF-kappaB signals antianoinic function of trefoil factor 3 on intestinal epithelial cells; *Biochem Biophys Res Commun.*, 2000, 274: 576-582.
- Cheng A M, Morrison S W, Yang D X, Hagen S J;** Energy dependence of restitution in the gastric mucosa; *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2001, 281: 430-438.
- Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N;** Transmembrane proteins of tight junctions; *Biochim Biophys Acta.*, 2008, 1178: 588-600.
- Chirgwin J M, Przybyla A E, MacDonald RJ, Rutter W J;** Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease; *Biochemistry*, 1979, 18: 5294-5299.
- Chomczynski P, Sacchi N;** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction; *Anal Biochem.*, 1987, 162: 156-159.
- Chou J, Provot S, Werb Z;** GATA3 in development and cancer differentiation: cells GATA have it! *J Cell Physiol.*, 2010, 222: 42-49.
- Chwieralski C E, Schnurra I, Thim L, Hoffmann W;** Epidermal growth factor and trefoil factor family 2 synergistically trigger chemotaxis on BEAS-2B cells via different signaling cascades. *Am J Respir Cell Mol Biol.*; 2004, 31: 528-537
- Ciacchi C, Lind S E, Podolsky D K;** Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers; *Gastroenterology*, 1993, 105: 93-101.
- Clayburgh D R, Rosen S, Witkowski E D, Wang F, Blair S, Dudek S, Garcia J G N, Alverdy J C, Turner J R;** A differentiation-dependent splice variant of myosin light chain kinase, MLCK1, regulates epithelial tight junction permeability; *J Biol Chem.*, 2004, 279: 55506-55513.
- Clevers H, Battle E;** EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer; *Cancer Res.*, 2006, 66: 2-5.
- Coene E D, Gadelha C, White N, Malhas A, Thomas B, Shaw M, Vaux D J;** A novel role for BRCA1 in regulating breast cancer cell spreading and motility; *J Cell Biol.*, 2011, 192: 497-512. .
- Cohen D E, Melton D;** Turning straw into gold: directing cell fate for regenerative medicine; *Nat Rev Genet.*, 2011, 12: 243-252
- Cook G A, Familiar M, Thim L, Giraud A S;** The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response; *FEBS Lett.*, 1999, 456: 155-159.
- Coussens L, Werb Z;** Inflammation and cancer; *Nature*, 2002; 420: 860-867.
- Crane I J, Wallace C A, McKillop-Smith S, Forrester J V;** CXCR4 receptor expression on human retinal pigment epithelial cells from the blood-retina barrier leads to chemokine secretion and migration in response to stromal cell-derived factor 1 alpha; *J Immunol.*, 2000, 165: 4372-4378.

- Czekay R P**, Wilkins-Port C E, Higgins S P, Freytag J, Overstreet J M, Klein R M, Higgins C E, Samarakoon R, Higgins P J; PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration; *Int J Cell Biol.*, 2011, 2011: 562481.
- D'Atri F** and Citi S; Molecular complexity of vertebrate tight junctions (Review); *Mol Membr Biol.*, 2002, 19: 103-112.
- Dawe G S**, Tan X W, Xiao Z C; Cell migration from baby to mother; *Cell Adh Migr.*, 2007, 1: 19-27.
- Day R**, Salzet M; The neuroendocrine phenotype, cellular plasticity, and the search for genetic switches: redefining the diffuse neuroendocrine system; *Neuro Endocrinol Lett.*, 2002, 23: 447-451.
- de Wever O**, Pauwels P, de Craene B, Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Gespach C, Bracke M, Bercx G; Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front; *Histochem Cell Biol.*, 2008, 130: 481-494.
- Diamond G**, Legarda D, Ryan L K M; The innate immune response of the respiratory epithelium; *Immunol Rev.*, 2000, 173: 27-38
- Dignass A U**, Lynch-Devaney K, Podolsky DK: Hepatocyte growth factor/ scatter factor modulates intestinal epithelial cell proliferation and migration; *Biochem Biophys Res Commun.*, 1994b, 202: 701-709.
- Dignass A U**, Podolsky D K; Interleukin 2 modulates intestinal epithelial cell function in vitro; *Exp Cell Res.*, 1996; 225: 422-429.
- Dignass A U**, Stow J L, Babyatsky M W; Acute epithelial injury in the rat small intestine in vivo is associated with expanded expression of transforming growth factor alpha and beta; *Gut.*, 1996, 38: 687-693.
- Dignass A U**, Tsunekawa S, Podolsky D K; Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration; *Gastroenterology*, 1994c, 106: 1254-1262.
- Dignass A U**, Podolsky D K; Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta; *Gastroenterology*, 1993, 105: 1323-1332.
- Dignass A**, Lynch-Devaney K, Kindon H, Thim L, Podolsky D K; Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor β - independent pathway. *J Clin Invest.*, 1994a, 94: 376-383.
- DiMeo T A**, Anderson K, Phadke P, Fan C, Perou C M, Naber S, Kuperwasser C; A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer; *Cancer Res.*, 2009, 69: 5364-5373.
- Doerner A M**, Zuraw B L; TGF-beta1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1beta but not abrogated by corticosteroids; *Respir Res.*, 2009, 10: 100.
- Donner S**; Stand der Forschung und Potenziale von adulten Stammzellen. Ausarbeitung der Wissenschaftlichen Dienste des Deutschen Bundestages, 2007 ([http://www.bundestag.de/bic/analyse/2007/Der Stand der Forschung von embryonalen und adulten Stammzellen.pdf](http://www.bundestag.de/bic/analyse/2007/Der%20Stand%20der%20Forschung%20von%20embryonalen%20und%20adulten%20Stammzellen.pdf))
- Dossinger V**, Kayademir T, Blin N, Gött P; Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors; *Cell Physiol Biochem.*, 2002, 2: 197-206.
- Drees F**, Pokutta S, Yamada S, Nelson W J, Weis W I; Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly; *Cell*, 2005, 123: 903-915.
- Driscoll K E**, Hassenbein D G, Carter J M, Kunkel S L, Quinlan T R, Mossman B T; TNF alpha and increased chemokine expression in rat lung after particle exposure; *Toxicol Lett.*, 1995, 82-83: 483-489.
- Drozdowski L**, Thomson A B; Intestinal hormones and growth factors: effects on the small intestine; *World J Gastroenterol.* 2009, 15: 385-406.
- Du D**, Xu F, Yu L, Zhang C, Lu X, Yuan H, Huang Q, Zhang F, Bao H, Jia L, Wu X, Zhu X, Zhang X, Zhang Z, Chen Z; The tight junction protein, occludin, regulates the directional migration of epithelial cells; *Dev Cell.*, 2010, 18: 52-63.
- Dubeykovskaya Z**, Dubeykovskiy A; Solal-Cohen J; Wang T C; Secreted trefoil factor 2 activates the CXCR4 receptor in epithelial and lymphocytic cancer cell lines; *J. Biol. Chem.*, 2009, 284: 3650-3662.
- Dürer U**, Hartig R, Bang S, Thim L, Hoffmann W; TFF3 and EGF induce different migration patterns of intestinal epithelial cells in vitro and trigger increased internalization of E-cadherin; *Cell Physiol Biochem.*, 2007, 20: 329-346.
- Dusing M R**, Florence E A, Wiginton D A; High-level activation by a duodenum-specific enhancer requires functional GATA binding sites. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2003, 284: G1053-G1065.
- Dwinell M B**, Eckmann L, Leopard J D, Varki N M, Kagnoff M F; Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells; *Gastroenterology*, 1999, 117: 359-367
- Dydensborg A B**, Rose A A, Wilson B J, Grote D, Paquet M, Giguère V, Siegel P M, Bouchard M; GATA3 inhibits breast cancer growth and pulmonary breast cancer metastasis; *Oncogene*, 2009, 28: 2634-2642.
- Eddleston J**, Christiansen S C, Zuraw B L; Functional expression of the C-X-C chemokine receptor CXCR4 by human bronchial epithelial cells: regulation by proinflammatory mediators; *J Immunol.*, 2002, 169: 6445-6451.
- Efstathiou J A**, Noda M, Rowan A, Dixon C, Chinery R, Jawhari A, Hattori T, Wright N A, Bodmer W F, Pignatelli M; 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.*, 1998, 95: 3122-3127.
- El-Assal O N**, Besner G E; HB-EGF enhances restitution after intestinal ischemia/reperfusion via PI3K/Akt and MEK/ERK1/2 activation; *Gastroenterology*, 2005, 129: 609-625.

- Ellis P D**, Hadfield K M, Pascall J C, Brown K D; Heparin-binding epidermal-growthfactor- like growth factor gene expression is induced by scrape-wounding epithelial cell monolayers: involvement of mitogen-activated protein kinase cascades; *Biochem J.*, 2001, 354: 99-106.
- Elmore S**; Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death; *Toxicol Pathol*, 2007, 35: 495-516.
- Emami S**, Rodrigues S, Rodrigue C M, Le Floch N, Rivat C, Attoub S; Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression; *Peptides*, 2004, 25: 885–898.
- Epnér D E**, Partin A W, Schalken J A, Isaacs J T, Coffey D S; Association of glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase expression with cell motility and metastatic potential of rat prostatic adenocarcinoma; *Cancer Res.*, 1993, 53: 1995-1997.
- Erjefält J S**, Erjefält I, Sundler F, Persson C G; In vivo restitution of airway epithelium; *Cell Tissue Res.*, 1995, 281: 305-316.
- Etienne-Manneville S**; Polarity proteins in migration and invasion; *Oncogene*, 2008; 27: 6970-6980.
- Fan Y**, Bergmann A; Apoptosis-induced compensatory proliferation. The Cell is dead. Long live the Cell!; *Trends Cell Biol.*, 2008,18: 467-473.
- Fernández R M**, Ruiz-Miró M, Dolcet X, Aldea M, Garí E; Cyclin D1 interacts and collaborates with Ral GTPases enhancing cell detachment and motility; *Oncogene*, 2011; 30: 1936-1946.
- Fiocchi C**; Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions; *Am J Physiol.*, 1997, 273: 769-775.
- Fitsialos G**, Chassot A A, Turchi L, Dayem M A, LeBrignand K, Moreilhon C, Meneguzzi G, Buscà R, Mari B, Barbry P, Ponzio G; Transcriptional signature of epidermal keratinocytes subjected to *in vitro* scratch wounding reveals selective roles for ERK1/2, p38, and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways; *J Biol Chem.*, 2007, 282: 15090-15102.
- Flandez M**, Guilmeau S, Blache P, Augenlicht L H; KLF4 regulation in intestinal epithelial cell maturation; *Exp Cell Res.*, 2008, 314: 3712-3723.
- Florian M C**, Geiger H; Polarity in Stem Cells, Disease, and Aging; *Stem Cells*, 2010; 28: 1623-1629.
- Florian P**, Schöneberg T, Schulzke J D, Fromm M, Gitter A H; Single-cell epithelial defects close rapidly by an actinomyosin purse string mechanism with functional tight junctions; *J Physiol.*, 2002, 545: 485-499.
- Fournier M F**; Sauser R, Ambrosi D, Meister J J, Verkhovsky A B; Force transmission in migrating cells; *J Cell Biol.*, 2010, 188: 287-297.
- Fraley S I**, Feng Y, Krishnamurthy R, Longmore G D and Wirtz D; A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility, *Nature Cell Biology*, 2010, 12: 598-604
- Frank D J**, Noguchi T, Miller K G; Myosin VI: a structural role in actin organization important for protein and organelle localization and trafficking; *Curr Opin Cell Biol.*, 2004, 16: 189-194.
- Franzke C W**, Tasanen K, Schäcke H, Zhou Z, Tryggvason K, Mauch P, Zigrino C, Sunnarborg S, Lee D C, Fahrenholz F, Bruckner-Tuderman L; Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs; *The EMBO Journal*, 2002, 21: 5026-5035.
- Friedl P**, Hegerfeldt Y, Tusch M; Collective cell migration in morphogenesis and cancer; *Int J Dev Biol.*, 2004, 48: 441-449.
- Friedl P**, Wolf K; Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model; *J. Cell Biol.*, 2009, 88: 1–19.
- Fuchs M**, Hermannstädter C, Specht K, Knyazev P, Ullrich A, Rosivatz E, Busch R, Hutzler P, Höfler H, Lubert B; Effect of tumor-associated mutant E-cadherin variants with defects in exons 8 or 9 on matrix metalloproteinase 3; *J Cell Physiol.*, 2005, 20: 805-813.
- Fujita M**, Takeshita H, Sawa H; Cyclin E and CDK2 repress the terminal differentiation of quiescent cells after asymmetric division in *C. elegans*; *PLoS One.*, 2007, 2: e407.
- Fulton A M**; The chemokine receptors CXCR4 and CXCR3 in cancer; *Curr Oncol Rep.*, 2009; 11: 125-131.
- Gao X**, Sedgwick T, Shi Y B, Evans T; Distinct functions are implicated for the GATA-4, -5, and -6 transcription factors in the regulation of intestine epithelial cell differentiation; *Mol Cell Biol.*, 1998, 18: 2901-2911.
- Geisbrecht E R**, Montell D J; Myosin IV is required for E-cadherin-mediated border cell migration, *Nat Cell Biol.*, 2002, 4: 616-620.
- Geng Y**, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider J E, Bhattacharya S, Rideout W M, Bronson R T, Gardner H, Sicinski P; Cyclin E ablation in the mouse; *Cell.*, 2003, 114: 431-443.
- Ghazalpour A**, Bennett B, Petyuk V A, Orozco L, Hagopian R, Mungrue I N, Farber CR, Sinsheimer J, Kang H M, Furlotte N, Park C C, Wen P Z, Brewer H, Weitz K, Camp D G 2nd, Pan C, Yordanova R, Neuhaus I, Tilford C, Siemers N, Gargalovic P, Eskin E, Kirchgessner T, Smith DJ, Smith R D, Lusis A J; Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse; *PLoS Genet.*, 2011, 7: e1001393.
- Giard D J**, Aaronson S A, Todaro G J, Arnstein P, Kersey J H, Dosik H, Parks W P; In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors; *J Natl Cancer Inst.*, 1973, 51: 1417-1423.
- Giepmans B N**, Gap junctions and connexin-interacting proteins; *Cardiovasc Res.*, 2004, 62: 233–245.
- Gill R K**, Pant N, Saksena S, Singla A, Nazir T M, Vohwinkel L, Turner J R, Goldstein J, Alrefai W A, Dudeja P K; Function, expression, and characterization of the serotonin transporter in the native human intestine; *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2008, 294: G254-262.

- Glazer R I**, Wang X Y, Yuan H, Yin Y; Musashi1: a stem cell marker no longer in search of a function; *Cell Cycle*, 2008, 7: 2635-2639.
- Göke M N**, Cook J R, Kunert K S, Fini M E, Gipson I K, Podolsky D K; Trefoil peptides promote restitution of wounded corneal epithelial cells; *Exp Cell Res.*, 2001, 264: 337-344.
- Gomez-Mouton C**, Manes S; Establishment and maintenance of cell polarity during leukocyte chemotaxis; *Cell Adh Migr*, 2007, 1: 69-76.
- Gong Y**, Cui L, Minuk G Y; Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression in human hepatocellular carcinoma; *Hepatology*, 1996, 23: 734-737.
- Gordon P V**, Paxton J B, Fox N S; A methodology for distinguishing divergent cell fates within a common progenitor population: adenoma-and neuroendocrine-like cells are confounders of rat ileal epithelial cell (IEC-18) culture; *BMC Cell Biol.*, 2005, 6 :2-13.
- Grafi G**; How cells dedifferentiate: a lesson from plants; *Dev Biol.*, 2004, 268: 1-6.
- Graness A**, Chwieralski C E, Reinhold D, Thim L, Hoffmann W; Protein kinase C and ERK activation are required for TFF-peptide-stimulated bronchial epithelial cell migration and tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secretion; *J Biol Chem.*, 2002, 277: 18440-18446.
- Greenhalgh D G**; The role of apoptosis in wound healing; *Int J Biochem Cell Biol.*, 1998, 30: 1019-1030.
- Greenwood-Van Meerveld B**, Venkova K, Connolly K; Efficacy of repifermin (keratinocyte growth factor-2) against abnormalities in gastrointestinal mucosal transport in a murine model of colitis; *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55: 67-75.
- Gross I**, Duluc I, Benameur T, Calon A, Martin E, Brabletz T, Kedinger M, Domon-Dell C, Freund J-N; The intestine- specific homeobox gene *CDX2* decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells; *Oncogene*, 2008, 27: 107-115.
- Grossmann J**, Walther K, Artinger M, Rümmele P, Woenckhaus M, Schölerich J; Induction of apoptosis before shedding of human intestinal epithelial cells; *Am J Gastroenterol.*, 2002, 97: 1421-1428.
- Guan X**, Karpen H E, Stephens J, Bukowski J T, Niu S, Zhang G, Stoll B, Finegold MJ, Holst J J, Hadsell D, Nichols B L, Burrin DG; GLP-2 receptor localizes to enteric neurons and endocrine cells expressing vasoactive peptides and mediates increased blood flow; *Gastroenterology*, 2006, 130: 150-164.
- Gupta B P**; Chaffer C L, Weinberg R A; Cancer stem cells: mirage or reality?; *Nat Med.*, 2009, 15: 1010-1012.
- Hafner C**, Meyer S, Hagen I, Becker B, Roesch A, Landthaler M, Vogt T; Ephrin-B reverse signaling induces expression of wound healing associated genes in IEC-6 intestinal epithelial cells; *World J Gastroenterol.*, 2005, 11: 4511-4518.
- Hanisich F G**, Ragge H, Kalinski T, Meyer F, Kalbacher H, Hoffmann W; Human gastric TFF2 peptide contains an N-linked fucosylated N,N'-diacetyllactosamine (LacdiNAc) oligosaccharide; submitted: *Glycobiology*, 2012
- Hauser F**, Poulson R, Chinery R, Rogers L A, Hanby A M, Wright NA, Hoffmann W; 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.*, 1993, 90: 6961-6965.
- Hay E D**; An overview of epithelio-mesenchymal transformation; *Acta Anat.*, 1995; 154: 8-20.
- He J** and Bazan H E P; Epidermal Growth Factor Synergism with TGF- β 1 via PI-3 Kinase Activity in Corneal Keratocyte Differentiation; *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2008, 49: 2936-2945.
- Heller F**, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke J D; Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution; *Gastroenterology*, 2005, 129: 550-564.
- Henn A**, Lund S, Hedtjörn M, Schrattenholz A, Pörzgen P, Leist M; The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation; *ALTEX.*, 2009; 26: 83-94.
- Henson P M** and Hume D A; Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis; *Trends Immunol*, 2006, 5: 244-250.
- Hinz M**, Schwegler H, Chwieralski CE, Laube G, Linke R, Pohle W, Hoffmann W; Trefoil factor family (TFF) expression in the mouse brain and pituitary: changes in the developing cerebellum; *Peptides*, 2004, 5: 827-832.
- Hirota M**, Awatsuji H, Furukawa Y, Hayashi K; Cytokine regulation of PS2 gene expression in mouse astrocytes; *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1994, 33: 515-520.
- Hirota M.**, Awatsuji H., Sugihara Y., Miyashita S., Furukawa Y. and Hayashi K; Expression of pS2 gene in rat-brain; *Biochem. Mol. Biol.*, 1995, 35: 1079-1084.
- Hoffmann W**, Jagla W, Wiede A; Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain; *Histol Histopathol.*, 2001, 16: 319-334.
- Hoffmann W**; Stem cells, self-renewal and cancer of the gastric epithelium; *Curr Med Chem.*, 2012, 19: 5975-5983.
- Hoffmann W**; TFF Peptides; Handbook of Biologically Active Peptides; <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00182-2>, 2013, Elsevier Inc.
- Hoffmann W**; Trefoil factor family (TFF) peptides and chemokine receptors: a promising relationship; *J Med Chem.*, 2009, 52: 6055-6510.
- Hoffmann W**; Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution; *Cell Mol Life Sci.*, 2005, 62: 2932-2938
- Holmberg J**, Genander M, Halford M M, Anneren C, Sondell M, Chumley M J, Silvany R E, Henkemeyer M, Frisen J; EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche; *Cell*, 2006, 125: 1151-1163,

- Hood J D** and **Cheresh D A**; Role of integrins in cell invasion and migration; *Nature Reviews, Cancer*, 2002, 2: 91-100.
- Horiguchi K**, **Sakamoto K**, **Koinuma D**, **Semba K**, **Inoue A**, **Inoue S**, **Fujii H**, **Yamaguchi A**, **Miyazawa K**, **Miyazono K**, **Saitoh M**; TGF- β drives epithelial-mesenchymal transition through δ EF1-mediated downregulation of ESRP; *Oncogene*, 2011, doi: 10.1038/onc.2011.493.
- Hou R**, **Liu L**, **Anees S**, **Hiroyasu S**, **Sibinga N E**; The Fat1 cadherin integrates vascular smooth muscle cell growth and migration signals; *J Cell Biol.*, 2006, 173: 417-429.
- Hsia H C**, **Schwarzbauer J E**; Meet the tenascins: multifunctional and mysterious; *J Biol Chem.*, 2005, 280: 26641-26644.
- Huang H**, **He X**; Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights; *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20: 119–125.
- Huber M A**; **Kraut N**, **Beug H**. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression; *Curr Opin Cell Biol.*, 2005, 17: 548-558.
- Huber O**; Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease; *Cell. Mol. Life Sci.*, 2003, 60: 1872-1890.
- Illman S A**, **Lehti K**, **Keski-Oja J**, **Lohi J**; Epilysin (MMP-28) induces TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells; *J Cell Sci.*, 2006, 119: 3856-3865.
- Ivaska J**; Vimentin: Central hub in EMT induction?; *Small Gtpases*, 2011, 2: 51-53.
- Jagla W**, **Wiede A**, **Dietzmann K**, **Rutkowski K**, **Hoffmann W**; Co-localization of TFF3 peptide and oxytocin in the human hypothalamus; *FASEB J.*, 2000, 14: 1126-1131.
- Jechlinger M**, **Grunert S**, **Tamir I H**, **Janda E**, **Lüdemann S**, **Waerner T**, **Seither P**, **Weith A**, **Beug H**, **Kraut N**; Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression; *Oncogene*, 2003, 22: 7155- 7169.
- Jensen J**, **Pedersen E E**, **Galante P**, **Hald J**, **Heller R S**, **Ishibashi M**, **Kageyama R**, **Guillemot F**, **Serup P**, **Madsen O D**; Control of endodermal endocrine development by Hes-1; *Nat Genet.*, 2000, 24: 36–44.
- Jian P**, **Yanfang T**, **Zhuan Z**, **Jian W**, **Xueming Z**, **Jian N**; MMP28 (epilysin) as a novel promoter of invasion and metastasis in gastric cancer; *BMC Cancer.*, 2011, 11: 200.
- Jones B A**, **Gores G J**; Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine; *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*; 1997, 273: 1174-1188.
- Kageyama R**, **Ohtsuka T**, **Tomita K**; The bHLH gene Hes1 regulates differentiation of multiple cell types; *Mol Cells.*, 2000, 10: 1-7.
- Kalluri R**, **Weinberg R A**; The basics of epithelial-mesenchymal transition; *J Clin Invest.*, 2009, 119: 1420-1428.
- Kato K**, **Chen M C**, **Nguyen M**, **Lehmann F S**, **Podolsky D K**, **Soll A H**; Effects of growth factors and trefoil peptides on migration and replication in primary oxyntic cultures; *Am J Physiol.*, 1999, 276: G1105-1516.
- Katoh M**; Trefoil factors and human gastric cancer (review); *Int J Mol Med.*, 2003, 12: 3-9.
- Katz J P**, **Perreault N**, **Goldstein B G**, **Lee C S**, **Labosky P A**, **Yang V W**, **Kaestner K H**; The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon; *Development*, 2002, 129: 2619-2628.
- Kayahara T**, **Sawada M**, **Takaishi S**, **Fukui H**, **Seno H**, **Fukuzawa H**, **Suzuki K**, **Hiai H**, **Kageyama R**, **Okano H**, **Chiba T**; Candidate markers for stem and early progenitor cells. Musashi-1 and Hes1 are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine; *FEBS Lett.*, 2003, 535: 131-135.
- Kedinger M**, **Simon-Assmann P M**, **Lacroix B**, **Marxer A**, **Hauri H P**, **Haffen K**; Fetal gut mesenchyme induces differentiation of cultured intestinal endodermal and crypt cells; *Dev Biol.*, 1986, 113: 474-483.
- Kedinger M**, **Simon-Assmann P**, **Haffen K**; Growth and differentiation of intestinal endodermal cells in a coculture system; *Gut*. 1987, 28 Suppl: 237-241.
- Kim K K**, **Kugler M C**, **Wolters P I**, **Robillard L**, **Galvez M G**, **Brumwell A N**, **Sheppard D**, **Chapman H A**; Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, 103: 13180–13185.
- Kirfel G**, **Rigor A**, **Born B**, **Herzog v**; Cell migration: mechanisms of rear detachment and the formation of migration tracks; *Eur J Cell Biol.*, 2004, 83: 717-724.
- Klemke R L**, **Cai S**, **Giannini A L**, **Gallagher P J**, **de Lanerolle P**, **Cheresh D A**; Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase; *J Cell Biol.*, 1997, 137: 481-492.
- Koch S**, **Capaldo C T**, **Samarin S**, **Nava P**, **Neumaier I**, **Skerra A**, **Sacks D B**, **Parkos C A**, **Nusrat A**; Dkk-1 Inhibits Intestinal Epithelial Cell Migration by Attenuating Directional Polarization of Leading Edge Cells; *Mol Biol Cell.*, 2009, 20: 4816-4825.
- Kosriwong K**, **Menheniott T R**, **Giraud A S**, **Jearanaikoon P**, **Sripa B**, **Limpaiboon T**; Trefoil factors: tumor progression markers and mitogens via EGFR/MAPK activation in cholangiocarcinoma; *World J Gastroenterol.*, 2011, 17: 1631-1641.
- Kouros-Mehr H**, **Bechis S K**, **Storach E M**, **Littlepage L E**, **Egeblad M**, **Ewald A J**, **Pai S Y**, **Ho I C**, **Werb Z**; GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model; *Cancer Cell.*, 2008, 13: 141-152.
- Kouznetsova I**, **Kalinski T**, **Meyer F**, **Hoffmann W**; Self-renewal of the human gastric epithelium: new insights from expression profiling using laser microdissection; *Mol Biosyst.*, 2011, 7: 1105-1112.
- Kouznetsova I**, **Laubinger W**, **Kalbacher H**, **Kalinski T**, **Meyer F**, **Roessner A**, **Hoffmann W**; Biosynthesis of gastrokine-2 in the human gastric mucosa: restricted spatial expression along the antral gland axis and differential interaction with TFF1, TFF2 and mucins; *Cell Physiol Biochem.*, 2007, 20: 899-908.

- Kouznetsova I**, Peitz U, Vieth M, Meyer F, Vestergaard E M, Malfertheiner P, Roessner A, Lippert H, Hoffmann W; A gradient of TFF3 (trefoil factor family 3) peptide synthesis within the normal human gastric mucosa; *Cell Tissue Res.*, 2004, 316: 155-165.
- Kuang H B**, Miao C L, Peng S, Cao Y J, Duan E K; Dickkopf-1 enhances migration of HEK293 cell by beta-catenin/E-cadherin degradation; *Front Biosci.*, 2009, 14: 2212-2220.
- Kucharzik T**, Lügering N, Schmid K W, Schmidt M A, Stoll R, Domschke W; Human intestinal M cells exhibit enterocyte-like intermediate filaments; *Gut*, 1998, 42: 54-62.
- Kuniyasu H**, Ellis L M, Evans D B, Abbruzzese J L, Fenoglio C J, Bucana C D, Cleary K R, Tahara E and Fidler I J; Relative expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts disease outcome in patients with resectable pancreatic carcinoma; *Clin Cancer Res.*, 1999, 5: 25-33.
- Kuniyasu H**, Ukai R, Johnston D, Troncoso P, Fidler I J and Pettaway C A; The relative mRNA expression levels of matrix metalloproteinase to E-cadherin in prostate biopsy specimens distinguishes organ-confined from advanced prostate cancer at radical prostatectomy; *Clin Cancer Res.*, 2003, 9: 2185-2194.
- Kurokawa M**, Lynch K, Podolsky D K. Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor beta inhibits proliferation and stimulates differentiation; *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, 142: 775-782.
- Kurt-Jones E A**, Cao LC, Sandor F, Rogers A B, Whary M T, Nambiar P R, Cerny A, Bowen G, Yan J, Takaishi S, Chi AL, Reed G, Houghton J M, Fox J G, Wang T C; Trefoil family factor 2 is expressed in murine gastric and immune cells and controls both gastrointestinal inflammation and systemic immune responses; *Infect Immun.*, 2007, 75: 471-480.
- Lämmli U K**; Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- Lan L**, Hayes C S, Laury-Kleintop L, Gilmour S K; Suprabasal induction of ornithine decarboxylase in adult mouse skin is sufficient to activate keratinocytes; *J Invest Dermatol.*, 2005, 124: 602-641.
- Lee A Y**, He B, You L, Xu Z, Mazieres J, Reguart N, Mikami I, Batra S, Jablons D M; Dickkopf-1 antagonizes Wnt signaling independent of beta-catenin in human mesothelioma; *Biochem Biophys Res Commun.*, 2004, 323: 1246-1250.
- Lee H S**, Daar I O; EphrinB reverse signaling in cell-cell adhesion: is it just par for the course? *Cell Adh Migr.*, 2009, 3: 250-255.
- Lee J M**, Dedhar S, Kalluri R, Thompson E W; The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease; *J Cell Biol.*, 2006, 172: 973-981.
- Lefebvre O**, Chenard MP, Masson R, Linares J, Dierich A, LeMeur M, Wendling C, Tomasetto C, Chambon P, Rio M C; Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein; *Science.*, 1996, 274: 259-262.
- Li D Q**, Shang T Y, Kim H S, Solomon A, Lokeshwar B L, Pflugfelder S C; Regulated expression of collagenases MMP-1, -8, and -13 and stromelysins MMP-3, -10, and -11 by human corneal epithelial cells; *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2003, 44: 2928-2936.
- Li F**, Huang Q, Chen J, Peng Y, Roop D R, Bedford J S, Li C-Y; Apoptotic Cells Activate the "Phoenix Rising" Pathway to Promote Wound Healing and Tissue Regeneration; *Sciencesignaling.*, 2010, 3: ra13.
- Li Z**, Wang C, Prendergast G C, Pestell R G; Cyclin D1 functions in cell migration; *Cell Cycle*, 2006, 5: 2440-2442.
- Liang Z**, Wu H, Reddy S, Zhu A, Wang S, Blevins D, Yoon Y, Zhang Y, Shim H; Blockade of invasion and metastasis of breast cancer cells via targeting CXCR4 with an artificial microRNA; *Biochem Biophys Res Commun.*, 2007, 363: 542-546.
- Lieber M**, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G; A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells; *Int J Cancer.*, 1976, 17: 62-70.
- Lieberman J**, Fan Z; Nuclear war: the granzyme A-bomb; *Curr Opin Immunol*, 2003, 15: 553-559.
- Lin T J**, Issekutz T B, Marshall J S; Human mast cells transmigrate through human umbilical vein endothelial monolayers and selectively produce IL-8 in response to stromal cell-derived factor-1 alpha; *J Immunol.*, 2000, 165: 211-220.
- Liu H B**, Hu Y S, Medcalf R L, Simpson R W, Dear A E; Thiazolidinediones inhibit TNFalpha induction of PAI-1 independent of PPARgamma activation; *Biochem Biophys Res Commun.*, 2005, 334: 30-37.
- Liu Y**, Qin L, Li G, Zhang W, An L, Liu B, Hong J S; Dextromethorphan protects dopaminergic neurons against inflammation-mediated degeneration through inhibition of microglial activation; *J Pharmacol Exp Ther.*, 2003, 305: 212-218.
- Lohi J**, Wilson C L, Roby J D, Parks W C; Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury; *J Biol Chem.*, 2001, 276: 10134-10144.
- Loncar M B**, Al-azze E D, Sommer P S, Marinovic M, Schmehl K, Kruschewski M, Blin N, Stohwasser R, Gött P, Kayadmir T; Tumour necrosis factor alpha and nuclear factor kappaB inhibit transcription of human TFF3 encoding a gastrointestinal healing peptide; *Gut.*, 2003, 52: 1297-1303.
- Longman R J**, Poulosom R, Corfield A P, Warren B F, Wright N A, Thomas M G; Alterations in the composition of the supramucosal defense barrier in relation to disease severity of ulcerative colitis; *J Histochem Cytochem.*, 2006, 54: 1335-1348.
- Lorger M**, Moellig K; Regulation of epithelial wound closure and intercellular adhesion by interaction of AF6 with actin cytoskeleton; *J Cell Sci.*, 2006, 119: 3385-3398.
- Lu X**, Ma L, Ruan L, Kong Y, Mou H, Zhang Z, Wang Z, Wang JM, Le Y; Resveratrol differentially modulates inflammatory responses of microglia and astrocytes; *J Neuroinflammation.*, 2010, 7: 46. doi: 10.1186/1742-2094-7-46.
- MacDermott R P**; Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*, 1996; 31: 907-916.

- Maddugoda** M P, Crampton M S, Shewan A M, Yap A S; Myosin VI and vinculin cooperate during the morphogenesis of cadherin cell cell contacts in mammalian epithelial cells; *J Cell Biol.*, 2007, 178: 529-540.
- Madsen** J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L, Holmskov U; Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3, *J Histochem Cytochem.*, 2007, 5: 505-513.
- Manes** S, Viola A; Lipid rafts in lymphocyte activation and migration; *Mol Membr Biol.*, 2006; 23: 59–69.
- Mao** B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Gliinka A, Niehrs C; Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling; *Nature*, 2002, 417: 664-667.
- Maschler** S, Grunert S, Danielopol A, Beug H, Wirtl G; Enhanced tenascin-C expression and matrix deposition during Ras/TGF-beta-induced progression of mammary tumor cells; *Oncogene*, 2004, 23: 3622-3633.
- Mashimo** H, Wu D C, Podolsky D K, Fishman M C; Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor; *Science.*, 1996, 274: 262-265.
- Masszi** A, Di Ciano C, Sirokmány G, Arthur W T, Rotstein O D, Wang J, McCulloch C A G, Rosivall L, Mucsi I, Kapus A; Central role for Rho in TGF- β 1-induced α -smooth muscle actin expression during epithelialmesenchymal transition; *Am J Physiol.*, 2003, 284: F911-F924.
- Matsuda** Y, Semba S, Ueda J, Fuku T, Hasuo T, Chiba H, Sawada N, Kuroda Y, Yokozaki H; Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric carcinoma; *Cancer Sci.*, 2007, 98:1014-1019.
- Mattila** P K and Lappalainen P; Filopodia: molecular architecture and cellular functions, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9: 446-454.
- Mayer** A K, Muehmer M, Mages J, Gueinzus K, Hess C, Heeg K, Bals R, Lang R, Dalpke A H; Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells; *J Immunol.*, 2007, 178: 3134-3142.
- McCormack** S A, Johnson L R; Polyamines and cell migration; *J Physiol Pharmacol.*, 2001, 52: 327-349.
- McCormack** S A, Viar M J, Johnson L R; Migration of IEC-6 cells: a model for mucosal healing; *Am J Physiol.*, 1992, 263: 426-435.
- McGuckin** M A, Lindén S K, Sutton P, Florin T H; Mucin dynamics and enteric pathogens; *Nat Rev Microbiol.*, 2011, 9: 265-278.
- Mehrad** B, Burdick M D, Strieter R M; Fibrocyte CXCR4 regulation as atherapeutic target in pulmonary fibrosis; *Int J Biochem Cell Biol.*, 2009, 41: 1708-1718.
- Meyer zum Büschenfelde** D, Hoschützky H, Tauber R, Huber O; Molecular mechanisms involved in TFF3 peptide-mediated modulation of the E-cadherin/catenin cell adhesion complex; *Peptides.*, 2004, 25: 873-883.
- Meyer zum Büschenfelde** D, Tauber R, Huber O; TFF3-peptide increases transepithelial resistance in epithelial cells by modulating claudin-1 and -2 expression; *Peptides.*, 2006, 27: 3383-3390.
- Midwood** K S, Orend G; The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis; *J Cell Commun Signal.*, 2009, 3: 287-310.
- Molenaar** J J, Ebus M E, Koster J, Santo E, Geerts D, Versteeg R, Caron H N; Cyclin D1 is a direct transcriptional target of GATA3 in neuroblastoma tumor cells; *Oncogene*, 2010, 29: 2739-2745.
- Mollenhauer** J, End C, Renner M, Lyer S; Poustka A; DMBT1 as an archetypal link between infection, inflammation, and cancer; *Inmunologia.*, 2007, 26: 193-209.
- Montcouquiol** M, Crenshaw III E B, Kelley M W; Noncanonical Wnt-Signaling and Neural Polarity; *Annu. Rev. Neurosci.*, 2006, 29: 363–386.
- Moolenaar** W H; Lysophosphatidic acid signaling; *Curr Opin Cell Biol*, 1995; 7: 203-210.
- Moore** K A, Lemischka I R; Stem cells and their niches; *Science*, 2006 311: 1880-1885.
- Morata** G, Shlevkov E, Pérez-Garijo E; Mitogenic signaling from apoptotic cells in Drosophila; *Develop. Growth Differ.*, 2011, 53: 168-176.
- Morell-Quadreny** L, Rubio J, Lopez-Guerrero J A, Casanova J, Ramos D, Iborra I, Solsona E, Llombart-Bosch A; Disruption of basement membrane, extracellular matrix metalloproteinases and E-cadherin in renal-cell carcinoma; *Anticancer Res.*, 2003, 23: 5005-5010.
- Moreno-Bueno** G, Cubillo E, Sarrió D, Peinado H, Rodríguez-Pinilla S M, Villa S, Bolós V, Jordá M, Fabra A, Portillo F, Palacios J, Cano A; Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition; *Cancer Res.*, 2006, 66: 9543-9556..
- Moreno-Bueno** G, Portillo F, Cano A; Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer; *Oncogene*, 2008, 27: 6958-6969
- Moses** H L, Arteaga C L , Alexandrow M G, Dagnino L. Kawabata M, Poerke D F Jr, Serra R; TGF beta regulation of cell proliferation; *J Cell Physiol.*, 1987 Suppl., 5: 1-7.
- Motoshita** J, Nakayama H, Taniyama K, Matsusaki K, Yasui W; Molecular characteristics of differentiated-type gastric carcinoma with distinct mucin phenotype: LI-cadherin is associated with intestinal phenotype; *Path Int.*, 2006; 56: 200-205.
- Murai** K K, Pasquale E B; 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk; *J Cell Sci.*, 2003, 116: 2823-2832.
- Nakagawa** T, Li J H, Garcia G, Mu W, Piek E, Böttinger E P, Chen Y, Zhu H J, Kang D H, Schreiner G F, Lan H Y, Johnson R J; TGF-beta induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct Smad pathways; *Kidney Int.*, 2004, 66: 605-613.

- Nawrocki-Raby** B, Gilles C, Polette M, Martinella-Catusse C, Bonnet N, Puchelle E, Foidart J M, Van Roy F, Birembaut P; E-Cadherin mediates MMP down-regulation in highly invasive bronchial tumor cells; *Am J Pathol.*, 2003, 163: 653-661.
- Niehrs** C; Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators; *Oncogene*, 2006, 25: 7469-7481.
- Nikolaidis** N M, Zimmermann N, King N E, Mishra A, Pope S M, Finkelman F; Trefoil factor-2 is an allergen-induced gene regulated by Th2 cytokines and STAT6 in the lung; *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2003, 29: 458-464.
- Nishimura** S, Wakabayashi N, Toyoda K, Kashima K, Mitsufuji S; Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium; *Dig Dis Sci.*, 2003, 48: 1523-1529.
- Nollet F, Berx G, van Roy F; The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer; *Mol Cell Biol Res Commun.*, 1999, 2: 77-85.
- Oberholzer** M J; Pathologie verstehen: Molekulare Grundlagen der allgemeinen Pathologie; Georg Thieme Verlag Stuttgart 2001; ISBN 978-3-13-129041-0
- Odorico** J S, Kaufman D S, Thomson J A; Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines; *Stem Cells*, 2001, 19: 193-204.
- Oertel** M, Graness A, Thim L, Bühling F, Kalbacher H, Hoffmann W; Trefoil factor family-peptides promote migration of human bronchial epithelial cells: synergistic effect with epidermal growth factor; *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 2001, 25: 418-424.
- Oh** S B, Tran P B, Gillard S E, Hurley R W, Hammond D L, Miller R J; Chemokines and glycoprotein120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons; *J Neurosci.*, 2001, 21: 5027-5035.
- Okamoto** R, Epithelial regeneration in inflammatory bowel diseases; *Inflammation and Regeneration*, 2011, 3: 275-281.
- Oliveira** S S, Morgado-Diaz J A; Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer; *Cell Mol Life Sci.*, 2007; 64: 17-28.
- Orime** K, Shirakawa J, Nakamura A, Tajima K, Togashi Y, Terauchi Y; Trefoil Factor 2 Promotes Cell Proliferation in Pancreatic B Cells Through a Cxcr4-Mediated Erk1/2 Pathway ; 72nd Scientific Sessions, American Diabetes Association; 2012, Poster Abstract No: 2081-P.
- Orme** M H, Giannini A L, Vivanco M D, Kypta R M; Glycogen synthase kinase-3 and Axin function in a beta-catenin-independent pathway that regulates neurite outgrowth in neuroblastoma cells; *Mol Cell Neurosci.*, 2003, 24: 673-686.
- Oskarsson** T, Acharyya S, Zhang X H, Vanharanta S, Tavazoie S F, Morris P G, Downey R J, Manova-Todorova K, Brogi E, Massagué J; Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs; *Nat Med.*, 2011, 17: 867-874.
- Paulsen** F P, Woon CW, Varoga D, Jansen A, Garreis F, Jäger K, Amm M, Podolsky D K, Steven P, Barker N P, Sel S; Intestinal trefoil factor/TFF3 promotes re-epithelialization of corneal wounds; *J Biol Chem.*, 2008, 283: 13418-13427.
- Paunel-Görgülü** A N, Franke A G, Paulsen F P, Dünker N; Trefoil factor family peptide 2 acts pro-proliferative and pro-apoptotic in the murine retina; *Histochem Cell Biol.*, 2011, 135: 461-473.
- Pawar** S, Kartha S, Toback F G; Differential gene expression in migrating epithelial cells after wounding; *J Cell Physiol.*, 1995, 165: 556-565.
- Pearson** G, Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B E, Karandikar M, Berman K, Cobb M H; Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions; *Endocr Rev.*, 2001, 22: 153-183.
- Peinado** H, Olmeda D, Cano A; Snail, ZEB and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?; *Nat Rev Cancer*, 2007; 7: 415-428.
- Perreault** N, Beaulieu J F; Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells; *Exp Cell Res.*, 1998, 245: 34-42.
- Pieper** F R, Van de Klundert F A, Raats J M, Henderik J B, Schaart G, Ramaekers F C, Bloemendal H; Regulation of vimentin expression in cultured epithelial cells; *Eur J Biochem.*, 1992, 210: 509-519.
- Pillai** S B, Turman M A, Besner G E; Heparin-binding EGF-like growth factor is cytoprotective for intestinal epithelial cells exposed to hypoxia; *J Pediatr Surg.*, 1998, 33: 973-979.
- Pollard** T D, Borisy G G; Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments; *Cell*, 2003, 112: 453-465.
- Potten** C S, Booth C, Pritchard D M; The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor; *Int J Exp Pathol*, 1997, 78: 219-243.
- Potten** C S; Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Phil Trans R Soc Lond B.*, 1998; 353: 821-830.
- Poulsen** S S, Kissow H, Hare K, Hartmann B, Thim L; Luminal and parenteral TFF2 and TFF3 dimer and monomer in two models of experimental colitis in the rat; *Regul Pept.*, 2005, 126: 163-171.
- Probst** J C, Zetzsche T, Weber M, Theilemann P, Skutella T, Landgraf R, Jirikowski G F; Human intestinal trefoil factor is expressed in human hypothalamus and pituitary – evidence for a novel neuropeptide; *FASEB J.*, 1996,10: 1518-1523.
- Probst** J C.,Skutella T, Mullerschmid A, Jirikowski G F, Hoffmann W; Molecular and cellular analysis of rP1.B in the rat hypothalamus – in situ hybridization and immunohistochemistry of a new P-domain neuropeptide; *Mo. Brain Res.*, 1995, 33: 269-276.
- Providence** K M, Higgins P J.; PAI-1 expression is required for epithelial cell migration in two distinct phases of in vitro wound repair.; *J Cell Physiol.*, 2004, 200: 297-308

- Pull S L**, Doherty J M, Mills J C, Gordon J I, Stappenbeck T S; Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury; *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2005, 102: 99–104.
- Punturieri A**, Filippov S, Allen E, Caras I, Murray R, Reddy V, Weiss S J; Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages; *J Exp Med.* 2000, 192: 789-799.
- Qi L**, Sun B, Liu Z, Li H, Gao J, Leng X; Dickkopf-1 inhibits epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cells and contributes to colon cancer suppression; *Cancer Sci.*, 2012, 103: 828-835.
- Qi M** and Elion E A; MAP kinase pathways; *J Cell Sci.*, 2005, 118: 3569-3572.
- Qin L**, Wu X, Block M L, Liu Y, Breese G R, Hong J S, Knapp D J, Crews F T; Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration; *Glia.*, 2007, 55: 453-462.
- Qin X**, Zhang H, Zhou X, Wang C, Zhang H, Zhang X, Ye L; Proliferation and migration mediated by Dkk1/Wnt/ β -Catenin cascade in a model of hepatocellular carcinoma cells; *Transl Res.*, 2007, 150: 281-294.
- Qiu R**, Wang X, Davy A, Wu C, Murai K, Zhang H, Flanagan J G, Soriano P, Lu Q; Regulation of neural progenitor cell state by ephrin-B; *J Cell Biol.*, 2008, 181: 973-83.
- Quaroni A**, Isselbacher K J; Cytotoxic effects and metabolism of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in duodenal and ileal epithelial cell cultures; *J Natl Cancer Inst.*, 1981, 67:1353-1362.
- Quaroni A**, Wands J, Trelstad R L, Isselbacher K J; Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria; *J Cell Biol.*, 1979, 80: 248-265.
- Rakoff-Nohoum S**, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R; Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors is required for Intestinal Homeostasis; *Cell*, 2004, 118: 229-241.
- Ray R M**, McCormack S A, Covington C, Viar M J, Zheng Y, Johnson L R; The requirement for polyamines for intestinal epithelial cell migration is mediated through Rac1; *J Biol Chem.*, 2003, 278: 13039-13046.
- Reddel R R**, Ke Y, Gerwin B I, McMenamin M G, Lechner J F, Su R T, Brash D E, Park J B, Rhim J S, Harris C C; Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes; *Cancer Res.*, 1988, 48: 1904-1909.
- Reinecker H C**, MacDermott R P, Mirau S, Dignass A, Podolsky D K; Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15; *Gastroenterology*, 1996, 111: 1706-1713.
- Renner U**, Lohrer P, Schaaf L, Feirer M, Schmitt K, Onofri C, Arzt E, Stalla G K; Transforming growth factor-beta stimulates vascular endothelial growth factor production by folliculostellate pituitary cells; *Endocrinology*, 2002, 143: 3759-3765.
- Riahi R**, Yang Y, Zhang D D, Wong P K; Advances in wound-healing assays for probing collective cell migration; *J Lab Autom.*, 2012, 17: 59-65.
- Rieder F**, Brenmoehl J, Leeb S, Schölmerich J, Rogler G; Wound healing and fibrosis in intestinal disease; *Gut*, 2007, 56: 130-139.
- Rodgers U R**, Kevorkian L, SurrIDGE A K, Waters J G, Swingler T E, Culley K, Illman S, Lohi J, Parker A E, Clark I M; Expression and function of matrix metalloproteinase (MMP)-28; *Matrix Biol.*, 2009, 28: 263-272.
- Rodrigues S**, Van Aken E, Van Bocxlaer S, Attoub S, Nguyen Q D, Bruyneel E; Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling; *FASEB J.*, 2003, 17: 7-16.
- Rodriguez L G**, Wu X, Guan J L; Wound-healing assay; *Methods Mol Biol.*, 2005; 294: 23-29.
- Röhrs S**, Kutzner N, Vlad A, Grunwald T, Ziegler S, Müller O; Chronological expression of Wnt target genes Ccnd1, Myc, Cdkn1a, Tfr3, Plf1 and Ramp3; *Cell Biol Int.*, 2009, 33: 501-508.
- Roskoski R Jr**; Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression; *Crit Rev Oncol Hematol.*, 2007, 62: 179-213.
- Rösler S**, Haase T, Claassen H, Schulze U, Schicht M, Riemann D, Brandt J, Wohlrab D, Müller-Hilke B, Goldring M B, Sel S, Varoga D, Garreis F, Paulsen F P; Trefoil factor 3 is induced during degenerative and inflammatory joint disease, activates matrix metalloproteinases, and enhances apoptosis of articular cartilage chondrocytes; *Arthritis Rheum.*, 2010, 62: 815-825.
- Rowland B D**, Peeper D S; KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6: 11–23.
- Ruiz C**, Huang W, Hegi M E, Lange K, Hamou M F, Fluri E, Oakeley E J, Chiquet-Ehrismann R, Orend G; Growth promoting signaling by tenascin-C [corrected]; *Cancer Res.*, 2004 Oct 15;64(20):7377-85.
- Saarialho-Kere U**, Kerkela E, Jähkola T, Suomela S, Keski-Oja J, Lohi J. Epilysin MMP-28 expression is associated with cell proliferation during epithelial repair; *J Invest Dermatol.*, 2002: 119: 14–21.
- Saijo K**, Glass C K; Microglial cell origin and phenotypes in health and disease; *Nat Rev Immunol.*, 2011, 11: 7757-7787.
- Salvi S**, Semper A, Blomberg A, Holloway J, Jaffar Z, Papi A, Teran L, Polosa R, Kelly F, Sandström T, Holgate S, Frew A; Interleukin-5 production by human airway epithelial cells; *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 1999, 20: 84-91.
- Sanderson I R**, Ezzell R M, Kedinger M, Erlanger M, Xu Z X, Pringault E, Leon-Robine S, Louvard D, Walker W A; Human fetal enterocytes in vitro: modulation of the phenotype by extracellular matrix; *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1996, 93: 7717-7722.
- Sangiorgi E**, Capecchi M R.; Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells; *Nature Genetics*, 2008, 40: 915-920.
- Sarosiek J**, McCallum R W.; Mechanisms of oesophageal mucosal defence; *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol.*, 2000, 14: 701-717.

- Sato T**, van E J, Snippert H J, Stange D E, Vries R G, van den Born M, Barker N, Shroyer N F, van de Wetering M; Clevers H; Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts; *Nature.*, 2011, 469 :415-418.
- Savagner P**, Kusewitt D F, Carver E A, Magnino F, Choi C, Gridley T, Hudson LG; Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes; *J Cell Physiol*, 2005; 202: 858-866.
- Savagner P**; The epithelial–mesenchymal transition (EMT) Phenomenon; *Annals of Oncology*, 2010, (Supplement 7): 89-92.
- Schlaepfer D D**, Hou S, Lim S T, Tomar A, Yu H, Lim Y, Hanson D A, Uryu S A, Molina J, Mitra S K; Tumor necrosis factor-alpha stimulates focal adhesion kinase activity required for mitogen-activated kinase-associated interleukin 6 expression; *J Biol Chem.*, 2007, 282: 17450-17459.
- Schulze U**, Sel S, Paulsen F P; Trefoil factor family peptide 3 at the ocular surface. A promising therapeutic candidate for patients with dry eye syndrome?; *Dev Ophthalmol.*, 2010, 45 : 1-11.
- Scott K A**, Arnott C H, Robinson S C, Moore R J, Thompson R G, Marshall J F, Balkwill F R; TNF-alpha regulates epithelial expression of MMP-9 and integrin alphavbeta6 during tumour promotion. A role for TNF-alpha in keratinocyte migration? *Oncogene*, 2004, 23: 6954-6966.
- Scoville D H**, Sato T, He X C, Li L; Current view: intestinal stem cells and signaling; *Gastroenterology*, 2008, 134: 849-864.
- Sei Y**, Lu X, Liou A, Zhao X, Wank S A; A stem cell marker-expressing subset of enteroendocrine cells resides at the crypt base in the small intestine; *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2011, 300: G345-356.
- Seiler N**, Raul F; Polyamines and the intestinal tract; *Crit Rev Clin Lab Sci.*, 2007, 44: 365-411.
- Sepich D S**, Usmani M, Pawlicki A, Solnicka-Krezel L; Wnt/PCP signaling controls intracellular position of MTOCs during gastrulation convergence and extension movements; *Development*, 2011, 138: 543-55.
- Shattil S J**, Kim C, Ginsberg M H; The final steps of integrin activation: the end game; *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2010, 11: 288-300.
- Shi Y**, Massagué J; Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus; *Cell*, 2003, 113: 685-700.
- Shin K**, Fogg V C, Margolis B; Tight junctions and cell polarity; *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 2006, 22: 207-235.
- Shintani T**, Fushiki T, Fukuoka S, Takahashi-Iwanaga H, Sugimoto E; Differentiation of intestinal epithelial cell line (IEC-18) by an acid extract of rat small intestine; *FEBS Lett.*, 1989, 255: 423-426.
- Silen W**, Ito, S; Mechanism for rapid-epithelialization of the gastric mucosal surface; *Annu. Rev. Physiol.*, 1985, 47: 217–229.
- Singh A B**, Harris R C; Epidermal growth factor receptor activation differentially regulates claudin expression and enhances transepithelial resistance in Madin-Darby canine kidney cells; *J Biol Chem.*, 2004, 279: 3543-3552.
- Sirover M A**; New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Biochim Biophys Acta.*, 1999, 1432: 159-184.
- Slager R E**, Allen-Gipson D S, Sammut A, Heires A, DeVasure J, Von Essen S, Romberger D J, Wyatt T A; Hog barn dust slows airway epithelial cell migration in vitro through a PKCalpha-dependent mechanism; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 2007, 293: 1469-1474.
- Smith H W**, Marshall C J; Regulation of cell signalling by uPAR; *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2010, 11: 23-36.
- Smith J M**, Johannesen P A, Wendt M K, Binion D G, Dwinell M B; CXCL12 activation of CXCR4 regulates mucosal host defense through stimulation of epithelial cell migration and promotion of intestinal barrier integrity; *Am J Physiol: Gastrointest Physiol.*, 2005, 288: 316-G326.
- Smith P K**, Krohn R I, Hermanson G T, Mallia A K, Gartner F H, Provenzano M D, Fujimoto E K, Goeke N M, Olson B J, Klenk D C; Measurement of protein using bicinchoninic acid; *Anal Biochem.*, 1985, 150: 76-85.
- Smoot D T**, Sewchand J, Young K, Desbordes B C, Allen C R, Naab T, A method for establishing primary cultures of human gastric epithelial cells; *Methods Cell Sci.*, 2000, 22: 133-136.
- Song L B**, Li J, Liao W T, Feng Y, Yu C P, Hu L J, Kong Q L, Xu L H, Zhang X, Liu W L, Li M Z, Zhang L, Kang T B, Fu L W, Huang W L, Xia Y F, Tsao S W, Li M, Band V, Band H, Shi Q H, Zeng Y X, Zeng M S; The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells; *J Clin Invest.*, 2009, 119: 3626-3636.
- Soubeyran P**, André F, Lissitzky J C, Vidal Mallo G, Moucadel V, Roccabianca M, Rechreche H, Marvaldi J, Dikic I, Dagorn JC, Iovanna J L; Cdx1 promotes differentiation in a rat intestinal epithelial cell line; *Gastroenterology*, 1999, 117: 1326-1338.
- Spurzem J**, Zhang J, Liu X D, Rennard S I, Romberger D V; Gene expression in an in vitro model of epithelial repair; *Chest.*, 2002, 121: 79S-80S
- Stappenbeck P S**, Miyoshi H; The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair; *Science*, 2009, 324: 1666-1669.
- Stich S**, Haag M, Häupl T, Sezer O, Notter M, Kaps C, Sittlinger M, Ringe J; Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells chemotactically induced with CXCL12; *Cell Tissue Res.*, 2009, 336: 225-236.
- Sturm A**, Dignass A U.; Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease, *World J Gastroenterol.*, 2008, 14: 348-353
- Sturm A**, Sudermann T, Schulte K M, Goebell H, Dignass A U; Modulation of intestinal epithelial wound healing in vitro and in vivo by lysophosphatidic acid; *Gastroenterology*, 1999, 117: 368-367.

- Suemori S**, Ciacci C, Podolsky D K; Regulation of transforming growth factor expression in rat intestinal epithelial cell lines; *J Clin Invest.*, 1991, 87: 2216-2221.
- Sugimoto K**, Gordon S P, Meyerowitz E M; Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol.*, 2011, 21: 212-218.
- Suh E**, Traber P G; An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation; *Mol Cell Biol.*, 1996, 16: 619-625.
- Swanson P**, Kumara A, Samarina S, Hansenc J, Nusrata A, and Neisha A S; Enteric commensal bacteria potentiate epithelial restitution via reactive oxygen species-mediated inactivation of focal adhesion kinase phosphatases, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 8803-8808.
- Szarvas T**, Dorp von F, Ergün S and Rübber H; Matrix metalloproteinases and their clinical relevance in urinary bladder cancer; *Nature Reviews, Urology*, 2011, 8: 241-254.
- Tan X D**, Chen Y H, Liu Q P, Gonzalez-Crussi F, Liu X L; Prostanoids mediate the protective effect of trefoil factor 3 in oxidant-induced intestinal epithelial cell injury: role of cyclooxygenase-2; *J Cell Sci.*, 2000, 113: 2149-2155.
- Taupin D**, Podolsky D K; Trefoil factors: initiators of mucosal healing; *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2003, 4: 721-732.
- Taupin D**, Wu D C, Jeon W K, Devaney K, Wang T C, Podolsky D K; The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor- and MAP kinase-dependent interregulation; *J Clin Invest.*, 1999, 103: R31-38.
- Tebbutt N C**, Giraud A S, Inglese M, Jenkins B, Waring P, Clay F J, Malki S, Alderman B M, Grail D, Hollande F, Heath J K, Ernst M. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice; *Nat. Med.*, 2002, 8: 1089–1097.
- Tézreault M P**, Chailier P, Rivard N, Ménard D; Differential growth factor induction and modulation of human gastric epithelial regeneration; *Exp Cell Res.*, 2005, 306: 285-297.
- Thim L**, Mørtz E; Isolation and characterization of putative trefoil peptide receptors; *Regul Pept.*, 2000, 90: 61-68.
- Thim L**, Norris K, Norris F, Nielsen P F, Bjørn S E, Christensen M, Petersen J; Purification and characterization of the trefoil peptide human spasmodic polypeptide (hSP) produced in yeast; *FEBS Lett.*, 1993, 318: 345-352.
- Thim L**, Wöldike H F, Nielsen P F, Christensen M, Lynch-Devaney K, Podolsky D K; Characterization of human and rat intestinal trefoil factor produced in yeast; *Biochemistry.*, 1995, 34: 4757-4764.
- Todorović V**, Desai B V, Patterson M J, Amargo E V, Dubash A D, Yin T, Jones J C, Green K J; Plakoglobin regulates cell motility through Rho- and fibronectin-dependent Src signaling; *J Cell Sci.*, 2010, 123: 3576-3586.
- Tomasek J J**, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown R A; Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling; *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2002, 3: 349-363.
- Trapani J A**, Smyth M J; Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway; *Nat Rev Immunol.* 2002, 2: 735-747.
- Trebaul A**, Chan E K, Midwood K S; Regulation of fibroblast migration by tenascin-C; *Biochem Soc Trans.*, 2007, 5: 695-607.
- Tu S**, Chi A L, Lim S H, Cui G, Dubeykovskaya Z, Ai W, Fleming JV, Takaishi S, Wang T C; Gastrin regulates the TFF2 promoter through gastrinresponsive cis-acting elements and multiple signaling pathways; *Am J Physiol: Gastrointest Liver Physiol.*, 2007; 292: 1726-G1737.
- Twardzik T**, Rapp U R; Somatische Stammzellen: *Grundlagen, Konzepte und Herausforderungen*; *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz*, 2002, 45: 79–84.
- Umeda K**, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S; ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation; *Cell.*, 2006, 126: 741-754.
- Umeda K**, Matsui T, Nakayama M, Furuse K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S; Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1; *J Biol Chem.*, 2004, 279: 44785-44794.
- van der Flier L G**, Clevers H.; Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium; *Annu Rev Physiol.*, 2009, 71: 241-260.
- Van Obberghen-Schilling E**, Tucker R P, Saupe F, Gasser I, Cseh B, Orend G M; Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth; *Int J Dev Biol.*, 2011, 55: 511-525.
- Vandenbroucke K**, Hans W, Van Huysse J, Neiryck S, Demetter P, Remaut E, Rottiers P, Steidler L; Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice; *Gastroenterology*, 2004, 127: 502-513.
- Vestergaard E M**, Borre M, Poulsen S S, Nexø E, Tørring N; Plasma levels of trefoil factors are increased in patients with advanced prostate cancer; *Clin Cancer Res.*, 2006, 12: 807-812.
- Vestergaard E M**, Brynskov J, Ejksjaer K, Clausen J T, Thim L, Nexø E, Poulsen S S; Immunoassays of human trefoil factors 1 and 2: measured on serum from patients with inflammatory bowel disease; *Scand J Clin Lab Invest.*, 2004, 64: 146-156.
- Vestergaard E M**, Nexø E, Tørring N, Borre M, Ørntoft TF, Sørensen K D; Promoter hypomethylation and upregulation of trefoil factors in prostate cancer; *Int J Cancer.*, 2010, 127: 1857-1865.
- Vestergaard E M**, Poulsen S S, Grønbaek H, Larsen R, Nielsen A M, Ejksjaer K, Clausen J T, Thim L, Nexø E; Development and evaluation of an ELISA for human trefoil factor 3; *Clin Chem.*, 2002, 48: 1689-1695.

- Vignais M L**, Fafet P; TGF β -dependent Epithelial-Mesenchymal Transition; *Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Madame Curie Bioscience Database [Internet]*, 2000-2012
- Wang J**, Fan J, Laschinger C, Arora P D, Kapus A, Seth A, McCulloch C A: Smooth muscle actin determines mechanical force-induced p38 activation; *J Biol Chem.*, 2005, 280: 7273-7284.
- Wang J-Y**, Li J, Patel A R, Summers S, Li L, Bass B L; Synergistic induction of ornithine decarboxylase by asparagine and gut peptides in intestinal crypt cells; *Am J Physiol.*, 1998, 274: 1476-1484.
- Wang L. H.**, Liu D. Y., Chen Y. J., Hou L., Wang B., Mao L. M. and Lu S; Abstract: Relationship between lymph node metastasis and the expressions of E-cadherin, N-cadherin, and matrix metalloproteinase in breast carcinoma. *Ai Zheng*, 2002 21: 965-969.
- Waterhouse C C**, Stadnyk A W.; Rapid expression of IL-1beta by intestinal epithelial cells in vitro; *Cell Immunol.*, 1999, 193: 1-8.
- Weinger I**, Klepei V E, Trinkaus-Randal V; Tri-nucleotide receptors play a critical role in epithelial cell wound repair; *Purinergic Signalling*, 2005, 1: 281-292.
- Weissman I L**; Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution; *Cell*, 2000, 100: 157-168.
- Werner S**, Grose R; Regulation of wound healing by growth factors and cytokines; *Physiol Rev.*, 2003, 83: 835-870.
- Werner S**; Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes; *Cytokine Growth Factor Rev.*, 1998, 9: 153-165.
- Wiede A**, Jagla W, Welte T, Köhnlein T, Busk H, Hoffmann W; Localization of TFF3, a new mucus-associated peptide of the human respiratory tract; *Am J Respir Crit Care Med.*, 1999; 159: 1330-1335.
- Wiese C**, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto R P, Boheler K R, Wobus A M; Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells?; *Cell Mol Life Sci.*, 2004, 61: 2510-2522.
- Wilkins-Port C E**, Higgins C E, Freytag J, Higgins S P, Carlson J A, Higgins P J; PAI-1 is a critical upstream regulator of the TGF- β 1/EGF-induced invasive phenotype in mutant p53 human cutaneous squamous cell carcinoma; *J Biomed Biotech.*, 2007, 2007: 85208.
- Willemsen L E M**, Koetsier M A, H van Deventer S J, van Tol E A F; Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E1 and E2 production by intestinal myofibroblasts; *Gut*, 2003, 52: 1442-1447.
- Willis B C**, Liebler J M, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z; Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis; *Am J Pathol.*, 2005, 166: 1321-132.
- Wills-Karp M**, Rani R, Dienger K, Lewkowich I, Fox J G, Perkins C, Lewis L, Finkelman F D, Smith DE, Bryce PJ, Kurt-Jones E A, Wang T C, Sivaprasad U, Hershey GK, Herbert D R; Trefoil factor 2 rapidly induces interleukin 33 to promote type 2 immunity during allergic asthma and hookworm infection; *J Exp Med.*, 2012, 209: 607-622.
- Wilson A J**, Gibson P R; Short-chain fatty acids promote the migration of colonic epithelial cells in vitro; *Gastroenterology*, 1997; 113: 487-496.
- Wong W M**, Poulosom R, Wright N A; Trefoil peptides; *Gut*, 1999, 44: 890-895.
- Wu J**, Lu LY, Yu X; The role of BRCA1 in DNA damage response; *Protein Cell.*, 2010, 1:117-123.
- Yamamoto H**, Bai Y Q, Yuasa Y. Homeodomain protein CDX2 regulates goblet-specific MUC2 gene expression; *Biochem Biophys Res Commun.*, 2003, 300: 813-818.
- Yan K S**, Chia L A, Li X, Ootani A, Su J, Lee J Y, Su N, Luo Y, Heilshorn S C, Amieva M R, Sangiorgi E, Capecchi M R, Kuo C J; The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations; *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2012, 109: 466-471.
- Yan W**, Cao Q J, Arenas R B, Bentley B, Shao R; GATA3 inhibits breast cancer metastasis through the reversal of epithelial-mesenchymal transition; *J Biol Chem.*, 2010, 285: 14042-14051.
- Yang J**, Weinberg R A: Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis; *Dev Cell*, 2008; 14: 818-829
- Yori J L**, Johnson E, Zhou G, Jain M K, Keri R A; Kruppel-like factor 4 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition through regulation of E-cadherin gene expression; *J Biol Chem.*, 2010, 285: 16854-16863.
- Yu C C**, Lo W L, Chen Y W, Huang P I, Hsu H S, Tseng L M, Hung S C, Kao S Y, Chang C J, Chiou S H; Bmi-1 Regulates Snail Expression and Promotes Metastasis Ability in Head and Neck Squamous Cancer-Derived ALDH1; *Positive Cells; J Oncol.*, 2011; pii: 609259.
- Yu T**, Chen X, Zhang W, Li J, Xu R, Wang T C, Ai W, Liu C; Krüppel-like factor 4 regulates intestinal epithelial cell morphology and polarity; *PLoS One*, 2012, e32492.
- Zallen J**, Planar Polarity and Tissue Morphogenesis; *Cell*, 2007, 129: 1051-1063.
- Zeisberg E.M**, Tarnavski O, Michael Zeisberg M, Dorfman A L, McMullen J R, Gustafsson E, Chandraker Ar, Yuan X, Pu W T, Roberts A B, Neilson E G, Sayegh M H, Izumo S, Kalluri R; Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis; *Nat. Med.*, 2007a, 13: 952-961.
- Zeisberg M**, Yang Ch, Martino M, Duncan M B, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R; Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition; *J. Biol. Chem.*, 2007b, 282: 23337-23347.

Zeiss C J; The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice; *Vet Pathol.*, 2003, 40: 481-495.

Zhang Y, Yu G, Xiang Y, Wu J, Jiang P, Lee W, Zhang Y; Bm-TFF2, a toad trefoil factor, promotes cell migration, survival and wound healing; *Biochem Biophys Res Commun.*, 2010, 398: 559-564.

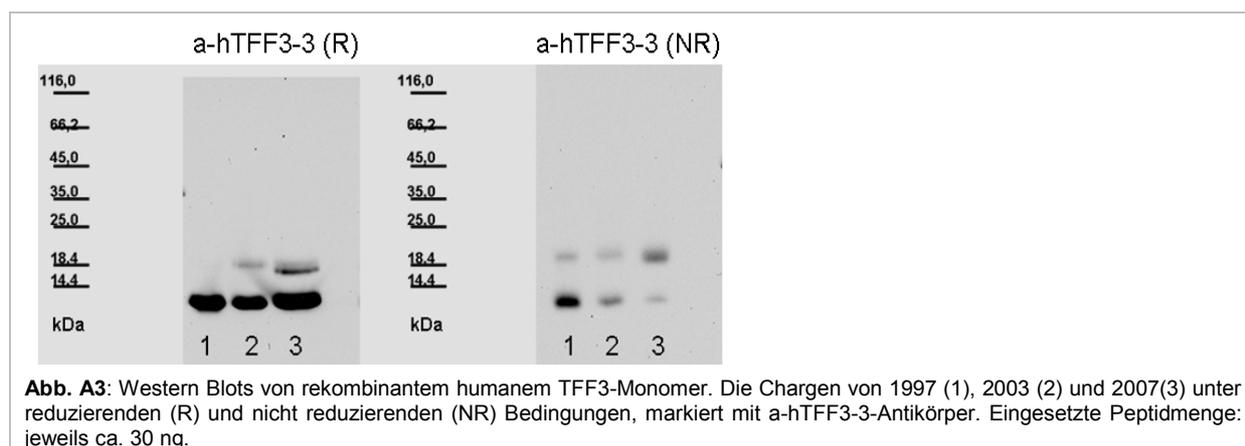
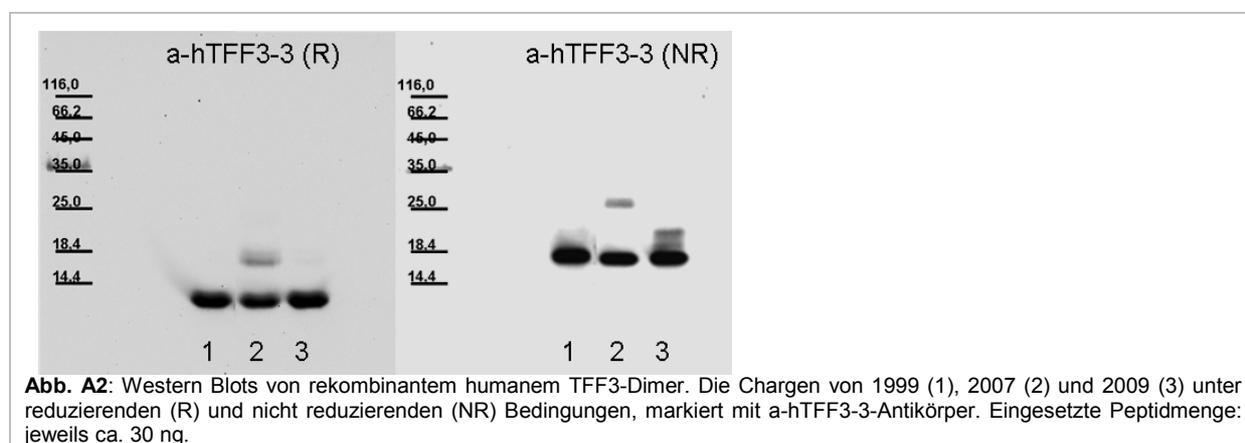
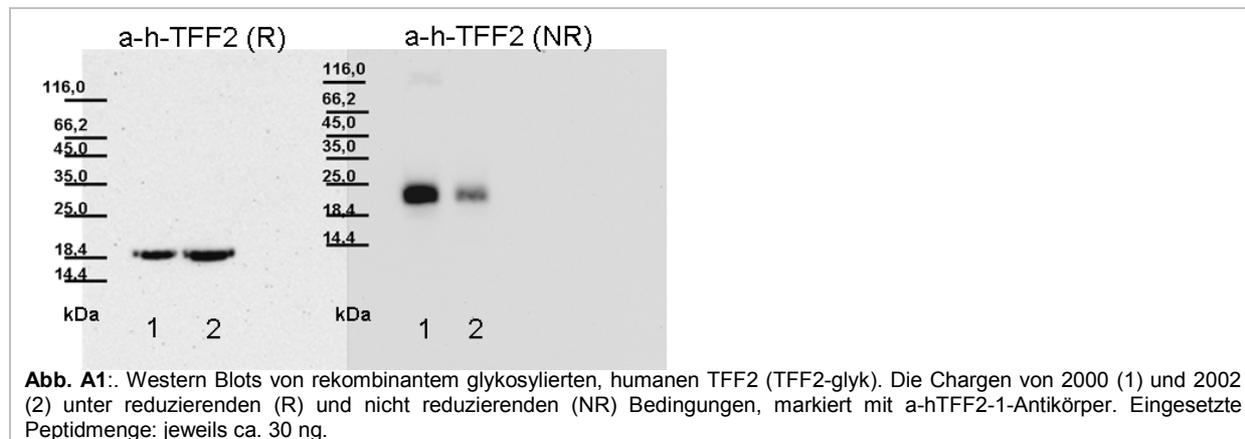
Zhang Z, Rehmann H, Price L S, Riedl J, Bos J L; AF6 negatively regulates Rap1-induced cell adhesion. *J Biol Chem.*, 2005, 280: 33200-33205.

Zhou A, Huntington J A, Pannu N S, Carrell R W, Read R J; How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration; *Nat Struct Biol.*, 2003, 10: 541-544.

Zhu Y Q, Tan X D. TFF3 modulates NF- κ B and a novel negative regulatory molecule of NF- κ B in intestinal epithelial cells via a mechanism distinct from TNF- α ; *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2005, 289: C1085-1093.

8. Anhang

8.1 Western Blots



8.2 Mikroskopaufnahmen

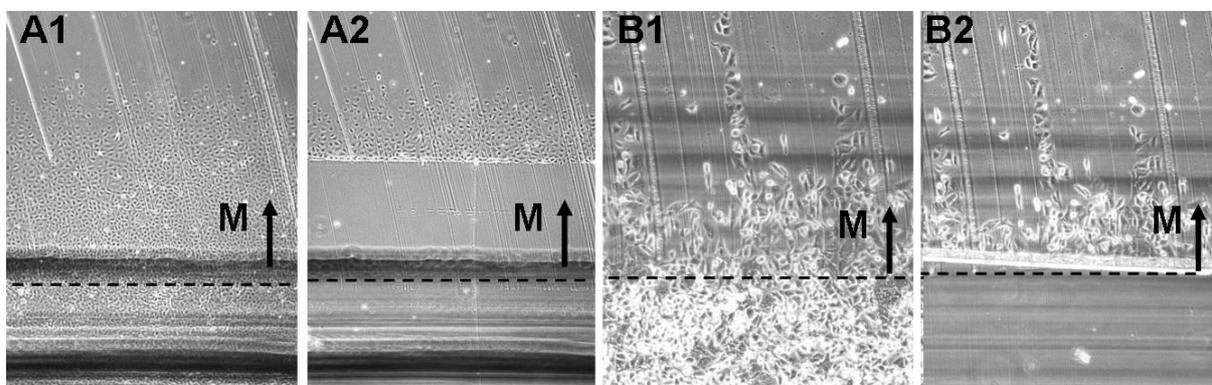
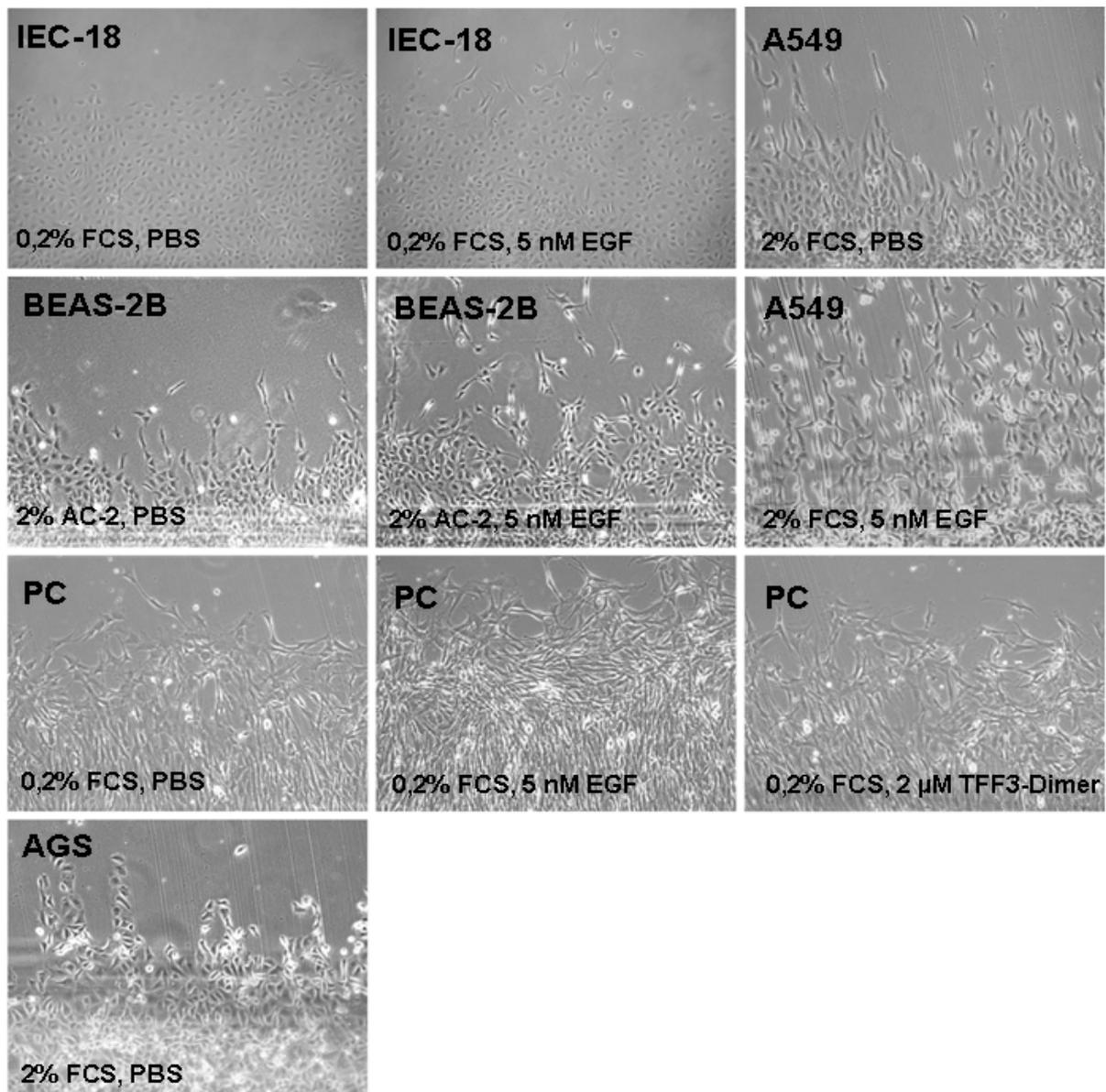


Abb. A4. Oben: Migrationsweise von IEC-18-, BEAS-2B-, A549-, AGS- und primären Zellkulturzellen des murinen Antrums (PC). Beispiele unter serum- oder serumersatz-reduzierten Bedingungen und unter Gabe von PBS (Kontrolle), 5 nM EGF oder 2 μ M TFF3-Dimer. Unten: Trennung der migrierenden Zellen für Genexpressionsanalysen. Bsp. A: IEC-18-Zellen, Bsp. B: AGS-Zellen (1: vor, 2: nach der Trennung, M: migrierende Zellen)

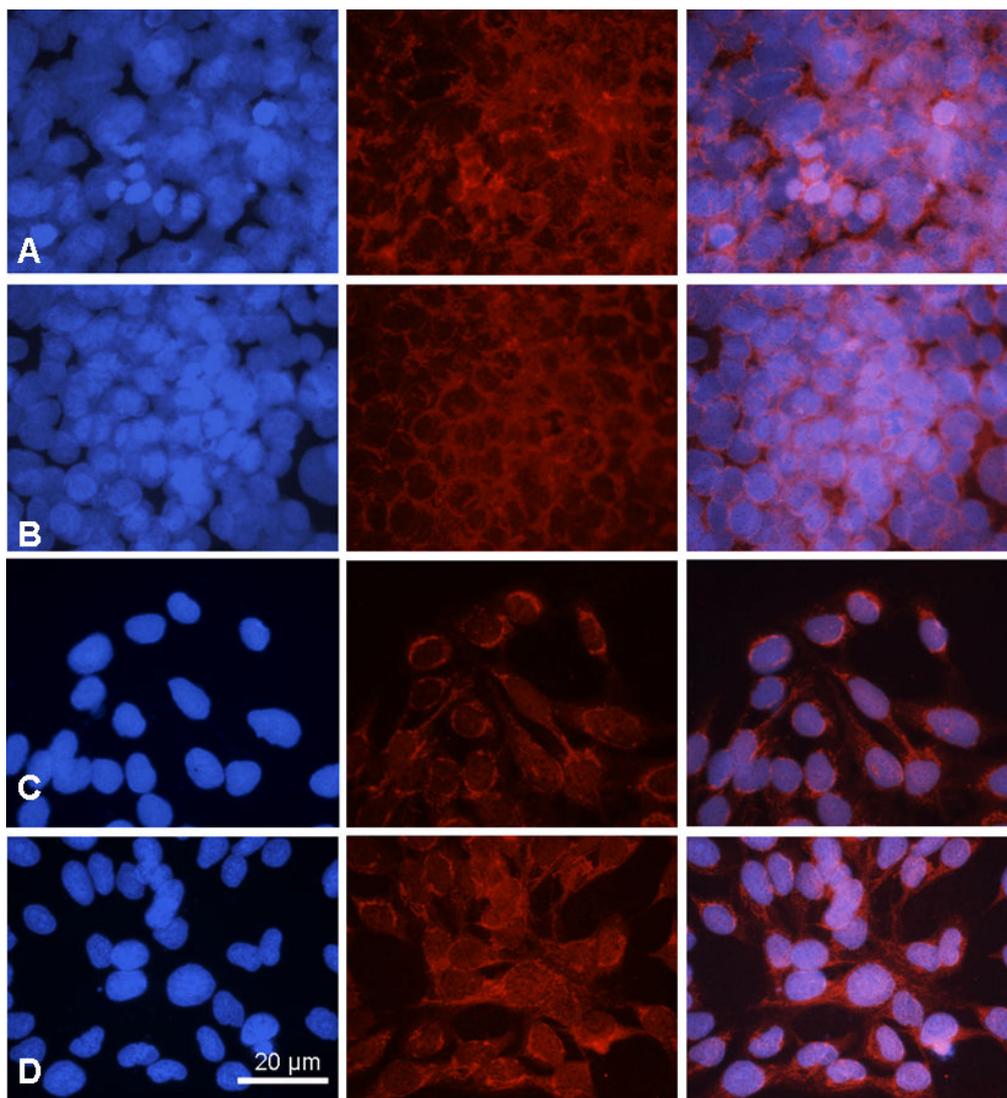


Abb. A5: Immunfluoreszenz von MMP1 (Sekundärantikörper: Cy3) mit DAPI-Kernfärbung der BEAS-2B-Zellen in 400-facher Vergrößerung. Aufnahme 48 h nach Verwundung, A und B: stationäre Zellen, C und D: migrierende Zellen; B und D nach EGF-Behandlung (5 nM).

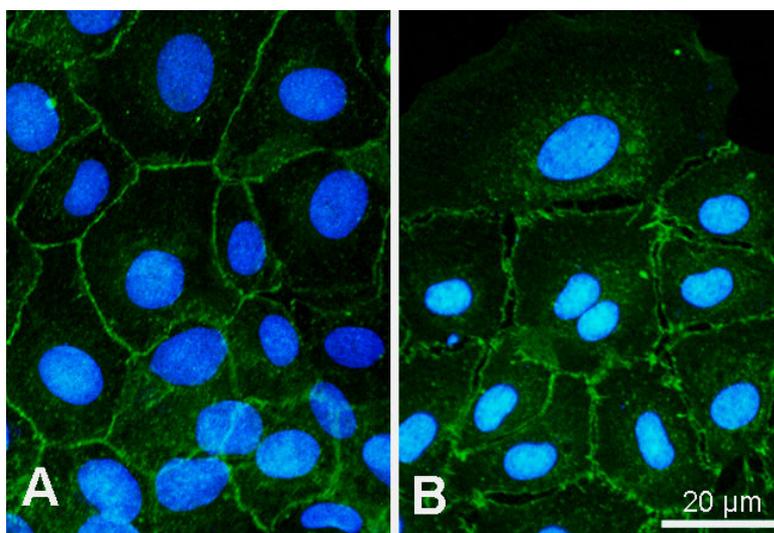


Abb. A6: Immunfluoreszenz von CTNNB (Sekundärantikörper: FITC) mit DAPI-Kernfärbung der IEC-18-Zellen in 400-facher Vergrößerung. Aufnahme 48 h nach Verwundung, A: stationäre Zellen, B: migrierende Zellen.

8.3 Primer

Tab. 16: Primer Human

Gen / Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning:
ACTA1 60°C	NM_001100.3 actin, alpha 1, skeletal muscle	MB1837/ MB1838	GATCTGGCACCACACCTTCT(363-382) GCCATCTCGTTCTCGAAGTC(794-775)	432	ja
ACTA2 60°C	NM_001613.1 actin, alpha 2, smooth muscle	MB1270a/ MB1271	ACTGGGACGACATGAAAAAG(286-305) GAAGGAATAGCCACGCTCAG(653-634)	368	ja
ACTB 57°C	NM_001101.3 actin, beta	MB344/ MB345	TTCTGGGCATGGAGTCCCT(880-898) AGGAGGAGCAATGATCTTGATC(1083-1062)	204	ja
ACTB- promoter region 57°C	NT_007819.16	MB1512/ MB1513	CAGAAAACTGGGGTACCTG(46171-46190) AGTGTGACTTTGTGGTGTGG(46426-46407)	256	-----
ADAM17 57°C	NM_003183.4 ADAM metalloproteinase domain 17 (ADAM17)	MB232/ MB233	TTCTTTTCAGATTCTTGTC(2237-2257) CCTTCTCAAACCCATCCTCG(2521-2502)	285	ja
ANO1 60°C	NM_018043.5 anoctamin 1, calcium activated chloride channel	MB1455/ MB1456	GGCTTTCCTGCTGAAGTTTG(2132-2113) CGCTGTTTCTCTTACACA(2440-2421)	309	ja
APC	NM_001127511.2 polyposis coli (APC) transcript variant 1	MB1902/ MB1903	ATGCTGTTCCAGGTACTGT(133-152) ATCCTCCCGGCTTCCATAA(547-528)	415	ja
BAK1 57°C	NM_001188.3 BCL2-antagonist/killer 1	MB1542/ MB1543	CTGAGACCTGAAAAATGGCT(287-306) TAAGGTGACCATCTCTGGGT(489-470)	203	ja
BAX 57°C	NM_004324.3 BCL2-associated X protein, transcript variant beta	MB1540/ MB1541	AAGAAGCTGAGCGAGTGTCT(238-257) GATGATCTGAAGATGGGGAG(689-670)	452	ja
BMP6 60°C	NM_001718.4 bone morphogenetic protein 6	MB1557/ MB1558	GCGACACCACAAGAGTTCA(874-893) GAAGCCCCATGTTATGCTGT(1160-1143)	287	ja
CASP3 60°C	NM_004346.3 caspase 3, apoptosis- related cysteine peptidase, transcript variant alpha	MB1823/ MB1824	TGGAATTGATGCGTGATGTT(533-572) CCACCAACCAACCATTTCTT(1116-1097)	564	ja
CASP7 60°C	NM_001227.3 caspase 7, apoptosis- related cysteine peptidase, transcript variant alpha	MB1821/ MB1822	AGTGACAGGTATGGGCGTTC(552-571) GGCAAGCCTGAATGAAGAAG(871-852)	320	ja
CCL2 57°C	NM_002982.3 CCL2 chemokine (C-C motif) ligand 2	MB150/ MB151	CCAGATGCAATCAATGCC(146-164) CAAAGACCCTCAAACATCCC(634-314)	489	ja
CCL26 60°C	NM_006072.4 chemokine (C-C motif) ligand 26	MB1203/ MB1204	GGAGGAGTTGGGAGAAACC(64-83) AGCGTCCTCGGATGAAAT(421-402)	358	ja
CCNA2 57°C	NM_001237.2 cyclin A2	MB889/ MB890	AGAAAACTTCAGCTTGTGG(858-876) TTTGTCCCGTACTGTGTAG(1219-1200)	362	ja
CCND1 60°C	NM_053056.2 cyclin D1	MB1757/ MB1756	AGACCTTCGTTGCCTCTGT(757-776) CACCTCCTCCTCCTCTT(1052-1033)	296	ja
CCNE1 60°C	NM_001238.1 cyclin E1 transcript variant 1	MB1793/ MB1794	CTGGATGTTGACTGCCTTGA(1042-1061) TCTTTGGTGGAGAAGGATGG(1441-1422)	400	ja
CDH1 57°C	NM_004360.2 CDH1 cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	MB885/ MB886	ACGTCGTAATCACCACACTG(1293-1312) CTCGGACACTTCCACTCTCT(1615-1596)	323	ja
CDH17 60°C	NM_004063.3 cadherin 17, LI cadherin (liver-intestine) transcript variant 1	MB1753/ MB1754	GACAATCAGCCACGTTTCT(486-505) GCTCCCGTTTTGTTGTTGAT(688-669)	203	ja
CDH2 57°C	NM_001792.2 cadherin 2, type 1, N- cadherin (neuronal)	MB887/ MB888	AGGACAGCCTCTTCTCAATG(358-377) CTGGAGTTTTCTGGCAAGTT(723-704)	366	ja
CLDN1 57°C 1	NM_021101.3 claudin 1	MB1284/ MB1285	CCGTTGGCATGAAGTGTATG(516-535) CCAGTGAAGAGAGCCTGACC(723-704)	208	ja
CLDN18 57°C	NM_016369.3 claudin 18 transcript variant 1	MB1561/ MB1562	CCTCCTGGTATCCATCTTTG(341-360) CGTGCTTGAAGGATAAGAT(837-818)	497	ja
CLDN2 57°C	NM_020384.2 claudin 2	MB1286/ MB128	GGATTTTCAAAGCTGTGGT(5-24) GCTCTTGCTCCTTGAACACC(270-251)	266	ja
CLDN3 57°C	NM_001306.3 claudin 3	MB1534/ MB1535	CAGTGCAAGGTGTACGACTC(405-424) AGAAGGGTGAGGTTTACACAG(1130-1111)	726	nein
CLDN4 57°C	NM_001305.3 claudin 4	MB783/ MB784	TGGATGGACGGGTTTAGAG(1470-1488) TGACAGGTCCCATTTATTG(1818-1799)	349	nein
CLDN4 57°C	NM_001305.3 claudin 4	MB1536/ MB1534	TCAGGACTGGCTTTATCTCC(196-215) ACCACGCAGTTCATCCATA(506-488)	311	nein

Gen / Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning:
CLDN5 57°C	NM_001130861.1 Cldn5 transcript variant 1	MB785/ MB786	CCTGCCCTTAACAGACGGAATG(1944-1965) TCTTGGAGGGGAAGCGAAATCC(2044-2023)	101	nein
CLDN5 57°C	NM_001130861.1 Cldn5 transcript variant 1	MB1538/ MB1539	GGGATGAGAGAGACAGTGCT(360-379) GGGTACCCTCTTTGAAGGTT(914-895)	555	nein
CLDN7 60°C	NM_001307.5 claudin 7	MB1841/ MB1842	GCGTATCCTACTCCCTGTGC(876-895) ATGGCTATACGGGCCTTCTT(1261-1242)	586	ja
COL1A1 60°C	NM_000088.3 collagen, type I, alpha 1	MB1741/ MB1742	CTGGTCCTGATGGCAAACT(1766-1785) AACCTCTCTCGCCTCTTGCT(2167-2148)	402	ja
CTFR 57°C	NM_000492.3 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator member 7	MB559/ MB560	GACTGCACATCAAATATGCC(5147-5167) ATCTACTTACACACCCTCTACC(5491-5470)	345	nein
CTFR 60°C	NM_000492.3 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator member 7	MB1863/ MB1864	CAAGGAGGAACGCTCTATCG(471-490) GCCTCCGAGTCAGTTTCAG(1028-1009)	558	ja
CTNNB1 60°C	NM_001904.3 catenin (cadherin- associated protein), beta	MB1791/ MB1792	CCCACTAATGTCCAGCGTTT(623-642) AATCCACTGGTGAACCAAGC(1016-997)	394	ja
CXCL1 57°C	NM_001511.3 chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	MB509/ MB510	CAGTGACAAATCCAACCTGACC(385-405) ACATACATTCCCTGCCTTC(850-831)	466	nein
CXCL12 57°C	NM_199168.3 chemokine (C-X-C motif) ligand 12	MB91861/ MB91862	GCACTTTCACTCTCCGTC(4-22) AGGGTCTAAATGCTGGCAA(538-520)	535	ja
CXCL2 57°C	NM_002982.3 CCL2 chemokine (C-C motif) ligand 2	MB150/ MB151	CCAGATGCAATCAATGCC(146-164) CAAAGACCCTCAAACATCCC(634-314)	489	ja
CXCL3 57°C	NM_002090.2 CXCL3 chemokine (C-X- C motif) ligand	MB507/ MB508	CGCCCAAACCGAAGTCATAG(369-388) ATTTCAATCCCCCACCTC(866-847)	498	ja
CXCR4 60°C	NM_001008540.1 Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) receptor 4 transkript variant 1	MB1859/ MB1860	GGCAGAGGAGTTAGCCAAGA(27-46) CTTGTCCGTCATGCTTCTCA(541-522)	515	ja
CXCR4 57°C	NM_003467.2 chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), transkript variant 2	MB1035/ MB1036	AGCAGGTAGCAAAGTGACG(24-42) TGAGGACACTGCTGTAGAGG(471-452)	448	ja
DKK1	NM_012242.2 dickkopf homolog 1 (Xenopus)	MB1642/ MB1643	TCCGAGGAGAAATTGAGGAA(591-610) CCTGAGGCACAGTCTGATGA(747-728)	157	ja
DKK1	NM_012242.2 dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	MB1906/ MB1907	GGCGGGAATAAGTACCAGAC(362-381) TGACCGGAGACAAACAGAAC(730-711)	369	ja
DMBT1 57°C	NM_007329.2 deleted in malignant brain tumors 1	MB342/ MB343	TCTCCAATCCTTGGGCTTT(6526-6545) GGTCTGTCTCCTCTTGATG(670-6721)	215	ja
EGF 60°C	NM_001963.4 epidermal growth factor	MB1749/ MB1750	CGTGCCTGTAGGATTTGTT(1594-1613) GGCAAACAGCAAAATGGTT(1916-1897)	323	ja
EGFR 60°C	NM_005228.3 epidermal growth factor receptor	MB1739/ MB1740	CAAAACTGCACCTCCATCA(1323-1342) GCTGACGACTGCAAGAGAAA(1572-1553)	250	ja
FCGBP 60°C	NM_003890.2 Fc fragment of IgG binding protein	MB1514/ MB1515	AGCTGGCAAGAAGAGACGAG(3099-3118) AGGAACACGCCCTCATAGTGG(3447-3428)	349	ja
FN1 57°C	NM_212482.1 fibronectin 1	MB909/ MB910	GAGAGTGGAAAGTGTGAGAGG(1063-1082) TGTTGTTGTATAGGAAGGGG(1552-1532)	490	ja
GAPDH 60°C	NM_002046.3 glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	MB1833/ MB1834	AGTCAACGGATTTGGTCGT(123-141) TTGATTTGGAGGGATCTCG(359-340)	237	ja
GAST 57°C	NM_000805.4 gastrin	MB1029/ MB1030	CACACACCTCCCAGCTCT(41-58) ATCAGTTTTTCAGGGGACAG(445-426)	405	ja
GATA2 60°C	NM_001145661.1 GATA binding protein 2	MB1833/ MB1834	AAGGCTCGTTCTGTTTCCAG(1288-1307) GCCCTTTCTTGCTCTTCTT(1667-1648)	380	ja
GATA3 60°C	NM_001002295.1 GATA binding protein 3	MB1395/ MB1396	CTCATTAAGCCCAAGCGAAG(1458-1477) TTTTTCGGTTTCTGGTCTGG(1662-1643)	205	ja
GATA4 57°C	NM_002052.3 GATA binding protein 4	MB1298/ MB1299	CACTGCGTAATCTTCCCTCT(1874-1893) TGATGTACACCCCAAT(2418-2399)	545	nein
GATA5 57°C	NM_080473.4 GATA binding protein 5	MB1300/ MB1301	AACAGTCAACCTCCCAGTGT(1635-1654) GGTATCATCCAAACCCAGTGT(2164-2145)	530	nein
GATA6 60°C	NM_005257.3 GATA binding protein 6	MB1835/ MB1836	CAAACCAGGAAACGAAACC(1730-1749) CAAAGCAGACACGAGTGA(2118-2099)	389	ja

Gen / Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning:
HBEGF 57°C	NM_001945.2 heparin-binding EGF-like growth factor	MB1476/ MB1477	GCTGTCACTGTCTGTCTGC(782-801) TATGGAATTTAACCGGCATT(1234-1215)	453	ja
IL-6 57°C	NM_000600.3 interleukin 6 (interferon, beta 2)	MB125/ MB126	ACCTCTTCAGAACGAATTGAC(258-278) GCCTCTTTGCTGCTTTTCAC(367-364)	110	ja
IL-8 57°C	NM_000584.3 interleukin 8	MB138/ MB139	ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT(154-177) TCTCAGCCCTCTCAAAAACCTCTC(445-421)	292	ja
ITGB1 57°C	NM_002211.3 integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta variant 1A)	MB1085/ MB1086	TAAAAGCAAATGCCAAATCA(304-323) ACAAATGAGCCAAATCCAAT(784-765)	481	ja
KRT6A 60°C	NM_005554.3 keratin 6A	MB1751/ MB1752	CCAAGGCAGACACTCTCACA(1066-1085) GCAGCTCCTCGTACTTGGTC(1299-1270)	234	ja
LGALS1 60°C	NM_002305.3 lectin, galactoside- binding, soluble, 1	MB1759/ MB1760	CTCTCGGGTGGAGTCTTCTG(35-54) CAGGTTGTTGCTGTCTTTGC(223-204)	189	ja
LGALS3 57°C	NM_002306.3 lectin, galactoside- binding, soluble, 3 transcript variant 1	MB1203/ MB1204	ATGATGCGTTATCTGGGTCT(111-130) AACATCATTCCCTCTTTGGA(553-534)	443	ja
LGR5 57°C	NM_003667.2 leucine-rich repeat containing G protein- coupled receptor 5	MB932/ MB933	GAAACCTCTCCAGCTTGGTA(668-687) GACTCTCCAGGTTTGCAGTT(1034-1026)	378	ja
LIPF 57°C	NM_004190.3 lipase, gastric, transcript	MB1045/ MB1046	AGATGCTGAATCTCCTTTGC(860-879) TAAACTTCTTGAGGGGCATC(1271-1252)	412	ja
LYZ 57°C	NM_000239.2 lysozyme	MB916a/ MB917	GAAAAGATTGGGAATGGATG(145-164) TGACGGACATCTCTGTTTTG(477-458)	333	ja
MIF 60°C	NM_002415.1 macrophage migration inhibitory factor	MB1733/ MB1734	GGTCTCCTGGTCTTCTGC(75-94) GAGTTGTTCCAGCCACATT(432-413)	358	ja
MMP1 57°C	NM_002421.3 (interstitial collagenase) transcript variant 1	MB334/ MB335	TTCCCAAATCCTGTCCAGCCC(929-950) TCCGTGTAGCACATTCTGTCCC(1220-1199)	292	ja
MMP1 60°C	NM_002421.3 matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) transcript variant 1	MB1839/ MB1840	TGCTCATGCTTTTCAACCAG(686-705) ACCGGACTTCATCTCTGTCCG(1167-1148)	482	ja
MMP10 60°C	NM_002425.2 matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	MB1598/ MB1599	GGCTCTTCACTCAGCCAAC(708-727) TCCCGAAGGAACAGATTTTG(883-864)	176	ja
MMP10 60°C	NM_002425.2 matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	MB1916/ MB1917	GGCGAAGATCCCACTGGAACCC(978-999) TGCAAGGCTCATCTTCTCAGTCAC(1594-1570)	617	ja
MMP11 60°C	NM_005940.3 matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	MB1600/ MB1601	TACTGGGTGTACGACGGTGA(1106-1125) AGAAGTCAGGACCCACGAGA(1454-1435)	349	ja
MMP12 60°C	NM_002426.4 matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	MB1602/ MB1603	ACACCTGACATGAACCGTGA(461-480) AGCAGAGAGCGGAAATGTGT(853-834)	393	ja
MMP13 60°C	NM_002427.2 matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	MB1604/ MB1605	TAAGGAGCATGGCGACTTCT(535-554) GTCTGGCGTTTTTGGATGTT(874-855)	340	ja
MMP14 60°C	NM_004995.2 matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	MB1606/ MB1607	TGCAGAAGTTTTACGGCTTGC(437-457) AGTGGGTGTCTCCTCCAATG(877-858)	441	ja
MMP16 60°C	NM_005941.4 matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted) transcript variant 1	MB1608/ MB1609	GCTGACCCAAGGAAAATGA(1225-1244) CACAAAATCCCGTCGCTAT(1494-1475)	270	ja
MMP17 60°C	NM_016155.4 matrix metalloproteinase 17 (membrane-inserted)	MB1610/ MB1611	GACACCCACTTTGACGATGA(760-779) AGTGAGTGCTGCATCTGTGG(1105-1086)	346	ja
MMP2 60°C	NM_001127891.1 matrix metalloproteinase 2, collagenase)	MB1429/ MB1430	TTCCCTTCTTTGTTCAATGG(869-888) ATTTGTTGCCAGGAAAGTG(1242-1223)	376	ja
MMP24 60°C	NM_006690.3 matrix metalloproteinase 24 (membrane-inserted)	MB1612/ MB1613	TGAAGGCATTGACACAGCTC(1422-1441) GTGGAGGACGGTCACAACT(1663-1644)	242	ja
MMP28 60°C	NM_024302.3 matrix metalloproteinase 28 transcript variant1	MB1654/ MB1655	AGAGCGTTTCAGTGGGTGTC(449-468) GGTAGGAGAGGTGCTGCTTG(671-642)	223	ja
MMP3 60°C	NM_002422.3 matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	MB1391/ MB1392	GCAGTTTGCTCAGCCTATCC(102-121) GAGTGTCGGAGTCCAGCTTC(315-296)	214	ja
MMP3 60°C	NM_002422.3 matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	MB1918/ MB1919	AAGGAGGCAGGCAAGACAGCA(5-25) TCGGAGTCCAGCTTCCCGGT(310-291)	306	ja

Gen / Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning:
MMP7 57°C	NM_002423.3 matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	MB346/ MB347	CGAGACTTACCGCATATTACAG(399-420) CAGAGGAATGTCCCATACCC(726-707)	328	ja
MMP7 60°C	NM_002423.3 matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	MB1592/ MB1593	GAGTGCCAGATGTTGCAGAA(310-329) AAATGCAGGGGGATCTCTTT(478-459)	169	ja
MMP8 60°C	NM_002424.2 matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	MB1594/ MB1595	TCTGCAAGGTTATCCCAAGG(1170-1189) CGGAGGACAGGTAGAATGGA(1647-1628)	478	ja
MUC12 57°C	NM_001164462.1 mucin 12, cell surface associated	MB1099/ MB1100	ATCTACACCCCTCCCTGACA(14631-14650) AAAGTGGCGTTGAGTTTTTC(15086-15067)	456	ja
MUC13 57°C	NM_033049.3 mucin 13, cell surface associated	MB1097/ MB1098	AAGATGCTAATGGGAAGTGC(1229-1248) GCCAGATCTTTACTGGTGTCT(1684-1665)	456	ja
MUC17 60°C	NM_001040105.1 mucin 17, cell surface associated	MB1811/ MB1782	CTTCTCACACCATCCCACT(12188-12207) ATGTTGTGGTCTTGGCACA(12456-12437)	231	nein
MUC2 57°C	NM_002457.2 mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming	MB322/ MB323	ACTGCACATTCTTCAGCTGC(15083-15102) ATTCATGAGGACGGTCTTGG(15315-15296)	223	exon- intron unklar
MUC5AC 57°C	NM_017511.1 mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming.	MB1470/ MB1471	TCTTCAGACCCTCAACC(1706-1722) AGTGACGGGTGGAACAA(2184-2168)	479	exon- intron unklar
MUC5B 57°C	NM_002458.2 mucin 5B, oligomeric mucus/gel-forming	MB326/ MB327	CTGCGAGACCGAGGTCAACATC(17072-17093) TGGGCAGCAGGAGCACGGAG(17486-17467)	415	ja
MUC6 57°C	NM_005961.2 mucin 6, oligomeric mucus/gel-forming	MB328/ MB329	CAGCAGGAGGAGATCACGTTCAAG(7111-7134) GTGGGTGTTTTCTGTCTGTCTCATC(7434-7411)	328	ja
MUC7 57°C	NM_001145006.1 mucin 7, secreted, transcript variant 1	MB330/ MB331	CTTCTCGTTCAGTGAAGGTTCG(336-356) TGAAGCTTAGGCCTACAGC(513-494)	178	ja
NANOG 57°C	NM_024865.2 Nanog homeobox	MB1031/ MB1032	AACAACCTGGCCGAAGAATAG(682-701) GGTTGCATGTTTCATGGAGTA(1121-1102)	440	ja
OCLN 60°C	NM_002538.3 occludin	MB1393/ MB1394	TGGCTGCTGCTGATGAATAC(1860-1879) GCTCACAGAGGTTTGGCTTC(2113-2094)	254	ja
ODC 60°C	NM_002539.1 ornithine decarboxylase 1	MB1831/ MB1832	AAAGTTGGTTTTGCGGATTG(781-800) TCCATAGACGCCATCATTCA(1306-1287)	526	ja
PDX-1 57°C	NM_000209.3 pancreatic and duodenal homeobox 1	MB1129/ MB1130	AAAGGAGGAGGACAAGAAGC(714-733) AAAGAGGGCCCCAATACTAC(1212-1193)	499	nein
PGA3 57°C	NM_001079807.1 pepsinogen 3, group I (pepsinogen A)	MB1585/ MB1586	AGAGGCCATCGCCTGCG(842-858) TAAAGTGGGCACAGGACAG(1279-1261)	438	ja
PGA5 57°C	NM_014224.2 pepsinogen 5, group I (pepsinogen A)	MB1587/ MB1588	GAGAGACCATCGCCTGTG(843-860) TAAAGTGGGCATAGGACGG(1281-1263)	439	ja
PGC 57°C	NM_002630.3 progastricin (pepsinogen C) transcript variant 1	MB366/ MB367	CCAACCAGGAGTTCGGCTTGAG(534-555) GTGTCCACGATGGCCTGGCAAC(897-876)	364	ja
PGC 60°C	NM_002630.3 progastricin (pepsinogen C) transcript variant 1	MB1795/ MB1796	CCGTCTTCAGCGTCTACCTC(690-709) AGAGGGAAGTCCACACCAT(1057-1038)	367	ja
POU2F1 60°C	NM_002697.2 POU class 2 homeobox 1	MB1666/ MB1667	CAGTGCAGCAACTACCCTCA(1572-1581) GGAGTGGAGGTGGTCTGTGT(1817-1798)	246	ja
PROM1 57°C	NM_006017.2 prominin 1 transcript variant 1	MB787/ MB788	TTCTTGACCGACTGAGACCC(934-953) CCCTTTTGATACCTGCTACGAC(1365-1344)	432	ja
PROM2 57°C	NM_001165978.1 prominin 2 transcript 1 transcript 3	MB789/ MB790	GTCAAGACCTCCAATACTTCC(2531-2552) ACTTCTCTCCATAAACACTC(3832-3811) (2531-2351) - (2952-2931)	1302 393	ja
PTGS2 57°C	NM_000963.2 prostaglandin- endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	MB310/ MB311	TGTGGGGCAGGAGGTCTTT(953-971) GTACTGCGGGTGAACATT(1428-1410)	476	ja
RPS26 60°C	NM_001029.3 ribosomal protein S26	MB1707/ MB1708	TTCTTGAAGCCCGTCTCCTA(156-175) CATACAGCTTGGGAAGCAC(470-452)	315	ja
SERPINE1 60°C	NM_000602.2 serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	MB1272/ MB1273	CTCTCTCTGCCCTACCAAC(954-973) GAGGAAGGGTCTGTCCATGA(1294-1275)	341	ja

Gen / Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning:
SFTP B 57°C	NM_000542.3 surfactant protein B, transcript variant 1	MB681/ MB682	CGATGACCTATGCCAAGAGTG(331-351) AGGGGGAAGTAGTCGTCAAG(501-482)	171	ja
SFTP C 57°C	NM_003018.3 surfactant protein C	MB561/ MB562	TGAGTGAGCACCTGGTTAC(409-427) GAGAGCATTCCATCTGGAAG(607-587)	199	ja
SFTP D 57°C	NM_003019.4 surfactant protein D	MB679/ MB680	GGGATTGAAGGGGGACAAAG(646-665) AACTCGCAGACCACAAGAC(1167-1149)	522	ja
SHH 57°C	NM_000193.2 sonic hedgehog	MB1137/ MB1138	TACTACGAGTCCAAGGCACA(671-690) GAAAGTGAGGAAGTCGCTGT(874-855)	204	ja
SNAI1 60°C	NM_005985.2 snail homolog 1 (Drosophila)	MB1276/ MB1277	GCTCCTTCGCTTCTCCTC(395-414) TGACATCTGAGTGGGTCTGG(770-751)	376	ja
SNAI2 60°C	NM_003068.3 snail homolog 2 (Drosophila)	MB1278/ MB1279	TCGGACCCACACATTACCTT(698-717) TTGGAGCAGTTTTTGCCTG(907-888)	210	ja
SNCAIP 60°C	NM_005460.2 synuclein, alpha interacting protein	MB1555/ MB1556	TCCAACCAGAAGAGCAGGT(1080-1099) AGGCAGTCTTCTCCCATCAA(1339-1320)	260	ja
SOD1 60°C	NM_000454.4 superoxide dismutase 1, soluble	MB1579/ MB1580	AGGCATCATCAATTTTCGAG(195-214) GGCCTCAGACTACATCCAA(641-622)	447	ja
SOD3 60°C	NM_001102.2 superoxide dismutase 3, extracellular	MB1581/ MB1582	GGTGAGCTCTCTTTTCAGG(140-159) GAACTGGTGACAGTGGATG(559-541)	420	ja
STAT3 60°C	NM_139276.2 signal transducer and activator of transcription 3 (transcript variant 1)	MB1644/ MB1645	TTTGTACAGCATGGAGTACG(912-931) CGATTCTCTCCTCCAGCATC(1168-1149)	257	ja
STMN3 60°C	NM_015894.2 stathmin-like 3	MB1646/ MB1647	GCTCATCTGCTCCTGCTTCT(139-158) TCCTTGCTGAGCTCCATCTT(516-495)	378	ja
SYTL1 57°C	NM_001193308.1 synaptotagmin-like 1, transcript variant 1	MB1051/ MB1052	CAACGAGACTCTCCGGTACT(1187-1206) ATGGTGTGATTGAACACAGG(1627-1608)	441	ja
SYTL2 57°C	NM_032943.3 synaptotagmin-like 2, transcript variant a NM_206927.2 synaptotagmin-like 2, transcript variant c	MB1053/ MB1054	CTAGGAAATGCCTTCCAAA(2082-2101) CTTCCAGATTGCCAAAGTCT(2381-2362) (2489-2508) - (2908-2889)	300 420	ja nein
SYTL4 57°C	NM_080737.2 synaptotagmin-like 3 variant 1	MB1057/ MB1058	GTCCCTCCTTCATCAGACAC(818-837) ATTTGCTTCTGTCTCCCAAG(1242-1223)	425	ja
TFF1 57°C	NM_003225.2 TFF1 trefoil factor 1	MD11/ MD12	TTTGGAGCAGAGAGGAGG(21-38) TTGAGTAGTCAAAGTCAGAGCAG(458-436)	438	ja
TFF2 57°C	NM_005423.3 TFF1 trefoil factor 3	MD13/ MD14	AGTGAGAAACCCTCCCC(108-125) AACACCCGGTGAGCCAG(473-457)	366	ja
TFF3 57°C	NM_003226.2 TFF1 trefoil factor 3	MD9/ MD10	GTGCCAGCCAAGGACAG(322-338) CGTTAAGACATCAGGCTCCAG(623-603)	302	ja
TIMP1 60°C	NM_003254.2 TIMP metalloproteinase inhibitor 1	MB1614/ MB1615	AATTCCGACCTCGTCATCAG(301-320) TGCAGTTTTCCAGCAATGAG(530-511)	230	ja
TIMP2 60°C	NM_003255.4 TIMP metalloproteinase inhibitor 2	MB1616/ MB1617	GGAAGTGGACTCTGAAACG(461-460) GTGCCCGTTGATGTTCTTCT(860-841)	400	ja
TIMP3 60°C	NM_000362.4 TIMP metalloproteinase inhibitor 3	MB1618/ MB1619	AGGACGCCTTCTGCAACTC(1281-1299) AGTCACAAAGCAAGGCAGGT(1660-1641)	380	ja
TIMP4 60°C	NM_003256.2 TIMP metalloproteinase inhibitor 4	MB1620/ MB1621	CAGACCCTGCTGACTGAA(492-511) AGACTTTCCCTCTGCACCAA(750-731)	259	ja
TJP1 60°C	NM_003257.3 tight junction protein 1 (zona occludens 1)	MB1274/ MB1275	GGAGAGGTGTTCCGTGTTGT(2093-2112) CCAGCTTCTCGAAGAACCAC(2400-2381)	308	ja
TJP2 60°C	NM_004817.3 tight junction protein 2 (zona occludens 2)	MB1876a/ MB1877	GGGATATTGCAGGCACAGT(1706-1724) CGCTGTCTCCCTTCTTGAAC(1879-1860)	174	ja
TNC 60°C	NM_002160.2 tenascin C	MB1652/ MB1653	AGCTGTTGGCAGGTGCTTT(379-398) ACTCCAGATCCACCGAACAC(570-551)	192	nein
TNC 60°C	NM_002160.3 tenascin C	MB2030/ MB2031	GCTCGGAACCTCACCGTGCC(3761-3780) AACGCAGGCTGCCAGGAACC(4340-4321)	580	ja
TNFA 57°C	NM_003236.2 transforming growth factor, alpha transcript variant 1	MB390/ MB391	AATGACTGCCAGATTCCC(339-357) ACCAACGTAACCCAGAATGG(443-425)	105	ja
TWIST1 60°C	NM_000474.3 TWIST1 twist homolog 1 (Drosophila)	MB1280/ MB1281	GTCCGAGTCTTACGAGGAG(647-666) CACGCCCTGTTTCTTTGAAT(1138-1119)	492	ja
VANGL1 60°C	NM_001172411.1 vang-like 1 (van gogh, Drosophila)	MB1668/ MB1669	CAAGAGGACATTGCCAGGAT(530-549) ACAAAAGGCACGAAACAC(833-815)	305	ja

Gen / Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning:
VCAM 57°C	NM_001078.3 vascular cell adhesion molecule 1	MB259/ MB260	ATTGGGAAAAACAGAAAAGAG(1110-1130) GGCAACATTGACATAAAGTG8(1751-1732)	642	ja
VIM 60°C	NM_003380.2 Vimentin	MB1389/ MB1390	GGCTCAGATTGAGAACAGC(862-881) GCTTCAACGGCAAAGTTCTC(1188-1169)	327	ja
VTN 57°C	NM_000638.3 vitronectin	MB930/ MB931	TGCTATGAACTGGACGAAAA(687-706) GCAAAGTGTCAAACACAGC(1066-1047)	380	ja

Tab. 17: Primer Mus musculus: Annealingtemperatur 60°C

Gen Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning
Acta1	NM_009606.2 actin, alpha 1, skeletal muscle	MB1867/ MB1855	CCAGAGTCAGAGCAGCAGAA(28-47) GGAAGCATAGAGGGACAGCA(498-479)	471	ja
Acta2	NM_007392.2 actin, alpha 2, smooth muscle	MB1725/ MB1726	ACTGGGACGACATGGAAAAG(309-338) GAAGGAATAGCCACGCTCAG(676-657)	368	ja
Actb	NM_007393.3 actin, beta	MB555/ MB556	AAGCTGTGCTATGTTGCTC(722-740) TCTCCTTCTGCATCCTGTC(1028-1010)	307	ja
Actb- promoter region	DBTSS:NM_007393 chr5 - 140387155 140388155	MB1783/ MB1784	GATGCTGACCCCTCATCCACT(276-295) ATGAAGAGTTTTGGCGATGG(470-451)	195	_____
Atp4b	NM_009724.2 ATPase.H+/K+ Exchanging, beta polypeptide	MB1171/ MB1172	TGCAGGAGAAGAAGTCATGC(36-55) AGATGCACAAGGCAAAGAGC(203-184)	168	ja
Bak1	NM_007523.2 BCL2-antagonist/killer 1	MB1813/ MB1814	CGCTACGACACAGAGTTCCA(509-528) TGGGGTAGGGAGAGAGGTTT(950-931)	442	ja
Bax	NM_007527.3 BCL2-associated X protein	MB1815/ MB1816	TGCAGAGGATGATTGCTGAC(350-369) GATCAGCTCGGGCACTTTAG(522-503)	173	ja
Casp3	NM_009810.2 caspase 3	MB1817/ MB1818	TCTGACTGGAAAGCCGAAAC(513-532) TAACGCGAGTGAGAATGTGC(781-762)	269	ja
Casp7	NM_007611.2 caspase 7	MB1819/ MB1820	AAGCCAGACCGCTCCTCTAT(262-281) GGAACCGTGGAGTAAGCAAA(869-850)	608	ja
Ccl2	NM_011333.3 chemokine (C-C motif) ligand 2	MD173/ MD174	GCTACTATTCAACGACAAAG(189-208) ATCACAGTCCGAGTACAC(550-482)	362	ja
Ccna1	NM_007628.3 cyclin A1	MB1825/ MB1826	AGCAACGGATTTTGGTTTCCAG(571-590) CAAGCTGCAATTTCCCTCTC(845-826)	275	ja
Ccna2	NM_009828.2 cyclin A2	MB1865/ MB1866	GAGAATGTCAACCCGAAAA(246-265) AGTGATGCTGGCTGCCTCT(764-745)	519	ja
Ccnd1	NM_007631.2 cyclin D1	MB1827/ MB1828	GCGTACCCTGACACCAATCT(278-297) CACAACTCTCGGCAGTCAA(606-587)	329	ja
Ccne1	NM_007633.2 cyclin E1	MB1829/ MB1830	TGCAGATCGCAGAGCTTCTA(1019-1000) CTTTCTTTGCTGGGCTTTG(1324-1305)	329	ja
Cdh1	NM_009864.2 cadherin 1	MB1709/ MB1710	AGACTTTGGTGTGGGTGAGG(1624-1643) CAGGACCAGGAGAAGAGTGC(1888-1869)	265	ja
Cdh17	NM_019753.4 cadherin 17 / Li-Cadherin	MB1781/ MB1782	CAAGAGCCCTGGACAGAGA(385-404) ATGTCCTTCAACCGAGACCAC(791-772)	406	ja
Cdh2	NM_007664.4 cadherin 2	MB1711/ MB1712	GGGACAGGAACACTGCAAT(2414-2433) CGGTTGATGGTCCAGTTTCT(2622-2603)	209	nein
Cldn1	NM_016674.4 claudin 1(Cldn1)	MB1799/ MB1800	CTTTCTGCATCTGCCACTGA(169-188) CCACTAATGTCCGACACCT(619-600)	451	ja
Cldn2	NM_016675.4 claudin 2	MB1797/ MB1798	TTGCGCTTTCTCTGGACCTA(133-152) AGGATGTAGCCACCAAGTTG(423-404)	291	ja
Ctse	NM_007799.3 cathepsin E	MB1401/ MB1402	AGGAGTGACCCAGTGTGTTG(952-971) CTTCGGAGCAGAACATCACA(1190-1171)	239	ja
Cxcl12	NM_021704.3 Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12	MB1502/ MB1503	TTTCACTCTCGGTCCACCTC(47-66) TAATTTGGGTCAATGCACA(349-330)	303	ja
Cxcl12	NM_013655.4 Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12 transcript variant 2	MB1504/ MB1505	CCAACGTCAAGCATCTGAAA(246-265) AGGAAGGTAAAACCCACACA(1338-1330)	1094	ja
Cxcl2	NM_009140.2 chemokine (C-X-C motif) ligand 2	MB191/ MB192	TGTCAATGCCTGAAGACCC(152-170) AATAAGTGAACCTCAGACAGC(475-454)	324	ja
Fcgbp	NM_001122603.1 Fc fragment of IgG binding protein	MB1516/ MB1517	CCAAAACCTGGAGATGAGGA(6215-6234) CAGGCTACGGCAGAGATAGG(6835-6816)	621	ja
Gapdh	NM_008084.2 glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	MB1843/ MB1845	AACTTTGGCATTGTGGAAGG(543-562) CCCTGTTGCTGTAGCCGTAT(1014-995)	472	ja
Gif	NM_008118.3 gastric intrinsic factor	MB1167/ MB1168	ATCCTGATTGCCATGAACCT(257-276) GTTGCCACTGCTCCTGTGT(618-600)	362	ja

Gen Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning
Gkn1	NM_025466.1 gastrokine 1	MB1043/ MB1044	ACATTCGGACCAAAGATTGC(434-453) CACAAACCCCGAGAGAACT(672-653)	239	ja
Gkn2	NM_025467.1 gastrokine 2	MB591/ MB592	GGAGGCAATATCCAGGAGACAG(128-149) TAGGCGACCCAAACAGGAAC(446-427)	319	ja
Icam1	NM_010493.2 intercellular adhesion molecule 1	MD175/ MD176	TGTGCCATGCCTTTAGCTCC(1454-1473) ACAGTCTTGCTCCATCCACC(1876-1857)	423	ja
Ihh	NM_010544.2 Indian hedgehog	MB1771/ MB1772	TCAGACCGTGACCGAAATAA(903-922) ACACGCTCCCCGTTCTCTA(1090-1072)	188	ja
Il13	NM_008355.3 interleukin 13	MB279/ MB280	TCTTGCTTGCCCTTGGTGGTCT(98-118) GATGGCATTGCAATTGGAGATGTTG(314-290)	217	ja
Il1β	M15131.1 interleukin 1 beta	MD171/ MD172	GAACCAAGCAACGACAAAATAC(567-597) AGGCAAGTGAGGAAACACAG(1069-1051)	494	ja
Il4	NM_021283.1 interleukin 4	MB277/ MB278	AGGAGAAGGGACGCCATGCACGGA(210-233) ATCGAAAAGCCCGAAAGAGTCTCTG(406-382)	197	ja
Il-6	NM_031168.1 Interleukin 6	MB517/ MB518	CCTTCCCTACTTCACAAGTC(102-121) GTCCTTAGCCACTCCTTCTG(591-572)	490	ja
Infy	NM_008337.3 Interferon gamma	MB275/ MB276	TGACATGAAAATCCTGCAGAGC(291-312) CGCTGGACCTGTGGGTTGTTGACC(491-468)	201	ja
Jam1/F11r	NM_172647.2 F11 receptor	MB583/ MB584	ACAGCAGATGCCAAGAAAAC(600-619) ACCAGACGCCAAAATCAAG(855-836)	256	ja
Jam2	NM_023844.4 junction adhesion molecule 2	MB585/ MB586	GCATCAAAGACCACCGTCAAG(455-476) TTCACAGGCAGGAACAGCAG(787-768)	333	ja
Jam3	NM_023277.3 junction adhesion molecule 3	MB587/ MB588	GCATCATTACGGACTCACAG(172-191) TCACAGCAAGAACAATAAGGAC(789-768)	618	ja
Lgr5	NM_010195.2 leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5	MB1249/ MB1250	AGCAGACTACGCCCTTGGGA(890-908) CCTGATGTTGTTGCTGTGGA(1097-1078)	208	ja
LipF	NM_026334.3 lipase, gastric	MB1411/ MB1412	AAAACCTGGGTCCCAAAAACC(113-132) CAATCAAACCATGCTGCAAA(309-290)	197	ja
Lyz	NM_017372.3 lysozyme	MB1363/ MB1364	GCAAAGAGGGTGGTGAGAGA(370-389) GCTGAAGCTTGAGGAGGA(628-609)	259	ja
Mki67	NM_001081117.2 antigen identified by monoclonal antibody Ki67	MB1777/ MB1778	ATCAGGCAGACTTCCAGTG(1851-1870) TCTTGCTCGTCTGCTTTTGA(2122-2103)	272	ja
Mmp13	NM_008607.2 matrix metalloproteinase 13	MB1785/ MB1785	CAACCCTAAGCATCCCAAAA(863-882) GTCTTCCCGTGTCTCAAA(1225-1206)	363	ja
Mmp14	NM_008608.3 matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	MB1807/ MB1808	TTGATGGTGAAGGAGGGTTC(837-856) TTTGGGCTTATCTGGGACAG(1192-1173)	356	ja
Mmp1a	NM_032006.3 matrix metalloproteinase 1a (interstitial collagenase)	MB1809/ MB1810	CCTTCCCTTGCTGTTGCTTC(65-84) CACCTGGGCTTCTTCATAGC(322-303)	258	ja
Mmp2	NM_008610.2 matrix metalloproteinase 2	MB1801/ MB1802	GAAACCGTGGATGATGCTTT(709-728) CCATCAGCGTTCACACTT(986-967)	278	ja
Mmp3	NM_010809.1 matrix metalloproteinase 3	MB1803/ MB1804	CAGGTGTGGGTTTCTGATG(352-371) GCCTTGGCTGAGTGGTAGAG(777-758)	426	ja
Mmp9	NM_013599.2 matrix metalloproteinase 9	MB1805/ MB1806	GGTCGATCCAAACCTTCAA(322-341) AACACACAGGGTTTGCCTTC(875-856)	554	ja
Muc19	NM_207243.2 mucin 19	MB493/ MB494	GATTATGCGATTGGTTTCATCCT(22175-22196) GTGCAATGTCCCTGAACTCATA(22523-22502)	349	exon- intron unklar
Muc2	NM_023566.2 mucin 2	MB495/ MB495	AACACCAACACCAACACCC(4543-4562) TCTCCTCCACCAGCACATAG(4970-4951)	428	exon- intron unklar
Muc3	XM_355711.6 Mus musculus mucin 3, intestinal	MB380/ MB381	TTTCACTCCACTGCCACC(722-740) TCTTCAACCCACTTGTACATC(1147-1127)	426	exon- intron unklar
Muc4	NM_080457.3 mucin 4	MB378/ MB379	AGGCAGAAGAGGAGTGGAGAAG(10467-10488) AGCAGCCGCAAGGTGAAAG(10866-10847)	400	ja
Muc5ac	NM_010844.1 mucin 5, subtypes A and C, tracheobronchial/ gastric	MB281/ MB282	ATGTAATCCCTGGAGGCC(7972-7989) TACTGGAAGGCCCAAGC(8256-8238)	285	exon- intron unklar
Muc5ac	NM_010844.1 mucin 5, subtypes A and C, tracheobronchial/ gastric	MB1849/ MB1850	GCATCTGCACAAAGCCTACA(2078-2097) GTGTAATCGCAGTCCCAT(2777-2758)	700	ja
Muc5b	NM_028801.2 mucin 5, subtype B, tracheobronchial	MB384/ MB385	CTCCTCAATTCATAACAACCC(10644-10665) GTTTCCATGTCCCTTTTACC(10979-10959)	336	exon- intron unklar

Gen Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning
Muc6	NM_181729.2 mucin 6, gastric	MB382/ MB383	CACACAACCAACCAATTC(6726-6745) TGAGAAAGGTAGGAAGTAGAGG(7214-7193)	489	exon- intron unklar
Muc6	NM_181729.2 Mus musculus mucin 6, gastric	MB1853/ MB1854	CATGTCTAGGCCAGTGAGCA(7062-7081) GTGGGAAAAGAGCTGTGAGC(7685-7666)	624	exon- intron unklar
Ocln	NM_008756.2 occludin	MB1715/ MB1716	CCTCCAATGGCAAAGTGAAT(1150-1169) CTCCCCACCTGTCTGTAGT(1397-1378)	248	ja
Pdx1	NM_008814.3 pancreatic and duodenal homeobox 1	MB1145/ MB1146	CTGCCACCATGAACAGTGAG(101-120) TGTAGGCAGTACGGGTCTCTC(571-552)	471	ja
Pga5	NM_021453.4 pepsinogen 5, group I	MB1165/ MB1166	GCTTGGTCAAAAATCCCTCTG(144-163) AGAGATTCTGGGGGATGAGG(731-704)	588	ja
Pgc	NM_025973.3 progastricsin (pepsinogen C)	MB1169/ MB1170	TGGGTGTCTTCTGTCTACTGC(365-385) GCATGACGAGCAGAGAGGT(929-911)	565	ja
Pou5f1	NM_013633.2 POU domain, class 5, transcription factor 1	MB1775/ MB1776	CAGGAGTGGAAAGCAACTCA(348-367) AGATGGTGGTCTGGCTGAAC(593-574)	246	ja
Prom1	NM_001163577.1 prominin 1	MB1773/ MB1774	GAAAAGTTGCTCTGCGAAC(1780-1799) TCTCAAGCTGAAAAGCAGCA(1975-1956)	196	ja
Ptgs2	NM_011198.3 prostaglandin- endoperoxide synthase 2	MB1486/ MB1486	CACTACATCCTGACCCACTTCA(323-344) GGCAAAGAATGCAAACATCATA(664-643)	342	ja
Serpine1	NM_008871.2 serpin peptidase inhibitor, clade E	MB2050/ MB2051	TTGTGAAGGAGGACCGCCGC(41-60) TCGGTGGCCTGATGGGCTGT(255-236)	341	ja
Shh	NM_009170.3 sonic hedgehog	MB1769/ MB1770	CCTCTCCTGCTATGCTCCTG(2132-2151) GTGGCGTTACAAAGCAAAT(2379-2360)	248	nein
Snai1	NM_011427.2 snail homolog 1 (Drosophila)	MB1719/ MB1720	CGTGTGTGGAGTTCACCTTC(137-156) CGAGGTGGACGAGAAGGAC(414-396)	278	ja
Snai2	NM_011415.2 snail homolog 2 (Drosophila)	MB1721/ MB1722	AACATTTCAACGCCCTCCAAG(141-160) GCCCAAGGATGAGGAGTAT(371-352)	231	ja
Tff1	NM_009362.2 trefoil factor 1	MD7/ MD8	AAACATGTATCATGGCCC(128-145) GAATTCGAGGACTAAAAGTCTG(450-429)	323	ja
Tff2	NM_009363.3 trefoil factor 2 (spasmolytic protein 1)	MD5/ MD6	TTCCACCCTTCCAAC(242-258) AATGCTGTCTATAGCCACTG(551-532)	310	ja
Tff3	NM_011575.1 trefoil factor 3, intestinal (Tff3)	MD3/ MD4	CAGATTACGTTGGCCTGTCTCC(103-124) ATGCTTGCTACCCTGGACCA(357-337)	255	ja
Tff3	NM_011575.2 trefoil factor 3, intestinal	MB1847/ MB1848	TCTGGCTAATGCTGTTGGTG(52-71) TCAGATCAGCCTTGTGTTGG(443-424)	392	ja
Tjp1	NM_009386.2 tight junction protein 1	MB1851/ MB1852	AGCGCCAGGAAGCTATATGA(2656-2675) AGGACCGTGTAAATGCCAGAC(3040-3021)	385	ja
Tjp2	NM_001198985.1 tight junction protein 2,	MB567/ MB568	CAAACGCAAAAACAGAACCC(2407-2427) TCATCATCCATCCCTCCATC(2828-2808)	422	ja
Tjp3	NM_013769.2 tight junction protein 3	MB569/ MB570	ACCACAGAGATGCCAGAAG(2111-2129) CACAAAAGATGACGATGGGG(2300-2281)	190	ja
Tnc	NM_011607.3 tenascin C	MB1717/ MB1718	GTTTGGAGCCGCGAGAGAAG(5984-6003) TGGCTGAGTCTGTCTCTTGC(6243-6224)	260	ja
Tnfa	NM_013693.2 tumor necrosis factor	MD169/ MD170	GCCTATGTCTCAGCCTCTTC(946-965) CCCCCTCATCTTCTCCTTATC(1157-1138)	212	nein
Twist1	NM_011658.2 twist homolog 1 (Drosophila)	MB1723/ MB1724	GCTCAGCTACGCTTCTCC(865-883) GCCCTGATTCTTGTGAATTTG(1102-1082)	238	ja
Vim	NM_011701.4 vimentin	MB1713/ MB1714	CAGGATTCTCTGCCTCTGC(1348-1367) CGTCTTTGGGGGTGTCAGTT(1688-1669)	341	ja

Tab. 18: Primer Rattus norvegicus

Gen / Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning
Acta1 60°C	NM_019212.2 actin, alpha 1, skeletal muscle	MB1845/ MB1846	CGTGCCCTGCTATGTATGTGG(453-472) CTTTCCAGGGAGGAGGAAG(783-764)	331	ja
Acta2 57°C	NM_031004.2 smooth muscle alpha- actin	MB671/ MB672	CGATAGAACACGGGCATCATCAC(272-293) TCCAGAGCGACATAGCACAG(728-709)	457	ja
Actb 57°C	NM_031144.2 actin, beta	MB830/ MB831	AGGTCATCACTATCGGCAAT(818-837) CTCAGGAGGAGCAATGATCT(1084-1064)	266	ja
Actb- Promoter region 57°C	NW_047369.2	MB1510/ MB1511	TTCTCAATCTCGCTTCTC(28641-28660) GGTTTTATAGGACGCCACAG(28849-28830)	209	—
Adam15 57°C	NM_020308.1 Disintegrin and Metalloproteinase domain 15 (metargidin)	MB1012/ MB1013	GGCTTAAGCGGGATGTAGTA(698-717) GCCAGAGAAGGAAGTAACA(1024-1005)	327	ja

Gen / Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning
Akp3 60°C	NM_022680.1 alkaline phosphatase 3, intestine, not Mn requiring	MB1290/ MB1291	TGAATGTTGCCAAGAAGCTG(116-135) TGGTGTTCAGCTGGTCAAAT(427-408)	312	ja
Anpep 57°C	NM_031012.1 alanyl (membrane) aminopeptidase	MB1163/ MB1164	CCATCAGTACGAGATGGACA(538-557) GTTAGACAGAGCGGTGAGGT(763-744)	226	ja
Anxa2 57°C	NM_019905.1 annexin A2	MB997/ MB998	ACAAGACCGATCTGGAGAAG(494-513) ACCTTTCGAACACTTTCTGG(736-717)	243	ja
Apc 57°C	NM_012499.1 adenomatous polyposis coli	MB1001/ MB1002	TCCTTGCTGATCTTGACAAA(478-497) CATGCTTGCTCTGAGATGAC(798-779)	321	ja
Aqp1 57°C	NM_012778.1 aquaporin 1	MB503/ MB504	CACCCGCAACTTCTCAAAC(666-684) TTTGGGCTTCATCTCCACC(867-849)	202	ja
Aqp3 60°C	NM_031703.1 aquaporin 3	MB1368/ MB1269	ACCATCAACTTGGCTTTTGG(248-267) GTTGACGGCATAGCCAGAAT(721-702)	474	ja
Atp4b 57°C	NM_012510.2 ATPase,H+/K+ Exchanging, beta polypeptide	MB1174/ MB1175	TGCAGGAGAAGAAGTCATGC(186-205) AGATGCACAAGGCAAGAGC(353-334)	168	ja
Bak1 57°C	NM_053812.1 BCL2-antagonist/killer 1	MB901/ MB902	AACAGTGTCTTGGGTCAGGT(441-460) CAATCCATCTGGCAATGTAA(753-734)	313	ja
Bax 57°C	NM_017059.2 Bcl2-associated X protein	MB899/ MB900	AAGAAGCTGAGCGAGTGTCT(258-277) CAAAGATGGTCACTGTCTGC(618-599)	361	ja
Bmi1 60°C	NM_001107368.2 Bmi1 polycomb ring finger oncogene	MB1460/ MB1461	TGTGTCCTGTGTGGAGGGTA(138-157) TTACTTTCCGATCCGACCTG(528-509)	391	ja
Bmp2 60°C	NM_017178.1 bone morphogenetic protein 2	MB1242/ MB1243	GTTTGGCCTGAAGCAGAGAC(238-257) AAATTTTGAGCTGGCTGTGG(613-594)	376	ja
Bmp4 60°C	NM_012827.2 bone morphogenetic protein 4	MB1240/ MB1241	TGAGCCTTTCAGCAAGTTT(55-74) AGCCGGTAAAGATCCCTCAT(404-385)	350	ja
Bra1 57°C	NM_012514.1 breast cancer 1	MB897/ MB898	CTGCAGTGTGAGAGATCAGG(702-721) AATTCAGCTTTTCTGCATC(1022-1001)	321	ja
Bsg 57°C	NM_001109882.1 basigin transcript variant 1	MB1229/ MB1230	GTACACGGTGGATGCAGATG(658-677) CACACGCAGTGAGATGGTCT(1054-1035)	397	ja
C/Epb 57°C	NM_024125.4 CCAAT/enhancer binding protein	MB1037/ MB1038	CCTTTAGACCCATGGAAGTG(502-521) GAGGCTCACGTAACCGTAGT(785-767)	285	nein
Ca1 60°C	NM_001107660.1 carbonic anhydrase 1	MB1443/ MB1444	GCAACCAGTCAGTGTGAAA(310-329) GGGTCAAATTTGGTGAATGG(631-612)	322	ja
Casp3 57°C	NM_012922.2 caspase 3	MB934/ MB935	ACAGCAAAAGGAGCAGTTTT(379-398) TAACACGAGTGAGGATGTGC(774-755)	396	ja
Casp6 57°C	NM_031775.2 caspase 6	MB936/ MB937	AGGAGAGGAAGTCCCTAAT(262-281) GGCTCTGACACTTGTCTCCT(586-567)	325	exon- intron unklar
Casp8 57°C	NM_022277.1 caspase 8	MB938/ MB939	TACAGCTCTCCTACCCCTTG(292-311) TTCAAATCCTCCTTGTCCAT(670-651)	379	ja
Casp9 57°C	NM_031632.1 apoptosis-related cysteine peptidase	MB940/ MB941	CTGTCTATGGCACAGATGGA(909-928) GTCTCGATGTACCAGGAACC(1260-1241)	352	ja
Catna1 57°C	NM_001007145.1 catenin (cadherin associated protein), alpha1	MB767/ MB768	CCCATCCTCTACACTGCATC(723-742) ACCTCCTCTCGTTCCATTC(1321-1300)	599	ja
Cck 57°C	NM_012829.1 cholecystokinin	MB1075/ MB1076	TCAACTTAGCTGGACAGCAG(49-68) CACTTATCCTGTGGCTAGGG(390-381)	342	exon- intron unklar
Ccna2 57°C	NM_053702.3 cyclin A2	MB1857/ MB1858	GAGAATGTCAACCCCGAAAA(159-178) AGTGATGTCTGGCTGCCTCT(680-661)	522	ja
Ccnd1 57°C	NM_171992.4 cyclin D1	MB659/ MB660	AGAAGTTGTGCATCTACACTG(490-510) AGGAGAGGAAGTTGTTGGG(801-783)	312	ja
Ccne1 57°C	NM_001100821.1 cyclin E1	MB657/ MB658	CTTTTAGACCTGTGCGTCC(1013-1031) CTCACTGTCTGTCTTCTTAC(1390-1371)	378	ja
Cdc42 60°C	NM_171994.4 cell division cycle 42 (GTP binding protein)	MB1484/ MB1485	TTGTTGGTGATGGTGCTGTT(96-115) TCTCAGGCACCCACTTTTCT(374-355)	279	ja
Cdh1 57°C	NM_031334.1 cadherin 1	MB435/ MB436	TGAAGAGGGAGGTGGAGAAG(2406-2406) GGAGCTGAAAGACCACTGAC(2851-2832)	446	ja
Cdh1 57°C	NM_031334.1 cadherin 1	MB1017/ MB1018	CTGTATCCTCTGCTCCTTAC(2304-2323) CCACTCCCCTCATAGTCAA(2655-2636)	352	ja
Cdh17 57°C	NM_053977.2 cadherin 17	MB677/ MB678	CCTCACCCCATCAAATCAC(826-881) GCTACTACCCAAGACTTCATTC(1176-1155)	315	ja
Cdh2 57°C	NM_031333.1 cadherin 2	MB645/ MB646	GATGAAACGCCGGGATAAAG(2571-2590) GTCCCCAGTCATTCAGGTAG(3010-2991)	440	ja
Cdx1 57°C	XM_344691.5 caudal type homeo box 1	MB629/ MB630	TAAGACTCGGACCAAGGAC(468-485) TGCTGCTGCTGTTTCTTC(680-663)	213	ja
Cdx2 57°C	NM_023963.1 caudal type homeo box 2	MB595/ MB596	TTTGTGAATGGATGAGGAAGCC(600-621) AAGGAGTACAGGACTCAAG(963-943)	364	ja

Gen / Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning
Chga 57°C	NM_021655.2 chromogranin A	MB956/ MB957	GGGAAACAGTCAATCTCCAG(691-710) AGACTCCGACTGACCATCAT(1012-993)	364	exon- intron unklar
Chgb 60°C	NM_012526.1 chromogranin B	MB1904/ MB1905	TGAAGAAATGGTGACTION(150-169) ATCTACTGCCTCTCGACTGT(465-446)	316	ja (s)
Chgb 57°C	NM_012526.1 chromogranin B	MB1081/ MB1082	TCTCAAATGCCCTATCCAAG(185-204) CCTGTCCACTCCTCATTGTG(434-415)	250	ja
Clca3 57°C	XM_217689.4 chloride channel accessory 1	MB840/ MB841	GCCCCATAGGTAATGATGAG(343-362) TACGCACCTTCCGTTAGTGA(650-631)	308	exon- intron unklar
Clca4 57°C	NM_201419.1 chloride channel accessory 4	MB1415/ MB1416	CGAGAGAAACCAGCTTTTGG(1395-1414) CTTTTCCAAGGCAATGAAA(1618-1599)	224	ja
Cldn1 57°C	NM_031699.2 claudin 1	MB469/ MB467	GATGAAGTGCAAAAAGATGTGG(510-530) ACAGGAGCAGGAAAGTAGG(737-719)	228	ja
Cldn10 57°C	NM_001106058.1 claudin 10	MB797/ MB798	ACCGCCACTTATTTGGCC(538-555) TCCTTCTCCGCCTTGATAC(1056-1038)	519	ja
Cldn11 57°C	NM_053457.2 claudin 11	MB603/ MB604	CACCATCTGGTTTCCTGTATG(606-626) TAGACATGGCAGCTTTGG(800-800)	213	nein
Cldn11 57°C	NM_053457.2 claudin 11	MB603/ MB604	CACCATCTGGTTTCCTGTATG(606-626) TAGACATGGCAGCTTTGG(800-800)	213	nein
Cldn12 57°C	XM_001067835.1 claudin 12	MB799/ MB800	CCTCAAGCATTTAGAGAGAACC(894-915) CAACTCTCAATCCCTTCAACC(1239-1219)	346	ja
Cldn14 57°C	BC091387.1 claudin 14	MB801/ MB802	GACCACGAATGATGTGGTG(894-912) GATGAGAGACAGGGATGAGG(1008-989)	115	ja
Cldn15 57°C	NM_001107135.2 claudin 15	MB803/ MB804	ATACTTGCTGGAGCCTGTG(373-391) TGCCATATTTACCAAAGCTGAC(667-646)	295	ja
Cldn16 57°C	NM_131905.2 claudin 16	MB805/ MB806	ATGAGCCACACATTAAGTCC(647-667) AAACAACCCAAAGACCCAG(855-836)	209	ja
Cldn18 57°C	NM_001014096.1 claudin 18	MB809/ MB810	CATTGGCAGCATGGATGAC(347-365) AGCAATGCACATCATCACAC(617-598)	271	ja
Cldn19 57°C	NM_001008514.1 claudin 19	MB811/ MB812	AGGTGCTCTTCTCCTTTG(450-469) AACAGAGCTGGACCAAATTC(581-562)	132	ja
Cldn2 57°C	NM_001106846.2 claudin 2	MB468/ MB469	TGGGGCTATTAGGCACATC(395-413) GTGAGCAGGAAAAGCAGAG(907-889)	513	nein
Cldn20 57°C	NM_001060166.1 claudin 20	MB813/ MB814	TACTCCATTCTGTGCTGCC(202-220) ACATCGCTGAAATGAACCC(517-499)	316	nein
Cldn22 57°C	NM_001110143.1 claudin 22	MB815/ MB816	AGCTGAACGAGATGGAAGAAC(163-182) ATTGGACAGGGACATCAGG(311-293)	149	nein
Cldn23 57°C	NM_001033062.1 claudin 23	MB817/ MB818	ATGGATGTGCTTGAGGGGAGAAG(880-901) AGTCACAGGGCAGCGAATTTTG(979-958)	100	nein
Cldn3 57°C	NM_031700.2 claudin 3	MB824/ MB825	TTGCCACCTGATTACCTGG(1277-1295) TGAAAAATACGAAACGGCCC(1451-1432)	175	nein
Cldn4 57°C	NM_001012022.1 claudin 4	MB711/ MB712	CAACGAAAAGCCCTACTCC(758-776) GAATGTTTGCTAACATGACCAG(1198-1177)	441	nein
Cldn5 57°C	NM_031701.2 claudin 5	MB791/ MB792	CCCTGCTCAGAACAGACTAC(987-1006) TGCCCTTTTTAACGCATTCC(1232-1213)	246	nein
Cldn6 57°C	XM_001055688.1 claudin 6	MB793/ MB794	TGTCATCACCCCTCCTCATTG(281-300) TGACACCAGAGATGAGCAC(399-381)	119	nein
Cldn7 57°C	NM_031702.1 claudin 7	MB713/ MB714	CAACATCATCACAGCCAG(419-437) CTACCAAAGCAGCAAGACC(711-693)	293	ja
Cldn8 57°C	NM_001037774.1 claudin 8	MB795/ MB796	ACATTGTGCTGTTTGAGAACCC(118-138) GATGAAGAAGATGATCCAGCC(386-365)	269	nein
Cldn9 57°C	NM_001011889.1 claudin 9	MB1553/ MB1554	GGTGCTTCGGGACTTGATAA(982-1001) GGGACTGCTTGGGCTAGACT(1374-1355)	393	nein
Cif1 60°C	NM_017147.2 cofilin 1, non-muscle	MB1417/ MB1418	TGTGGCTGTCTGTGATGGAG(93-112) TCCTTGGAGCTGGCATAGAT(446-427)	354	ja
Cng 57°C	XM_227472.5 cingulin	MB769/ MB770	TTCAAATCCACCCAGACC(1270-1288) TCCTCTACTCGTTGTTTACCC(1859-1839)	590	ja
Col1a1 57°C	NM_053304.1 collagen, type I, alpha 1	MB1039/ MB1040	ACTGGCAACCTCAAGAAAGT(4219-4238) TGTTTTCAAAGTCCATGTG(4608-4589)	390	ja
Csda 57°C	NM_031979.2 cold shock domain protein A	MB763/ MB764	AGTTCTCGCCACCAAGTCC(409-428) GCTCAAATCCTTCACTGCTGC(779-759)	371	nein
Ctnnb1 57°C	NM_053357.2 catenin (cadherin associated protein) beta 1	MB691/ MB692	ACCCTACACAACCTTTCCC(655-673) TAGAGCAGACAGACAGCAC(1060-1042)	406	ja
Cxcl1 57°C	NM_030845.1 chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	MB970/ MB971	TAAAGGGTGTCCTCCAAAGTAA(323-342) ACACGATCCCAGACTCTCAT(680-661)	358	nein
Cxcl12 57°C	NM_001033882.1 Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12 (stromal cell derived factor 1, transcript variant 2)	MB954/ MB955	ATCAGTGACGGTAAGCCAGT(133-152) GTAGCAAAGTCAAAGCAAG(504-485)	372	ja
Cxcl2 57°C	NM_053647.1 chemokine (C-X-C motif) ligand 2	MB146/ MB147	GATCGTACTGATGTGCCTC(456-475) AAATAACAGTCGTCCTCCGCC(887-869)	432	nein

Gen / Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning
Cxcr4 57°C	NM_022205.3 chemokine (C-X-C motif) receptor 4	MB1350/ MB1251	GTGCAGCAGGTAGCAGTGAC(1-20) GCAGCCGGTACTTGTCTGTC(301-282)	301	ja
Defa 57°C	NM_173329.2 defensin, alpha 5, Paneth cell-specific	MB1439/ MB1440	GGACGCTCACTCTGCTTACC(81-100) TTCTTCTTGGTCGGAGTGCT(380-361)	300	ja
Dkk1	NM_001106350.1 dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	MB1886/ MB1887	TATGAGGGCGGGAACAAGTA(338-357) CAATGATGCCTTCTCGATT(611-597)	274	ja
Dmbt1 60°C	XM_577842.2 deleted in malignant brain tumors 1	MB1478/ MB1479	TCCAGATGGCCTTTGGTAAC(4523-4542) TGTGCTGGTGCTGATAGGAG(4977-4958)	455	exon- intron unklar
Dpp4 57°C	NM_012789.1 dipeptidylpeptidase 4	MB1161/ MB1162	CAAATTGGCATATGTCTGGA(568-587) ATTTGCATGGGAATCGTAGT(942-923)	375	exon- intron unklar
Dsg2 57°C	XM_226112.6 desmoglein 2	MB1419/ MB1420	AGTGAAGCGAGAGACGGTA (1143-1162) TCGTGACAAGGATGCTCAAG(1495-1476)	353	ja
Duox1 60°C	NM_153739.1 dual oxidase 1	MB1571/ MB1572	CCGTACAGTCTCTGGGTGCT(310-329) GAAACCACAACAAGCCAGT(788-769)	479	ja
Duox2 60°C	NM_024141.1 dual oxidase 2	MB1573/ MB1574	ACTGGGCTTGTGTGGTTTC(759-778) TGAATCTGGGAAGCCATT(1197-1178)	439	ja
Eda 57°C	XM_228582.6 ectodysplasin-A, transcript variant 1	MB1025/ MB1026	TTCTGGTCTGCTGATAAAA(893-912) TTGGTCTTCCCTGTCTCAAT(1201-1182)	309	ja
Efnb1 57°C	NM_017089.2 ephrin B1	MB739/ MB740	TTACATCAACATCCAATGGGAG(1152-1173) AGCTGCGAACAATGCTAC(1477-1460)	326	ja (s)
Efnb2 57°C	NM_001107328.2 ephrin B2	MB741/ MB742	AAAATACCCACTGCTCAAC(299-318) AGTGATGATGATGACGATGAAG(750-729)	452	ja
Efnb3 57°C	NM_001100980.2 ephrin B3	MB743/ MB744	GCTTCACCATCAAGTTCCAG(709-728) ATTTGAGACACAGGTTTTCCGG(925-905)	217	ja
Egf 57°C	NM_012842.1 epidermal growth factor	MB641/ MB642	CGATGGGACTGCCTCAATG(3337-3356) TTGCTGCTTGACTCTCCGG(3627-3609)	291	exon- intron unklar
Egfr 57°C	NM_031507.1 epidermal growth factor receptor	MB705/ MB706	AATGCTCTCTACGAAAACACC(481-501) CAGTTCTCTCTCTCTTCC(773-754)	293	ja
Eno2	NM_139325.3 enolase2, gamma, neuronal	MB1199/ MB1200	ATGGCAAATACGACTTGGAT(829-848) GTTTCTCCAGAGCGATGACT(1195-1176)	367	ja
Epcam 57°C	NM_138541.1 epithelial cell adhesion molecule	MB883/ MB884	TCTGTATGATCCCGAGTGTG(346-365) GGACTCCCCCTTACATCTT(739-720)	394	ja
Epdr1 57°C	NM_001007625.1 Ependymin related protein 1 (zebrafish)	MB358/ MB357	GAGGGACGTGAGGTTCTG(363-380) CTCCTGGACCGGGTAGC(749-733)	387	ja
Ephb1 60 °C	NM_001104528.1 Eph receptor B1	MB1900/ MB1901	TCAGTGGCAAGATGTGCTTC(1818-1837) CAATCGGCCCTTGACTACTT(2182-2163)	365	ja
Ephb2 60 °C	NM_001127319.1 Eph receptor B2	MB1898/ MB1899	AGCTTTTCCCAGGTGGATCT(436-455) GAGGTGGTACGGCTGTTGAT(890-871)	455	ja
Ephb3 60°C	NM_001105868.1 Eph receptor B3	MB1464/ MB1465	TAACGCTGTGGAGGTGCTG(1117-1136) TGTCGCTGTGCTGAGTCT(1388-1369)	272	ja
Ets1 57°C	NM_012555.2 v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	MB984/ MB985	TGGTAAAGATGCTTCCCTC(602-621) TCTTGCTTAGGCAAGTA(965-946)	364	ja
Ezr /Vil2 57°C	NM_019357.1 ezrin	MB1143/ MB1144	AGGAACAGATCTTTGGCTTG(1118-1137) TCTTCTCTCGGTTTCCAAC(1467-1448)	350	ja
Fabp2 57°C	NM_013068.1 fatty acid binding protein 2, intestinal	MB1293/ MB1294	GTGGTGAAGAGGAAGCTTGG(88-107) TGAGAAAAGGAATCCGACAC(474-455)	387	ja
Fap 57°C	NM_138850.1 fibroblast activation protein, alpha	MB1083/ MB1084	GCCTGCAGTGGAAATTAAGA(1516-1535) CTGTGAGCTGGTCTCAACT(1814-1795)	299	ja
Fat1 57°C	NM_031819.1 FAT tumor suppressor homolog 1	MB1015/ MB1016	CAGTGTCATCATCCAGGAAA(10533-10552) TCTCCAGAAGCAGTGATGAA(10868-10849)	336	ja
Fn1 57°C	NM_019143.2 fibronectin 1	MB675/ MB676	TTCTATCACCCCTCACCAACC(4712-4731) GACACTGATGCTGTTGTCC(5159-5141)	448	ja
Foxa2 57°C	NM_012743.1 forkhead box A2	MB777/ MB778	CGTACATCTCGCTCATCAC(677-695) TTGAGAAAGTCGTTGAAGGAG(842-822)	166	nein
Foxc2 57°C	NM_001101680.1 forkhead box C2	MB715/ MB716	AGAAGAAGATCACCTGAACG(681-701) TCGAACATATTGAGGAGTCCG(882-861)	202	nein
Gapdh 57°C	NM_017008.3 glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	MB751/ MB752	ACATCATCCCTGCATCCAC(683-701) CATACCAGGAAATGAGCTTAC(1012-991)	330	ja
Gast 57°C	NM_012849.1 gastrin	MB1397/ MB1398	AGATGCCTCGACTGTGTGTG(44-65) CATTGGTGGCCTCTGTTTCT(285-266)	242	ja
Gata4 57°C	NM_144730.1 GATA binding protein 4	MB1193/ MB1194	AACTGCCAGACTACCACCAC(1375-1394) TGTGCCCATAGTGAGATGAC(1690-1671)	316	ja

Gen / Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning
Gata5 57°C	NM_001024316.1 GATA binding protein 5	MB1195/ MB1196	GGCGATGAAAAGGAGAGTA(1159-1178) TGGTAACAGTTTCTGAGCA(1534-1515)	376	ja
Gata6 57°C	NM_019185.1 GATA binding protein 6	MB1197/ MB1198	TGCTCCACAGTTTACAGAGC(736-755) TTTCATAGCAAGTGGTCGAG(1115-1096)	380	ja
Gcg 60°C	NM_012707.2 glucagon	MB1910/ MB1911	TCGTGGCTGGATTGTTGTA(81-100) CAGCTATGGCGACTTCTTCC(482-463)	402	ja
Gif 57°C	NM_017162.2 gastric intrinsic factor	MB1167/ MB1168	ATCCTGATTGCCATGAACCT(193-212) GTTGCCACTGCTCCTGTGT(554-536)	362	ja
Gja1 57°C	NM_012567.2 gap junction protein, alpha 1	MB847/ MB848	CAAGGAGTTCACCAACTTT(131-150) ATGATCTGAAGGACCCAGAA(444-425)	314	ja
Gkn1 57°C	NM_198972.1 gastrokine 1	MB893/ MB894	CAGCAATGTAGACGGGAAGTG(122-141) ACTCTGGTAGGGTTGATGGA(412-393)	291	ja
Gkn2 57°C	NM_001039686.1 gastrokine 2	MB895/ MB896	ATCACAAAGGTGGACTGGTT(410-429) TGGAATGTTGGGAAGAATTT(674-655)	265	ja
Glp2r 57°C	NM_021848.1 glucagon-like peptide 2 receptor	MB1237/ MB1238	TCAGAATGCTCAGAGAACCA(469-488) ACTTTACAGATGAACGAAC(674-655)	206	ja (s)
Grb7 57°C	NM_053403.2 growth factor receptor bound protein 7	MB723/ MB724	ATCCCATGAAGACCTCATCC(1087-1106) GAGACCCAAATACGATAAGC(1541-1521)	455	ja
Gsc 57°C	NM_001191873.1 gooseoid homeobox	MB699 MB700	GTCTGGTTAAGAACC GCC(728-746) TCCGAGTCCAAATCGCTTTTAC(876-855)	150	nein
Gsl 57°C	NM_001004080.1 gelsolin	MB972/ MB973	AACTCCAATGATGCCTTTGT(1769-1788) CTTCTGAGAGTCTTTCCA(2156-2137)	388	ja
Hbegf 60°C	NM_012945.1 heparin-binding EGF-like growth factor	MB1427/ MB1428	TGGCTGTGGTGGCTGTAGTA(519-538) GGGTAGCAACTGGGAATGAA(789-770)	271	ja (s)
Hdac6 60°C	XM_228753.6 histone deacetylase 6	MB1235/ MB1236	AAAGGACACTGTGGGAGGTG(2924-2943) TCCTTGTGTCAGCATCAAGC(3245-3226)	322	ja
Hes1 57°C	NM_024360.3 Hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	MB695 MB696	CTACCCAGCCAGTGTCAAC(248-267) AAGCGGGTACCTCGTTCAT(572-533)	325	ja
Hgf 60°C	NM_017017.2 hepatocyte growth factor	MB1247/ MB1248	ACACATCTGTGGGGGATCAT(1693-1712) GTGCTGACTGCATTTCTC(2086-2069)	394	ja
Hmga2 57°C	NM_032070.1 high mobility group AT- hook 2 (Hmga2)	MB995/ MB996	CCTCTCCACCTCCAACCTCT(30-48) CAACACCTTTCGGGAGAC(332-315)	303	nein
Hnf1b 57°C	NM_013103.1 HNF1 homeobox B	MB1191/ MB1192	CACCTTGACGAATATCCACA(1272-1291) GGAGGTGTGGGAATACTGAG(1608-1589)	337	exon- intron unklar
Hox-1.5 57°C	XM_001058923.1 similar to homeobox- containing transcription factor (RGD1561431)	MB1155/ MB1156	ACAAATCTTTCCTGGATGA(801-820) GCATAGGTAGCGGTTGAAGT(993-974)	193	exon- intron unklar
Hspa4 57°C	NM_153629.1 heat shock protein 4	MB761/ MB762	GGTAGAGAAAAGCACCAATGAG(2424-2445) TCACCATCAGAAGGCACAG(2717-2699)	294	ja
Icam1 57°C	NM_012967.1 intercellular adhesion molecule 1	MB499/ MB500	TCCAATTCACACTGAATGCC(1124-1143) ACACACCAACAATTATGACCC(1531-1510)	408	ja
Il-1β 57°C	NM_031512.2 interleukin 1 beta	MB485/ MB486	AGCTACCTATGTCTTGCC(280-298) ACCGCTTTTCCATCTTCTTC(699-680)	420	ja
Il-6 57°C	NM_012589.2 interleukin 6	MB123/ MB124	AAGTCAACTCCATCTGCC(33-51) CATCATCGCTGTTCATACAATC(308-287)	276	ja
Ilk 57°C	NM_133409.2 integrin-linked kinase	MB844/ MB845	AAAGCAGGGACTTCAATGAG(755-774) TGCTGAGCGTCTGTTTGTAT(1182-1163)	428	ja
Iqgap1 57°C	NM_001108489.1 IQ motif containing GTPase activating protein 1	MB952/ MB953	CTGGCCTAAGAAGCTAACG(4481-4500) CCTCAATTCAGAAAGCACT(4834-4815)	354	ja
Itch 57°C	NM_001005887.1 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)	MB717/ MB718	CCCCTCACAGTTATCGTTACC(172-192) ATCTACTCTGCTCCACC(864-845)	693	ja
Itga4 57°C	NM_001107737.1 integrin, alpha 4	MB1153/ MB1154	AGCTTCTCTCTGGATGTGAG(2426-2445) CGAGGGAGAAAAGAAATTTG(2752-2733)	327	ja
Itgb1 60°C	NM_017022.2 integrin, beta 1	MB1488/ MB1489	CTCTCCAGAAGGTGGCTTTG(908-927) TGTGCCACTGCTGACTTAG(1247-1228)	340	ja
Jak3 60°C	NM_012855.1 Janus kinase 3	MB1407/ MB1408	GCAACATCTGGTGGAGAGT(2906-2925) CCCAATCATACGCAGGAAC(3165-3146)	260	ja
Jam1 57°C	NM_053796.1 F11 receptor junctional adhesion molecule A	MB497/ MB498	ACAGCAGATGCCAAGAAAAC(592-611) TCACACCAGGAATGACGAG(975-957)	384	ja
Jam2 57°C	NM_001004269.1 junctional adhesion molecule 2	MB707/ MB708	AAAACCCCAAGAAGACCAC(308-327) TTGAGAACATCTACTTGCATCC(861-840)	554	ja
Jam3 57°C	NM_001004269.1 junctional adhesion molecule 3	MB709/ MB710	GACTCACAGACAAATGACCC(186-205) TGACAGCACTGAAAACC(646-629)	461	ja
Jup 57°C	NM_031047.2 junction plakoglobin	MB950/ MB951	GACAAGGACGACATCACAGA(1730-1749) GATCTCTCCATCTCAC(2068-2050)	339	ja

Gen / Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning
Klf4 60°C	NM_053713.1 Krüppel-like factor 4 (gut)	MB1565/ MB1566	CTGAACAGCAGGGACTGTCA(1058-1077) GTGTGGGTGGCTGTTCTTTT(1275-1256)	218	ja
Krt19 60°C	NM_199498.1 keratin 19	MB1441/ MB1442	ATGAGCTGAACACCCAGGTC(897-916) GTGTCAGCACGCACGTTACT(1137-1118)	241	ja
Krt20 60°C	NM_173128.1 keratin 20	MB1257/ MB1258	CACCATCCGGGACTACAGTT(366-385) CCTCCACGTTGACATTGTTG(709-690)	344	ja
Lamb3 57°C	NM_001100841.1 laminin, beta 3	MB999/ MB1000	ACTCAGAGACCTGCCACTTC(1107-1126) TATCTTGCCGGGTACCTAAG(1469-1450)	363	ja
Lgals3 60°C	NM_031832.1 Lectin, galactoside- binding, soluble, 3	MB1356/ MB1257	ACTGGGGAAGGGAAGAAAGA(615-634) TTTCCCGCTCATACACACA(882-863)	268	ja
Lgals4 60°C	NM_012975.1 lectin, galactoside- binding, soluble, 4	MB1358/ MB1259	ACCTGCTGCATCCCAGTATC(471-490) TTGCGAACACACAAATCAC(761-743)	292	ja
Lgals7 57°C	NM_022582.2 Lectin, galactoside- binding, soluble, 5	MB653/ MB654	TTCCATGTAAACCTGCTATGC(102-122) CATTTCCTTGTGTTTGG(214-196)	113	nein
Lgr5 57°C	NM_001106784.1 leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5	MB1151/ MB1152	ACTGGAGCAAGATCTCGTC(1006-1025) TTATTCGGGCTAAGTTTCCAG(1226-1207)	221	ja
Lipf 60°C	NM_017341.1 lipase, gastric	MB1425/ MB1426	GTGGTGTATTTGCAGCATGG(279-298) ATCAAAGCTGAAAGCCAGAA(473-454)	195	
Lyz2 57°C	NM_012771.3 lysozyme 2	MB1159/ MB1160	ACTACAACCTGGAGACCAA(215-234) CTGAGAAGTGAAAGCCCTGT(591-572)	377	ja
Marvel 57°C	XM_345145.3 Marvel	MB765/ MB766	CTCTCCAGCAAGACCAAAC(371-389) CTATCTGACCTCCTTCTACCC(1038-1018)	668	ja
Mif 60°C	NM_031051.1 macrophage migration inhibitory factor	MB1735/ MB1736	CCATGCCTATGTTTCATCGTG(82-101) GAACAGCGGTGCAGGTAAGT(462-443)	381	ja
Mllt4/Af6 57°C	NM_013217.2 myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)/Afidin-1	MB771/ MB772	CTGAAGCCTATCCTATCCCTAC(3993-4014) TCCTCTCTCTTTTCTCTCTG(4584-4563)	592	ja
Mmp10 60°C	NM_133514.1 matrix metalloproteinase 10	MB1462/ MB1463	TGCTTTGTCTTTGATGCAG(910-929) TTTGGGTAACCTGCTTGGAC(1155-1136)	246	ja
Mmp13 57°C	NM_133530.1 matrix metalloproteinase 13	MB727/ MB728	CTAAGCACCCCAAACACC(837-855) CTCTCACAATGCGATTACTCC(1397-1377)	561	ja
Mmp13 57°C	NM_133530.1 matrix metalloproteinase 13	MB727/ MB1378	CTAAGCACCCCAAACACC(837-855) TTTTTGGGGTATTTCGCTGTC(1140-1122)	304	ja
Mmp14 60°C	NM_031056.1 matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	MB1379/ MB1380	GCTCCGAGGAGAGATGTTTG(1147-1166) TTTTTGGGGTATTTCGCTGTC(1518-1499)	372	ja
Mmp2 60°C	NM_031054.2 matrix metalloproteinase 2	MB1387/ MB1388	ACACTGGGACCTGTCACTCC(1675-1694) AGTGGCTTGGGGTATCCTCT(1964-1945)	290	ja
Mmp28 60°C	NM_001079888.1 matrix metalloproteinase 28	MB2032/ MB2033	CAGATACCGACAGTACAGAA(281-300) CCCATCATTTGTGGTCTCCTT(579-530)	299	ja
Mmp7 57°C	NM_012864.2 matrix metalloproteinase 7 (Mmp7)	MB667/ MB668	TCACCTACAGAATCGTGTCC(354-373) CACAGCTTGTCTCTTTCC(822-803)	469	ja
Mmp9 57°C	NM_031055.1 matrix metalloproteinase 9	MB483/ MB484	TTGATGCCATTGCTGATATCC(1571-1591) TGAGACTTCAAGTCGAATTTCC(1928-1907)	358	ja
Mrps18a 57°C	NM_198756.1 mitochondrial ribosomal protein S18A (Mrps18a), nuclear gene encoding mitochondrial protein	MB891/ MB892	AACTCCAGATCCCCCTAATC(184-203) CTTCTGGAGTAGCGGACATT(576-557)	393	ja
Msi1 57°C	NM_148890.1 Musashi homolog 1(Drosophila)	MB693/ MB694	CGAGCTCGACTCCAAAACAAT(249-266) GCTTCTTGCAATCCACC(551-534)	303	ja
Msi1 57°C	NM_148890.1 musashi RNA-binding protein 1	MB693/ MB694	CGAGCTCGACTCCAAAACAAT(249-269) GCTTCTTGCAATCCACC(551-534)	303	ja
Msn 57°C	NM_030863.1 moesin	MB1003/ MB1004	CCACTGAGGCAGAGAAGAAT(1624-1643) ATTTGGTCCCATGGTCATAC(1978-1959)	355	ja
Muc1 57°C	XM_342281.3 mucin 1, cell surface associated	MB836/ MB837	TTGGGCTTATCTTCAGTTCC(1222-1241) GAGCCTGACCTGAAGTTGAT(1544-1525)	323	exon- intron unklar
Muc2 60°C	U68172.1 mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming	MB1433/ MB1434	GGGACACGAATCCAATGAGA(350-369) CCAACACAGCCTAGAATACGG(724-705)	375	exon- intron unklar
Muc2 57°C	U07615.1 mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming	MB603/ MB604	GTCTCCTCCACACTAAGTCC(3766-3785) AGCAAAGTTCAAAGTCC(4120-4102)	355	exon- intron unklar

Gen / Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning
Muc3a 57°C	XM_001076797.1 similar to mucin 17 (LOC687030)	MB1435/ MB1436	TGAGCAAAGGCAGTATCGTG(479-498) GCCTCTTTCTTGACACACCTC(728-710)	250	ja
Muc5ac 57°C	XM_003749022.1 mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming	MB838/ MB839	CCAGGTACACCGATACCTTC(3724-3743) GGGGTCTTCACAGACGATAC(4112-4093)	389	ja
Mylk3 60°C	NM_001110810.1 myosin light chain kinase 3	MB1492/ MB1493	AACACCCGGGTAGTGAGCATC(1631-1650) GGGTGAAGCTGTTCTTGCTC(1897-1878)	267	ja
Myo6 57°C	XM_236444.7 myosin VI	MB703/ MB704	CACCAGAAGCACAAAGACC(1835-1853) TCCAGCACAGACACCATAC(2289-2271)	455	ja
Nanog 57°C	NM_001100781.1 Nanog homeobox	MB1147/ MB1148	GGATAGGTTTCAGAGGCCAAA(545-564) CAGACGCGTTCATCAGATAG(786-767)	242	ja
Nestin 57°C	NM_012987.1 nestin	MB1370/ MB1371	GATCGCTCAGATCCTGGAAG(961-980) GTATTAGGCAAGGGGAAGG(1218-1199)	258	ja
Neurog3 57°C	NM_00121700.1 neurogenin 3	MB1157/ MB1158	TCAGAGCTGCTGAAATGGA(1153-1172) AGAGCCAGTGAGGTAAGACG(1482-1463)	330	exon- intron unklar
Nid1 60°C	XM_213954.6 nidogen 1	MB1245/ MB1246	TTCGGCTCAGTAGCACCTTT(396-415) CACGGCAGGTACTTGGTTTT(749-730)	354	ja
Npy 57°C	NM_012614.1 neuropeptide Y	MB1071/ MB1072	GCTCTGCGACACTACATCAA(222-241) ACAACGACAACAAGGGAAAT(505-486)	284	ja
Nts 57°C	NM_001102381.1 neurotensin	MB1908/ MB1909	AGCTCCTTCCGTGCTGTGT(32-51) ATCTGCCTCCAGGACTCTCA(185-166)	154	ja
Ocln 60°C	NM_031329.2 occludin	MB479/ MB480	ACCCAGACCACTATGAAACC(1332-1351) TCTCACTTCTCCAGCAACC(1748-1730)	416	ja
Odc1 60°C	NM_012615.2 ornithine decarboxylase 1	MB1421/ MB1422	TGTTTCAGAGGCACATCGAG(362-381) AAGAGCTTTCAGCCACCTCA(566-547)	205	ja
Olfm4 60°C	NM_001106052.1 olfactomedin 4	MB1563/ MB1564	CACCACTTTTCCTGTGACA(295-314) TGGTCTAGCGTCTCCAGCTT(639-620)	345	ja
Pard3 57°C	NM_031235.1 par-3 (partitioning defective 3) homolog (C. elegans)	MB865/ MB866	AGCAGTGACCCAGCTTTAAC(686-705) GTCCAGTATCAGCATGTCCA(1037-1018)	352	ja
Pard6a 57°C	NM_001003653.1 par-6 (partitioning defective 6,) homolog alpha (C. elegans)	MB881/ MB882	TGAGAGGCTTTCAGGAGTTC(142-161) GTCGATGGGTCTCAGGTAGT(501-482)	360	ja
Pax2 57°C	NM_001106361.1 paired box 2	MB1019/ MB1020	GGTGAGAAGAGGAAACGAGA(621-640) GTCTGTGTGCCTGACACATT(1000-981)	380	ja
Pax6 57°C	NM_013001.2 paired box 6	MB1021/ MB1022	CCAACGGATGTGTGAGTAAA(306-325) GGTTGCGAAGAACTCTGTTT(548 -529)	243	ja
Pla2g2a 60°C	NM_0315983 phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	MB1437/ MB1438	CCCAGTTGCTGAAAGAGAC(487-505) GAGCCTCTCAGGACCTCTT(740-721)	254	nein
Plaur 57°C	NM_134352.1 plasminogen activator, urokinase receptor transcript variant 1	MB1009/ MB10010	GTTTCCATAGCAACCAGACC(557-576) TGCCATTACAGCAGGAGATA(892-873)	336	exon- intron unklar
Pou5f1 57°C	NM_001009178.1 POU class 5 homeobox 1	MB1149/ MB1150	CTAGCATTGAGAACCGTGTG(683-702) CAGAGCAGTGACAGGAACAG(1035-1016)	353	ja
Prdx6 60°C	NM_053576.2 peroxiredoxin 6	MB1656/ MB1657	TCATGGGGCATTCTTTTTC(114-133) GTTTCTGTGTCAGGGCCAAA(447-428)	334	ja
Prom1 57°C	NM_021751.2 prominin 1 (Prom1), transcript variant 1	MB779/ MB780	AGAATATGAGACCCAAGACACC(335-356) CAAAAGAAGAAGCCACCAG(583-864)	249	ja
Prom2 57°C	NM_138857.1 prominin 2	MB781/ MB782	GTTTACAGCTCAATGACTCC(1786-1806) ACATACTGAGAGAAGTAGCCC(2336-2316)	551	ja
Pten 60°C	NM_031606.1 phosphatase and tensin homolog	MB1288/ MB1289	AACTTGCAATCCCGAGTTTG(627-646) AGGTTTCTCTGGTCTGGT(859-840)	233	ja
Ptgs2 57°C	NM_017232.3 prostaglandin- endoperoxide synthase 2	MB867/ MB868	TACGCCTGAGTTTCTGACAA(165-184) CCTCAGAAGAACCCTTTTCCA(510-491)	346	ja
Ptpn11 60°C	NM_013088.2 protein tyrosine phosphatase, non- receptor type11	MB1403/ MB1404	GAGCAATGACAGCAAGTCCA(653-672) ATTCTTCCAAAAGCCCTGT(927-908)	275	ja
Ptpn12 60°C	NM_057115.2 protein tyrosine phosphatase, non- receptor type12	MB1405/ MB1406	CATTGTAATGGCCTGTCGTG(453-472) AGGCACATCTTCGTGCTCTT(747-728)	295	ja
Ptprf 57°C	NM_019249.1 protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	MB846/ MB847	ACATGGATGAAGAAGGAAAA(213-232) GAGGTCCCATGTGATAGTC(444-425)	232	ja
Pvrl1/nectin 1 57°C	XM_236210.6 poliovirus receptor-related 1 (nectin1)	MB501/ MB502	AGCTCCACAGAGACTTGAC(1648-1666) AGCACACAAGACAAGAACAG(1877-1858)	230	nein
Pxn 60°C	NM_001012147.1 paxillin	MB1482/ MB1483	GGGACGAGCAATCATTTTGT(691-710) CTGGGCCATGAACCTGAAAT(1075-1056)	385	ja

Gen / Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning
Reg3g 60°C	NM_173097.1 regenerating islet-derived 3 gamma	MB1449/ MB1450	TCAGGTGCAAGGTGAAGATG(91-110) GGATTCGCTCCCGAGTTGAA(435-416)	345	ja
Rere 60°C	NM_053885.2 arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats	MB1227/ MB1228	ACTCATCAGCACAGCAGCAG(2754-2773) GTGCTGTAGTAGGGGTCCA(3148-3130)	395	nein
Rgn 57°C	NM_031546.1 regucalcin (senescence marker protein-30)	MB863/ MB864	GGATGCCTTTGACTATGACC(623-642) TTGACCCCAAGACCTGTTAT(967-948)	345	ja
Rhoa 57°C	NM_057132.3 ras homolog gene family, member A	MB1366/ MB1367	AGGACCAGTCCCAGAGGTT(80-99) ACTATCAGGGCTGTCGATGG(273-254)	194	ja
RhoC 57°C	NM_001106461.1 ras homolog gene family, member C	MB747/ MB748	AGCAGGGCAAGAAGACTAC(444-462) TCTCAAATACCTCCCGCAC(781-763)	338	ja
Rps26 60°C	NM_013765.1 ribosomal protein S26	MB1494/ MB1495	CCAAGGATAAGGCCATCAAG(97-116) GCCTCTTTACATGGGCTTTG(359-340)	263	ja
Runx1 60°C	NM_017325.1 runt-related transcription factor 1	MB1567/ MB1568	CACTGCCTTTAACCTCAGC(1087-1106) CAGGAGCGAGTAGGTGAAG(1391-1372)	305	ja
S100a4 57°C	NM_012618.1 S100 calcium-binding protein A4	MB986/ MB987	AGTGTCCACCTTCCACAAAT(89-108) TAAGGCACTATGCTCACAGC(427-408)	339	ja
Serpine1 57°C	NM_012620.1 serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type1), member1	MB968/ MB969	AGGCACACCAAGGTATGAT(611-630) CATCTTTTTCAAAGGGTGTCT(920-901)	310	ja
Si 60°C	NM_013061.1 sucrase-isomaltase (alpha-glucosidase)	MB946/ MB947	GCCAACTCTGCTCTAACAT(3590-3609) TGCTGGAGCCAGTATAACAA(3953-3934)	364	exon- intron unklar
Sip1 60°C	NM_053389.1 survival of motor neuron protein interacting protein 1	MB689 MB690	AGCAGCAACAAGTGATACAG(354-373) CAAGCCAACAAGCATAGAAC(708-688)	355	ja
Slc6a2 60°C	NM_031343.1 solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2	MB1376/ MB1377	TGTCACCCTCGGTACCTTTC(1386-1405) CTCACGAACTTCCAACACA(1616-1598)	231	ja
Slc6a3 60°C	NM_012694.2 solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3	MB1374/ MB1375	CATGCTGCTCACTCTGGGTA(1324-1343) ATGCTGACCACGACCACATA(1704-1685)	381	ja
Slc6a4 57°C	NM_013034.3 solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	MB1073/ MB1074	TATCCCCACTGGAGTATCGT(1815-1834) GGCACCATAGTGGTTAGGAC(2118-2099)	304	ja
Smad3 57°C	NM_013095.3 SMAD family member 3	MB842/ MB843	TGCCTCAGTGACAGTGCTAT(1121-1140) TGACAAGACCAAGTTGGATG(1569-1550)	449	ja
Snai1 57°C	NM_053805.1 snail homolog 1 (Drosophila)	MB685/ MB686	TCTCACAGCAGTTTAACTGTCT(1358-1378) CCCAAAAAGTTCTGGGAGAC(1469-1449)	112	nein
Snai1 57°C	NM_053805.1 snail homolog 1 (Drosophila)	MB993/ MB994	GCAGAGTTGTCTACCGACCT(17-36) GGAAGGTGAACTCCACACAC(174-155)	158	ja
Snai2 57°C	NM_013035.1 snail homolog 2 (Drosophila)	MB687 MB688	ACTACAGCGAACTGGACAC(53-71) TACACGCCCCAAAGATGAG(258-240)	206	ja
Sox10 57°C	NM_019193.1 SRY (sex determining region Y)-box 10	MB697/ MB698	ACCCATCCCCAGAAATAACC(2230-2249) AGAGTGCCATTGAGTGTCC(2516-2247)	287	nein
Sparc 60°C	NM_012656.1 secreted protein, acidic, cysteine-rich(osteonectin)	MB1451/ MB1452	AAACATGGCAAGGTGTGTGA(277-296) AGGTGACCAGACGTTTTT(577-558)	301	ja
Sst 57°C	NM_012659.1 somatostatin	MB1069/ MB1070	GACCTGCGTCTAGACTGACC(5-24) CATCGTTCCTCTGCTGGTTG(259-240)	255	ja
Sv2a 57°C	NM_057210.2 vesicle glycoprotein 2a	MB958/ MB959	GGTTTGACTGTCTGGTTTCC(1440-1459) CTAGTGGGCAACCTTCCTTA(1809-1790)	370	ja
Sympk 57°C	NM_001100830.1 sympkin	MB1569/ MB1570	CTCTCCTGCCTCAGAACCAC(2491-2510) CTTTCTTCCAAGCCGTTG(2808-2789)	318	ja
Syt1 60°C	NM_001025651.1 synaptotagmin-like 1	MB1399/ MB1400	GACCAGGACCTGAAGCTGAG(166-185) GGACGAGGTCAGAACCAGAAA(405-386)	240	ja
Syt2 60°C	NM_001108492.1 synaptotagmin-like 2	MB1077/ MB1078	TACCTCAAGGAACCTTGTCT(489-508) TCTGACCTCTCCTTTCAG(798-779)	309	nein
Tagln 60°C	NM_031549.2 transgelin	MB1233/ MB1234	CAAGCCTTTTCTGCCTCAAC(33-52) ATTGAGCCACCTGTTCCATC(341-322)	309	ja
Tcf3 57°C	NM_133524.2 transcription factor 3	MB1041/ MB1042	GGCACTTACAGTGGGACTTC(956-975) CATCGTAGTTGGGGGATAAG(1211-1192)	256	ja

Gen / Annealing Temp.	Nr. und Bezeichnung	Institutsnr.	Primerpaare: 5'-3' forward und reverse	Produkt -größe	Intron- Spanning
Tff1 57°C	NM_057129.1 trefoil factor 1	MB43/44	GATCACTCGTGGTCTTCCC(1-19) ATCAGGCCGAATTTGAGGG(446-428)	446	ja
Tff1 60°C	NM_057129.1 trefoil factor 1	MB1547/ MB1548	CCCAGAACCAGGAAGAAACA(92-111) ACCAGTTCTCTCGGATGGAC(297-278)	201	ja
Tff2 57°C	NM_053844.1 trefoil factor 2	MB45/ MB46	GCAGAACACCCAGGTCCAG(1-19) CTTGAAAAGACACTGTGTC(556-538)	556	ja
Tff2 60°C	NM_053844.1 trefoil factor 2	MB1549/ MB1550	GTGCCCTCTCTTGGTAGTG(43-62) GGTTGAAAAGCAGCAGTGT(360-341)	318	ja
Tff3 57°C	NM_013042.1 trefoil factor 3	MB46/ MB47	GAAGTTTGCCTGCTGCCAT(1-19) GGACTCCAGCTCCTATAT(384-386)	384	ja
Tff3 60°C	NM_013042.1 trefoil factor 3	MB1551/ MB1552	GACTCCAGCATCCCAAATGT(198-217) GCAGATCAGGGGTGAGTGT(349-330)	152	ja
Tgfa 57°C	NM_012671.2 transforming growth factor alpha	MB597/ MB598	CTCACTTCAACAAGTGCCC(266-284) ACAATGGAGACTACCACCA(467-448)	202	ja
Tgfb1 57°C	NM_021578.2 growth factor, beta 1	MB960/ MB961	CGGACTACTACGCCAAAGAA(447-466) TATCCGTCTCCTTGGTTCA(787-768)	341	ja
Tgfb2 57°C	NM_031131.1 transforming growth factor, beta 2	MB962/ MB963	CTTCGCCCTCTTTACATTGA(1346-1365) CATTGTACCCGTGATTTTCA(1676-1657)	331	ja
Tgfb3 57°C	NM_013174.1 transforming growth factor, beta 3	MB964/ MB965	TTTCCGTTTCAATGTGTCT(791-810) TTTGATTTCCATCACCTCGT(1145-1126)	355	ja
Timp1 57°C	NM_053819.1 TIMP metalloproteinase inhibitor 1	MB731/ MB732	ATTGATAGCTTCCAGTAAAGCC(83-104) ATGTGCAAAATTTCCGTTCC(391-373)	309	ja
Timp1 57°C	NM_053819.1 TIMP metalloproteinase inhibitor 1	MB834/ MB835	AGATGCTCAAAGGATTCGAC(235-254) GATCTGTCCACAAGCAATGA(552-533)	318	ja (s)
Tjp1 57°C	NM_001106266.1 tight junction protein 1	MB481/ MB482	TATCCAAACCAGACCCACC(4378-4396) CCTCATCTTCATCTTCCAC(4848-4827)	471	ja
Tjp2 57°C	NM_053773.1 tight junction protein 2	MB735/ MB736	CCCTCATCAACATCCCATCTC(1413-1433) CCAGCCACAATATGCCAAC(1860-1841)	448	ja
Tjp3 57°C	NM_001108073.1 tight junction protein 3	MB733/ MB734	TTGCTATGAAGAGACTGACAAC(2024-2045) AGAAGATGACGACAGGGTAG(2227-2208)	204	ja
Tmprss4 60°C	NM_001108998.1 transmembrane protease, serine 4	MB1413/ MB1414	AGTGGCAGGTTGTAGGCATC(1449-1468) AGGCTCTTGTCCCATGTCTG(1659-1640)	211	ja
Tnc 57°C	DQ916292.1 tenascin C partial cds	MB729/ MB730	AAGCGGGCATAAATCCCAG(68-86) CCAGAACCACCCAGTAGAAG(365-346)	298	exon- intron unklar
Tnc 60°C	NM_053861.1 tenascin C	MB1855/ MB1856	GGGCAGACATAAGAGCAAG(3212-3230) TCAACAGAGAGAGGGGCTGT(3790-3771)	579	exon- intron unklar
Tnc 60°C	NM_053861.1 tenascin C	MB1894/ MB1895	AGCAGACTGGAGGAATGGA(411-430) TGCAGTTGTTGAAGCAAAGG(906-887)	496	exon- intron unklar
Tnc 60°C	NM_053861.1 tenascin C	MB1896/ MB1897	GTGAGGACGGCCAATGTATC(1759-1778) CAGGGATGCTCCTCTTGTTC(2151-2132)	393	exon- intron unklar
Tns4 60°C	NM_001024881.1 tensin 4	MB1352/ MB1253	CTCCAGAAAGTCCCTGCCAAG(1402-1421) TAGAATGCTGGCACACGAAG(1749-1730)	348	ja
Trim28 57°C	NM_053916.1 tripartite motif-containing 28	MB1007/ MB1008	GCTGGCTACCGACTCTACAT(2452-2471) ACCAGACAGCTCCTGAGAAC(2773-2754)	322	ja
Twist1 57°C	NM_053530.2 twist homolog 1 (Drosophila)	MB991/ MB992	CCGGAGACCTAGATGTCATT(820-839) CTCTGGGAATCTCTGTCCAC(1024-1005)	205	ja
Vangl1 57°C	NM_001109584.1 planar cell polarity protein 1	MB832/ MB833	TCGTGCAATATGCAGTCTCT(873-892) TTACTGGGCCCATCTACATT(1173-1154)	301	ja
Vcl 57°C	NM_001107248.1 vinculin	MB966/ MB967	GGCTGAGGTTCCGAAAATTA(472-491) ATCCCAGGAGGTGAGTTGTA(850-831)	379	ja
Vegf 57°C	NM_031836.2 Vascular endothelial Growth factor A	MB302/ MB303	TTACTGCTGTACCTCCACC(1054-1072) AAATGCTTTCTCCGCTCTG(1541-1523)	488	ja
Vil1 60°C	NM_001108224.2 villin 1	MB1409/ MB1410	GCTCTTTGAGTGCTCCAACC(2050-2069) TCCACTTTGGGGCTCATAAAC(2442-2423)	393	ja
Vim 57°C	NM_031140.1 vimentin	MB673/ MB674	TTTCAAAGCCTGACCTCAC(859-877) GAGAAATCTGCTCTCCTCC(1317-1298)	459	ja
Vtn 57°C	NM_019156.2 vitronectin	MB948/ MB949	GATGTGTTTACCATGCCAGA(275-294) AGCAATACTCACCTCGGAAG(614-595)	340	ja
Wnt11 57°C	NM_080401.1 Wingless-type MMTV Integration site family member 11	MB775/ MB776	TTCAAATCCACCAGACC(1270-1288) TCCTCTACTCGTTGTTTACCC(1859-1839)	590	ja
Ybx1 57°C	NM_031563.3 Y box binding protein 1	MB1005/ MB1006	GCCAAAGACAGCCTAGAGAG(869-888) TCAGCTCCAATCTTTGTTCA(1193-1174)	325	ja
Zeb1 60°C	NM_013164.1 zinc finger E-box binding homeobox 1	MB1231/ MB1232	CCAGATGCATTTCCAGTT(338-357) CAGAAAGCGGTTCTTGAAGG(707-688)	370	ja