

Dipl. Biol. Eva Barbara Znalesniak

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

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 neuroendokrin-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 ACTA2) 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 und CLDN1 (auch in migrierenden Zellen). CLDN2 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). Hier konnten entsprechend ihrer Migrationsweise bzw. der Herkunft deutlichere Anzeichen einer EMT beobachtet werden. Neben einem motogenen Effekt induzierte die EGF-Behandlung bei verschiedenen Zelllinien vor allem die Transkription von MMP1. Dabei konnte unterschiedliche Responsivität von stationären und migrierenden Zellen auf EGF beobachtet werden.

Rekombinantes TFF2 und TFF3 zeigte in 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 zeigte. Nach Verwundung hatte TFF3 einen induzierenden Effekt auf die durch TNF α erhöhte Expression von MMP9.

Außerdem unterstreicht der nachgewiesene Anstieg der Expression von TFF1 und TFF2 in der Mikroglia-Zelllinie BV-2 nach LPS-Behandlung die mögliche Rolle von TFF-Peptiden in der Regulation von inflammatorischen Prozessen des zentralen Nervensystems.

Dipl. Biol. Eva Barbara Znalesniak

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

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 neuroendocrine 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 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 the origin of cells, there were indications for more pronounced EMT.

In addition to the motogenic and migration-pattern altering effects, EGF treatment particularly induced the transcription of MMP1. However stationary cells differed from migratory cells in the response to EGF.

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.

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.