

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Anatomie II – Neuroanatomie

Einfluss eines *Trefoil Factor Family Peptid 1 (TFF1)* Knockdowns auf
Wachstumsverhalten und Tumorigenität humaner Retinoblastomzelllinien

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Janina Jasmin Wirtz
aus
Essen
2023

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/78962

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20231114-071143-3

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. N. Dünker
2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. M. Fiorentzis

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 2023

Teile dieser Dissertation sind bereits veröffentlicht:

Publikationen:

Busch, M., Große-Kreul, J., **Wirtz, J.J.**, Beier, M., Stephan, H., Royer-Pokora, B., Metz, K., und Dünker, N. (2017): Reduction of the tumorigenic potential of human retinoblastoma cell lines by TFF1 overexpression involves p53/caspase signaling and miR-18a regulation. *Int J Cancer* 141, 549-560

Posterpräsentationen:

Wirtz, J. und Dünker, N. (2015) TFF1 knockdown effects RBL-15 and RBL-30 retinoblastoma cell behavior. Posterpräsentation im Rahmen des 11. „NeuroVisionen“-Kongresses am Universitätsklinikum Münster.

Wirtz, J. und Dünker, N. (2015) Effects of Trefoil factor family peptide 1 (TFF1) knockdown on retinoblastoma cell viability and growth. Posterpräsentation im Rahmen des 14. Forschungstages der Medizinischen Fakultät am Universitätsklinikum Essen.

Wirtz, J.J. und Dünker, N. (2016) Impact of Trefoil factor family peptide 1 (TFF1) knockdown on RBL-15 and RBL-30 retinoblastoma cell behavior. Posterpräsentation im Rahmen des 15. Forschungstages der Medizinischen Fakultät am Universitätsklinikum Essen.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG.....	7
1.1 Das Retinoblastom.....	7
1.1.1 Ätiologie und Pathogenese.....	7
1.1.2 Klinik und Therapie.....	10
1.2 TFF Peptide.....	14
1.2.1 Pathologische Bedeutung von <i>TFF1</i> in malignen Erkrankungen.....	16
1.3 Zielsetzung und Fragestellungen.....	20
2 MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1 Zelllinien.....	22
2.2 Zellkulturmedien.....	22
2.3 Bakterienkulturmedien.....	23
2.4 Chemikalien und Reagenzien.....	23
2.5 Basispuffer.....	26
2.6 Antikörper.....	26
2.7 Kommerzielle Kits.....	27
2.8 TaqMan® Gene Expression Assays.....	27
2.9 Plasmid-Vektoren.....	27
2.10 Geräte.....	28
2.11 Software.....	30
2.12 Verbrauchsmaterialien.....	30
2.13 Molekularbiologische Methoden.....	32
2.13.1 RNA- und miRNA-Isolation.....	32
2.13.2 RNA Konzentrationsbestimmung.....	32
2.13.3 cDNA Synthese (Reverse Transkription).....	32
2.13.4 Quantitative <i>Realtime</i> RT-PCR.....	33
2.13.5 Produktion von Plasmid-DNA.....	35
2.13.5.1 Herstellung der Plasmide.....	35
2.13.5.2 Bakterientransformation.....	35
2.13.5.3 Isolation von Plasmid-DNA.....	36

2.14	Proteinbiochemische Methoden	36
2.14.1	Protein-Isolation.....	36
2.14.2	Konzentrationsbestimmung	37
2.14.3	Gelelektrophorese	37
2.14.4	Western Blot.....	39
2.15	Zellkulturtechnik	40
2.15.1	Kultivierung und Subkultivierung der Zellen	40
2.15.2	Adhärenz und Fixierung auf Deckgläsern	41
2.15.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	41
2.15.4	Zellzahlbestimmung.....	41
2.15.5	Transfektion von HEK-293T.....	42
2.15.6	Lentivirale Transduktion.....	43
2.15.7	Caspase-Inhibition.....	44
2.16	Funktionelle <i>in vitro</i> Analysen	44
2.16.1	WST-1 Viabilitätsassay.....	44
2.16.2	5-Bromo-2'desoxyuridin Zellproliferationsassay.....	45
2.16.3	4',6-Diamidin-2-phenylindol Zelltodassay.....	46
2.16.4	Aktivierte Caspase-3 Immunfluoreszenz Assay	47
2.16.5	Wachstumskinetik.....	48
2.16.6	Soft Agarose Assay	48
2.17	Funktionelle <i>in ovo</i> Analysen	49
2.17.1	CAM Assay: Spontan-Metastasen-Modell.....	50
2.17.2	CAM Assay: Experimentelles-Metastasen-Modell.....	52
2.18	Histologische Methoden	55
2.18.1	Gewebeaufarbeitung	55
2.18.2	4',6-Diamidin-2-phenylindol-Färbung	55
2.18.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	55
2.19	Statistik.....	56
3	ERGEBNISSE.....	57
3.1	Auswahl der verwendeten Retinoblastomzelllinien	57
3.2	Etablierung eines stabilen <i>TFF1</i> Knockdowns in Retinoblastomzelllinien	59
3.3	Nachweis des stabilen <i>TFF1</i> Knockdowns	60
3.4	Untersuchungen zum Einfluss des stabilen <i>TFF1</i> Knockdowns auf die Zellviabilität	61
3.5	Untersuchungen zur Wachstumskinetik und Proliferation nach stabilem <i>TFF1</i> Knockdown	62

3.6	Untersuchungen zum Einfluss des stabilen <i>TFF1</i> Knockdowns auf das Apoptoseverhalten	64
3.6.1	DAPI Zelltodassay und Caspase-Abhängigkeit nach <i>TFF1</i> Knockdown....	64
3.6.2	Analyse der endogenen Apoptose in der Zelllinie RBL-30	66
3.7	Untersuchungen zum Einfluss des stabilen <i>TFF1</i> Knockdowns auf Zellkontakt-unabhängiges Wachstum	67
3.8	CAM Assay nach <i>TFF1</i> Knockdown in Retinoblastomzelllinien	69
3.8.1	Tumorbildungsrate und Invasivität nach Inokulation.....	69
3.8.2	Zellmigration nach Injektion	73
4	DISKUSSION	75
4.1	Evaluation des lentiviralen <i>TFF1</i> Knockdowns in Retinoblastomzelllinien.....	78
4.2	Einfluss des <i>TFF1</i> Knockdowns auf das Proliferations- und Apoptose-Verhalten von Retinoblastomzellen	79
4.3	Einfluss des <i>TFF1</i> Knockdowns auf das Migrations- und Invasivitäts-Verhalten von Retinoblastomzellen	86
4.4	Überprüfung der Hypothese einer Auto- und/oder Kreuzinduktion der TFF Peptide nach <i>TFF1</i> Knockdown	90
5	ZUSAMMENFASSUNG	92
6	LITERATURVERZEICHNIS	93
7	ANHANG.....	100
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	100
7.2	Tabellenverzeichnis.....	101
7.3	Abkürzungsverzeichnis.....	102
8	DANKSAGUNG	
9	LEBENS LAUF.....	

1 EINLEITUNG

1.1 Das Retinoblastom

Das Retinoblastom ist der häufigste maligne intraokuläre Tumor des Kindesalters (Villegas et al., 2013) und tritt mit einer globalen Inzidenz von 1 : 16000 - 18000 Lebendgeburten auf, sodass jährlich weltweit voraussichtlich 8000 neue Fälle auftreten (Dimaras et al., 2015; Bornfeld et al., 2020).

Als embryonaler Tumor tritt das Retinoblastom v.a. bei Säuglingen und Kleinkindern vor dem 5. Lebensjahr auf. Die Diagnose wird in 80% der Fälle vor dem 3. Lebensjahr gestellt. Kinder über 6 Jahren entwickeln sehr selten ein Retinoblastom, sodass eine Diagnosestellung nach dem 6. Lebensjahr außerordentlich selten ist (Yiallourous, 2016).

Das Überleben von am Retinoblastom erkrankten Kindern hängt vom Entwicklungsstand des Landes ab (Dimaras et al., 2015; Villegas et al., 2013). Die 5-Jahres Überlebensrate der Kinder, bei denen zwischen 1940 bis 2008 in Deutschland ein erbliches Retinoblastom diagnostiziert wurde lag bei 93,2% (Temming et al., 2016). Die Gesellschaft des epidemiologischen Krebsregisters des Robert-Koch-Instituts hat für Deutschland aus den Jahren 2004-2013 für das Retinoblastom eine 15-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 97% ermittelt (Kaatsch und Spix, 2019). In Entwicklungsländern mit eingeschränkter medizinischer Versorgungssituation ist das Retinoblastom hingegen mit einer hohen Mortalität verbunden. So zeigt sich beispielsweise in Indien eine Überlebensrate von 48% und in Afrika von 20 – 46% (Villegas et al., 2013).

1.1.1 Ätiologie und Pathogenese

Das Retinoblastom ist eine Modellerkrankung für die Entstehung von Krebs, seit die „*Two-Hit-Hypothese*“ (Knudson, 1971) publiziert wurde: Hierbei wurde basierend auf statistischen Daten die Hypothese formuliert, dass die Entstehung des Retinoblastoms auf 2 Mutationen basiert. Bei der erblichen Variante des Retinoblastoms entstehe die erste Mutation in der Keimbahn, sodass nur eine somatische Mutation notwendig sei, damit beide Allele *RB1*-Defizient sind. Bei der nicht-erblichen Entstehung des Retinoblastoms seien hingegen zwei somatische Mutationen ursächlich und notwendig (Knudson, 1971).

In der Weiterentwicklung der *Two-Hit-Hypothese* wurde die Inaktivierung beider Allele des verantwortlichen Gens im Sinne des Verlustes einer Tumorsuppressor-Funktion als Ursache des Retinoblastoms beschrieben (Comings, 1973). Das *RB1*-Gen war nach seiner

Lokalisierung auf Chromosom 13q14 1986 das erste im Menschen identifizierte Tumorsuppressorgen (Comings, 1973; Friend et al., 1986; Knudson, 1971).

Ursächlich für die Manifestation eines Retinoblastoms ist in der Regel die Mutation beider Allele des *RB1*-Gens (Villegas et al., 2013). Es gibt diverse Pathologien, die zu einem Funktionsverlust von *RB1* führen. Hier sind unter anderem Missense-, Nonsense- und Splicing- Mutationen, sowie Deletionen und Insertionen zu nennen, aber auch Veränderungen der Methylierung in der Promotorregion können das *RB1*-Gen inaktivieren, ohne die DNA-Sequenz selbst zu verändern (Berry et al., 2019). Der Großteil der *RB1* Mutationen im ersten mutierten Allel (M1) besteht aus Punktmutationen oder kleinen Deletionen, während das zweite Allel (M2) meist einen *Loss of Heterozygosity* durch *Non-Disjunction* zeigt. Diese zwei Ereignisse führen dann zu einer Homozygotie der *RB1* Mutation (Corson und Gallie, 2007).

Da das Retinoblastom-Protein (pRB), das auf dem *RB1*-Gen kodiert wird, eine entscheidende Rolle für die Regulationsmechanismen von Zellzyklus, Zelldifferenzierung und Apoptose spielt, kann der Funktionsverlust von pRB zu unregulierten Zellzyklen, fehlerhafter Zelldifferenzierung und Apoptose führen (Corson und Gallie, 2007). Die physiologische Funktion von pRB in gesunden Zellen wurde über viele Jahre erforscht. Hierbei wurde gezeigt, dass pRB über seine hyperphosphorylierte Form mit dem Transkriptionsfaktor E2F interagiert. Dies führt durch die Blockade des Übergangs aus der G1-Phase in die S-Phase zur Hemmung des Zellzyklus und trägt somit zum Schutz gesunder Zellen vor unkontrollierter Zellproliferation bei (Berry et al., 2019). Viele Studien haben gezeigt, dass der Verlust beider *RB1*-Allele nicht nur mit Retinoblastomen assoziiert ist, sondern auch z.B. mit Osteosarkomen, Melanomen und Weichteilsarkomen (Berry et al., 2019).

Der Verlust beider *RB1*-Allele und der damit einhergehende Funktionsverlust von pRB führt allerdings nicht grundsätzlich zur Entstehung von Tumoren. Je nach Gewebe und Modell konnte z.B. auch Apoptose-vermittelter Zelltod oder eine Hemmung der Proliferation nachgewiesen werden. Bereits 1999 wurde die Vermutung geäußert, dass weitere Mutationsereignisse für die Entwicklung eines Retinoblastoms notwendig sind. In Anlehnung an Knudsons Nomenklatur des M1 und M2 Ereignis können diese als M3 bis Mn Ereignisse bezeichnet werden (Corson und Gallie, 2007).

In seltenen Fällen kann statt dem Verlust des *RB1*-Gens eine gesteigerte Amplifikation des Onkogens *MYCN* ursächlich für ein unilaterales (nicht-erbliches) Retinoblastom sein. Bei dieser seltenen, nicht-erblichen Form des Retinoblastoms sind beide Allele des *RB1*-Gens erhalten, und somit liegt die Ursache nicht bei dem Verlust des Tumorsuppressorgens *RB1*, sondern in der Amplifikation des Onkogens *MYCN*. Diese somatische *MYCN* Amplifikation

liegt allerdings nur 2% der unilateralen Retinoblastome zugrunde, die restlichen 98% weisen den typischen M1 und M2 Verlust des *RB1* Gens auf (Rushlow et al., 2013).

MYCN Amplifikationen sind auch bei Retinoblastomen des von Liu et al. (2021) beschriebenen Subtyps 2 von Bedeutung. Tumoren dieses Subtyps weisen zusätzlich zur *RB1* Mutation weitere genetische Veränderungen auf. Neben *MYCN* Amplifikationen, welche hierbei in 17% der dem Subtyp 2 zugeordneten Tumoren nachgewiesen werden konnten, zeichnet sich hier eine Relevanz von *TFF1* ab, da *TFF1* in Tumoren des Subtyps 2 im Vergleich zu Subtyp 1 hochreguliert ist (Liu et al., 2021).

Bei der Erforschung der Ursprungszelle des Retinoblastoms an Mausmodellen wurden verschiedene Zelltypen der Retina in Betracht gezogen, u.a. Amakrinzellen, Horizontalzellen und Vorläuferzellen der Müller Glia. Zudem wurden Vorläuferzellen von Zapfen sowie retinale Progenitorzellen als mögliche Ursprungszelle angesehen (Liu et al., 2020). An humanen fetalen Retinazellen konnte gezeigt werden, dass vor allem Vorläuferzellen von Zapfen nach *RB1* Knockdown zur Proliferation und Ausbildung Retinoblastom-artiger Tumore beitragen (Xu et al., 2014) und auch bei Forschungsarbeiten an humanen retinalen Organoiden wurden reife Zapfen Vorläuferzellen als Ursprungszellen der Retinoblastom Organoide nach *RB1* Mutation bzw. Knockout identifiziert (Liu et al., 2020). Zudem unterstützt der weit verbreitete Nachweis der Expression von Zapfen Genen in Retinoblastomen mittels Genexpressionsanalysen das Modell von Zapfen als Ursprungszelle des Retinoblastoms (Kaewkhaw und Rojanaporn, 2020). Insgesamt ist der aktuelle Konsens der Forschungsgemeinschaft, dass Zapfen-Vorläuferzellen die Ursprungszelle des Retinoblastoms darstellen (Liu et al., 2021).

Der Begriff „Retinom“ wurde 1982 durch Gallie et al. (1982) eingeführt und beschreibt benigne retinale Tumore, die als mögliche Vorstufe eines Retinoblastoms bzw. als Zwischenstadium zwischen prä-malignen Zellen und Tumorzellen angesehen werden (Gallie et al., 1982; Dimaras et al., 2008; Liu et al., 2020). Genauso gibt es aber auch Retinoblastome, die ohne nachweisbare Retinome entstehen (Dimaras et al., 2008).

Retinome können als benigner Tumor bestehen bleiben oder zu malignen Zellen im Sinne eines Retinoblastoms entarten. In diesem Konzept führt der Verlust beider *RB1*-Allele im Sinne von Knudsons M1 und M2 Ereignis zur Ausbildung von Retinomen als benigne Vorstufen des Retinoblastoms. Demnach kommt es erst, wenn weitere genetische Veränderungen im Sinne von M3-Mn Ereignissen hinzukommen, zur Weiterentwicklung in das maligne Retinoblastom. Demnach weisen humane *RB1* defiziente Zellen eine genomische Instabilität auf und weitere genomische Veränderungen sind für die Entwicklung eines Retinoblastoms notwendig. So kann allein der Verlust von *RB1* nicht als

der ursächliche, aber dennoch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Prozess der Entwicklung eines Retinoblastoms angesehen werden, da es sehr wahrscheinlich ist, dass sich aus einem Retinom ein Retinoblastom entwickelt (Dimaras et al., 2008).

Das Retinoblastom kann unilateral oder bilateral auftreten und erblich oder nicht-erblich bedingt sein. Am häufigsten tritt die nicht-erbliche, unilaterale Form des Retinoblastoms auf (Villegas et al., 2013). Als weitere Form bezeichnet der Begriff des trilateralen Retinoblastoms das Auftreten eines intrakraniellen neuroektodermalen Tumors zusätzlich zu einem unilateralen oder bilateralen Retinoblastom. Dieser ist in der Regel im Bereich der Epiphyse lokalisiert (De Jong et al., 2014).

In 90% der Fälle des bilateralen Retinoblastoms gibt es keine familiäre Vorbelastung. Allerdings ist diese Form des Retinoblastoms durch die Weitergabe der Keimbahnmutation im Sinne eines autosomal dominanten Erbgangs an die folgenden Nachkommen vererbbar. Patienten mit einer Keimbahnmutation auf einem Allel haben für beide Augen ein hohes Risiko, dass es durch Mutation des anderen Allels in mindestens einer Zelle der Retina zum Funktionsverlust von *RB1* kommt. Dies führt mit hoher Penetranz zur bilateralen Ausbildung von Retinoblastomen (Corson und Gallie, 2007).

Die sporadische Veränderung von beiden Allelen in der gleichen Zelle hingegen ist selten, sodass bei der Ausbildung eines Retinoblastoms ohne Prädisposition aufgrund einer Keimbahnmutation, d.h. bei der nicht-erblichen Variante, in der Regel nur ein Auge betroffen ist (Corson und Gallie, 2007).

1.1.2 Klinik und Therapie

Der klinische Verlauf eines Retinoblastoms ist zunächst von einer asymptomatischen Phase geprägt, da die typischen Symptome durch ein ausgedehntes Tumorwachstum bedingt sind. Häufigstes Erstsymptom ist die Leukokorie, d.h. das weißliche Aufleuchten der Pupille z.B. auf Fotos bedingt durch den dahinter liegenden Tumor (Vgl. Abbildung 1). Ebenfalls häufig tritt eine Beeinträchtigung der Sehschärfe auf dem betroffenen Auge auf, sodass sich in 25-30% der Fälle ein Strabismus entwickelt. Weitere mögliche Symptome sind z.B. Augenschmerzen, sowie eine Rötung oder Schwellung des Auges (Yiallourous, 2016).



Abbildung 1: Leukokorie

Die Pupille des rechten Auges leuchtet weißlich auf, im Gegensatz zur linken Pupille. Dies ist durch die Tumormasse bedingt, welche das Licht reflektiert und so die Pupille weißlich aufleuchten lässt. (<http://www.kinderaugenkrebsstiftung.de/> Stand: April 2017)

Das Retinoblastom zeichnet sich in der Regel durch ein zunächst lokales Größenwachstum im Auge aus, gefolgt von einer Infiltration des periokulären Gewebes, sowie im weiteren Verlauf der Infiltration des Gehirns (Villegas et al., 2013). Über den Subarachnoidalraum kann es zu einer Metastasierung in das Rückenmark kommen, weiterhin ist über eine Invasion der Choroidea eine hämatogene Metastasierung möglich. Bei dieser Form der Metastasierung sind vor allem Knochen und Knochenmark betroffen. Die extraokuläre Ausbreitung des Retinoblastoms geht mit einer schlechten Prognose bzgl. des Überlebens einher (Chintagumpala et al., 2007).

Ohne adäquate Therapie kann es über den Sehnerv zur Ausbreitung eines Retinoblastoms in das zentrale Nervensystem (ZNS) kommen, sowie über eine hämatogene Aussaat zu Fernmetastasen. Ein metastasiertes Retinoblastom hat letztendlich letale Folgen (Soliman et al., 2017).

Im Rahmen des Stagings werden zuerst eine Ophthalmoskopie unter Vollnarkose sowie Sonographie durchgeführt um die Tumorgöße zu erfassen und Differentialdiagnosen abzugrenzen. Die Sonographie und *Optical Coherence Tomography* Untersuchungen ermöglichen die Beurteilung der Infiltration des Sehnervs, sowie die Erfassung kleiner Tumore, die mittels Ophthalmoskopie nicht sichtbar sind. Die Magnetresonanztomographie Bildgebung des Kopfes ermöglicht eine Beurteilung sowohl der intraokulären als auch intrakraniellen Ausbreitung des Tumors (AlAli et al., 2018).

Eine histopathologische Sicherung der Diagnose eines Retinoblastoms ist im Rahmen des Stagings üblicherweise nicht indiziert, da die Gewinnung von Biopsien mit dem Risiko einer iatrogenen Streuung von Tumorzellen einhergehen würde (AlAli et al., 2018) und sich die Auswahl des Therapieregimes ausschließlich nach klinischen Kriterien richtet (Gudiseva et al., 2019).

Der *RB1*-Status ist für die Nachsorge von besonderer Bedeutung, sodass auch die genetische Diagnostik eine wichtige Rolle spielt (Gudiseva et al., 2019).

In der 2017 publizierten Version der TNM Klassifikation des *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) für das Retinoblastom wurde zusätzlich zu den Aspekten T (*tumor*), N (*node*) und M (*metastasis*) außerdem der Unterpunkt H (*heritable trait*) eingeführt (Mallipatna et al., 2017). Hiermit ist das Retinoblastom das erste Malignom, bei dem in der TNM Klassifikation die Prädisposition aufgrund von Keimbahnmutationen berücksichtigt wird (AlAli et al., 2018). Dies entspricht erstmals dem Bestreben, die Relevanz der Erbllichkeit einer Tumorerkrankung im Staging abzubilden (Mallipatna et al., 2017).

Grundsätzlich lassen sich zwei Behandlungsstrategien unterscheiden: Einerseits die Enukleation und damit vollständige Entfernung des Tumors und andererseits das Auge erhaltende Therapien wie z.B. Strahlen-, Laser-, und Chemotherapie (Yiallourous, 2016). Des Weiteren stehen thermische Verfahren wie die Thermo- und Kryotherapie zur Verfügung (Chintagumpala et al., 2007).

Bei der operativen Therapie des Retinoblastoms steht die Enukleation im Vordergrund, welche auch bei lokal fortgeschrittenem Tumorwachstum die Möglichkeit einer Heilung bietet (AlAli et al., 2018). Nach Durchführung einer Enukleation ist die histopathologische Untersuchung entscheidend dafür, ob eine zusätzliche Chemotherapie notwendig ist (Ancona-Lezama et al., 2020).

Die konservative Therapie, die auf den Erhalt des Auges abzielt, besteht in der Regel aus einer Chemotherapie und einer Konsolidierungstherapie. Letztere kann z.B. aus Laser-, Kryo-, Brachy- oder intravitrealer Chemotherapie bestehen. Allerdings sollte eine konservative Therapie mit Erhalt des Auges nur durchgeführt werden, wenn keine Risikofaktoren bestehen, dass diese Therapie das Kind dem Risiko eines metastasierenden Verlaufs aussetzt (Gudiseva et al., 2019). Zur Therapie kleiner Tumore kommen im Sinne einer Augen-erhaltenden Therapie die Laser- oder Kryotherapie infrage, je nach Größe und Lokalisation in Kombination mit einer Chemotherapie (AlAli et al., 2018).

Für die systemische Chemotherapie werden vor allem Vincristin, Etoposid und Carboplatin genutzt, welche im Rahmen einer multizyklischen Therapie mit 6-9 Zyklen angewendet werden (Villegas et al., 2013; Ancona-Lezama et al., 2020). Das deutsche Chemotherapie-Protokoll sieht zusätzlich die Gabe von Cyclophosphamid vor (Temming et al., 2017).

Seit den 1990er Jahren hat sich die intraarterielle Chemotherapie (IAC) als Therapieoption etabliert, die eine höhere lokale Dosierung der Chemotherapeutika am Auge ermöglicht als die systemische Chemotherapie. Allerdings kann die IAC nur durchgeführt werden, wenn die Kalibergröße der Gefäße ausreichend ist, sodass dieses Therapieverfahren für Kinder vor dem 3.-4. Lebensmonat i.d.R. noch nicht in Frage kommt (Ancona-Lezama et al., 2020). Die intravitreale Chemotherapie wurde in den 2000er Jahren eingeführt und hat vor allem in der Kombination mit anderen Therapien und als Zweitlinientherapie einen Stellenwert

(Ancona-Lezama et al., 2020). Die "*precision intravitreal chemotherapy*" und "*intracameral chemotherapy*" stellen jüngste Weiterentwicklungen der lokalen Anwendung von Chemotherapeutika dar, bei denen eine gezielter lokalisierte Applikation bzw. ein besserer Wirkspiegel in der Vorderkammer im Vordergrund stehen (Ancona-Lezama et al., 2020). Allerdings stellen Medikamentenresistenzen Probleme im Zusammenhang mit der Chemotherapie des Retinoblastoms dar. Die Entstehung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika schränkt die Therapieoptionen ein und unterstreicht die Relevanz der Forschung zur Entwicklung neuer Therapieansätze (Busch et al., 2018a).

Die externe Strahlentherapie (*external beam radiation therapy*, EBRT) ist eine Therapieoption, die ihren Stellenwert heutzutage erst nach Ausschöpfung der anderen Therapieoptionen hat, da sie neben lokalen Nebenwirkungen das Risiko für Sekundärmalignome erhöht (AlAli et al., 2018). Daher ist die EBRT, welche früher die Standardtherapie für Retinoblastom-Patienten darstellte, heute nur noch selten indiziert. Mögliche Indikationen stellen z.B. ein Rezidiv nach Enukleation oder ein Rezidiv des zuletzt verbleibenden Auges dar (Gudiseva et al., 2019; Ancona-Lezama et al., 2020).

Die Brachytherapie wird vor allem als Konsolidierungstherapie oder bei Rezidiven nach Chemotherapie eingesetzt. Schwerwiegende Nebenwirkungen der EBRT wie das hohe Risiko für Sekundärmalignome können durch diese Form der Strahlentherapie vermieden werden, sodass die Brachytherapie weiterhin ihren Stellenwert als Konsolidierungstherapie hat (Ancona-Lezama et al., 2020).

Auch nach dem erfolgreichen Abschluss einer Therapie sollte jedes am Retinoblastom erkrankte Kind eine lebenslange onkologische Nachsorge erhalten, um Sekundärmalignome und andere Spätfolgen frühzeitig zu erkennen (Ancona-Lezama et al., 2020; Temming et al., 2016). Eine retrospektive Studie zum Retinoblastom in Deutschland hat gezeigt, dass die erhöhte Langzeit-Mortalität des erblichen Retinoblastoms von Sekundärmalignomen als Haupttodesursache dominiert wird (Temming et al., 2016). Vor allem die EBRT geht neben lokalen Nebenwirkungen mit einem erhöhten Risiko für Sekundärmalignome einher (AlAli et al., 2018), aber auch die Anwendung einer systemischen Chemotherapie kann das Risiko für Sekundärmalignome erhöhen (Temming et al., 2017). Die Kombination einer EBRT mit zusätzlicher Chemotherapie erhöht die Inzidenz von Sekundärmalignomen im Vergleich zu alleiniger EBRT darüber hinaus (Temming et al., 2017). Der Großteil der Sekundärmalignome besteht aus Sarkomen (Temming et al., 2016). Darüber hinaus kommen Osteosarkome sowie akute Leukämien, Hirntumore und Lungenkrebs gehäuft als Sekundärmalignome bei ehemaligen Retinoblastom Patienten vor (Temming et al., 2017).

Neben dem Risiko für Zweitmalignome machen auch mögliche Langzeitnebenwirkungen der Therapie wie z.B. Katarakt die langfristige sorgfältige Nachsorge notwendig (Ancona-Lezama et al., 2020).

Der Konflikt zwischen dem Ziel, das Auge und den Visus zu erhalten, und möglichen Effekten auf das Langzeit-Überleben wird bei der Wahl eines Therapieverfahrens für ein Kind mit Retinoblastom erst gelöst werden können, wenn neue Therapiemöglichkeiten mit weniger unerwünschten Nebenwirkungen und Langzeitfolgen entwickelt und etabliert werden (Temming et al., 2016).

1.2 TFF Peptide

Die *Trefoil Factor Family* (TFF) Peptide TFF1 (vorher: pS2), TFF2 (vorher: *Spasmolytic Polypeptide*) und TFF3 (vorher: *Intestinal Trefoil Factor*) zeichnen sich dadurch aus, dass sie charakteristische *Trefoil* Domänen enthalten. Diese Domänen bestehen aufgrund von Disulfid-Bindungen in der Aminosäuresequenz aus einer charakteristischen dreiblättrigen Struktur, die an ein Kleeblatt erinnert, sodass hierfür der Begriff Kleeblatt-Domäne gewählt wurde (Thim, 1989). Aufgrund der Disulfid-Bindungen dieser Kleeblatt-Domänen zeichnet die TFF Peptide eine Widerstandsfähigkeit bezüglich Proteolyse aus, was den Erhalt der funktionellen Aktivität z.B. in der Umgebung des Gastrointestinaltrakts ermöglicht (Braga Emidio et al., 2020).

TFF1 kann als monomere oder homodimere Form vorliegen sowie Heterodimere formen. Es gibt Hinweise, dass die dimeren Formen von TFF1 eine höhere biologische Aktivität aufweisen. Die Existenz dieser verschiedenen molekularen Formen von TFF1 weist auf komplexe biologische Funktionen hin (Hoffmann, 2020).

Die Aufdeckung der nahen Lokalisation der einzelnen Gene im TFF-Locus unterstützte die Hypothese, dass die *TFF* Gene gemeinsam bzw. in Abhängigkeit von einander reguliert werden könnten (Seib et al., 1997). Die Gene für *TFF1*, *TFF2* und *TFF3* sind alle drei in einer Region von 55 kb auf Chromosom 21q22.3 lokalisiert (Moisan et al., 1988; Tomasetto et al., 1992; Chinery et al., 1996; Seib et al., 1997). In die Regulation der Genexpression sind diverse Mechanismen involviert, unter anderem die Regulation durch andere Proteine oder Rezeptoren und entsprechend nachgeschaltete Signaltransduktionswege. Auch epigenetische Mechanismen sind in die Regulation der *TFF* Expression involviert, denn diese wird in Abhängigkeit von Promotor-Methylierung reguliert. In Geweben, in denen keine TFF Peptide exprimiert werden, liegen die Promotor Regionen der entsprechenden Gene in der Regel methyliert vor (Emami et al., 2004). Beispielsweise unterliegt die Expression von *TFF3* in Retinoblastomzelllinien (RB-Zelllinien) überwiegend

epigenetischen Regulationsmechanismen, während für die Regulation der Expression von *TFF1* und *TFF2* hier zusätzliche Mechanismen wie z.B. eine Bindung von Transkriptionsfaktoren maßgeblich zu sein scheinen (Philippeit et al., 2014).

TFF Peptide werden hauptsächlich in Schleimhäuten exprimiert, wobei die exokrine Sekretion der TFF Peptide mit der Sekretion von Muzinen einhergeht. Zudem kommen TFF Peptide in geringen Mengen im zentralen Nervensystem im Sinne einer endokrinen Sekretion vor (Hoffmann, 2020).

TFF Peptide sind vor allem für ihre Expression und Funktion in Geweben des Gastrointestinaltrakts bekannt, hierbei findet sich *TFF1* überwiegend in der Magenschleimhaut (Kjellev, 2009; Taupin und Podolsky, 2003; Hoffmann, 2020). Aber auch außerhalb des Gastrointestinaltrakts wird *TFF1* exprimiert, unter anderem in Pankreas-, Prostata-, Speicheldrüsen- und Skelettmuskelgewebe (Madsen et al., 2007). In Mäuseembryonen konnte *TFF1* zudem immunhistochemisch sowohl in Perikaryen des peripheren wie auch des zentralen Nervensystems (ZNS) nachgewiesen werden. Auch in anderen Bestandteilen des ZNS, z.B. der weißen Substanz, dem Plexus choroideus sowie Gliazellen des Gehirns und Rückenmarks, konnte *TFF1* in diffuser Verteilung nachgewiesen werden (Belovari et al., 2015).

Untersuchungen zur *TFF* Expression in gesunder Retina haben gezeigt, dass *TFF1* und auch *TFF3* in der Retina von Mäusen nicht exprimiert wird, während die Expression von *TFF2* nachgewiesen werden konnte (Paunel-Görgülü et al., 2011). In der gesunden humanen Retina ist eine niedrige Expression von *TFF1* nachweisbar (Weise und Dünker, 2013; Philippeit et al., 2014).

Die physiologischen Funktionen der TFF Peptide im menschlichen Körper sind bis heute nicht vollends entschlüsselt. Die oben beschriebene Expression in verschiedenen Geweben legt zudem die Möglichkeit nahe, dass die TFF Peptide je nach Organsystem unterschiedliche Funktionen ausüben könnten.

Diverse Studien bzgl. der biologischen Funktion der TFF Peptide weisen darauf hin, dass die TFF Peptide in Regenerationsprozesse verschiedener Gewebe involviert sind (Kjellev, 2009). Schon früh wurde vermutet, dass TFF Peptide im Gastrointestinaltrakt eine besondere Relevanz in der epithelialen Restitution zur Wiederherstellung der Schleimhautintegrität haben (Kjellev, 2009; Wright et al., 1997). Die Überexpression von *TFF1* in einem transgenen Mäusestamm verbesserte beispielsweise die Widerstandsfähigkeit bzgl. gastrointestinalen Schäden nach Indomethacin-Gabe (Playford et al., 1996). Es gibt Hinweise darauf, dass Zusammenhänge zwischen der Regulation von Muzinen und den TFF Peptiden bestehen (Taupin und Podolsky, 2003). Zudem beruht der

protektive Effekt von TFF1 für die gastrointestinale Schleimhaut zumindest teilweise auf der direkten Interaktion mit Muzinen und dem damit einhergehenden Beitrag zur Organisation der apikalen Schleimschicht der Mukosa (Tomasetto et al., 2000). So üben TFF Peptide einen protektiven Effekt auf die gastrointestinale Schleimhaut aus, indem sie zur Bildung einer Schutzschicht vor Noxen wie mechanischem Stress, schädlichen Substanzen, Viren und anderen Pathogenen beitragen (Emami et al., 2004).

Auch eine Funktion der TFF Peptide in der Entwicklung des Nervensystems wird diskutiert: Eine Analyse der *TFF* Expression in Gehirnen von adulten Mäusen hat gezeigt, dass hier alle drei TFF Peptide exprimiert werden (Hinz et al., 2004). Außerdem konnten Belovari et al. (2015) zeigen, dass TFF Peptide, insbesondere TFF1, im ZNS von Mäuse Embryonen ebenfalls nachweisbar sind und formulieren daher die Hypothese, dass TFF Peptide als Neuromodulatoren oder Neurotransmitter eine Rolle in der Embryonalentwicklung des Nervensystems spielen könnten. Diese Hypothese wird auch dadurch unterstützt, dass die *TFF1* Expression des Hippocampus in Ratten während der fortschreitenden Reifung kontinuierlich abnimmt, was eine funktionelle Rolle von *TFF1* suggeriert (Hirota et al., 1995). Die Annahme, dass TFF Peptide in der Entwicklung des ZNS involviert sein können, wird zudem durch ihre Fähigkeit die Proliferation und Migration zu beeinflussen gestützt (Belovari et al., 2015).

Neben ihrer Rolle in physiologischen Prozessen sind die TFF Peptide auch in pathophysiologische Prozesse verschiedener Erkrankungen involviert.

Bezüglich diverser Pathologien konnte in humanen Gewebeproben oder Tiermodellen eine Veränderung der TFF Expression festgestellt werden. So ist die Expression von TFF Peptiden beispielsweise bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöht. Eine erhöhte TFF1 Expression findet sich zudem z.B. bei chronischer Divertikulitis, Cholezystitis, sowie Pankreatitis (Kjellev, 2009; Hoffmann, 2020). Insbesondere für TFF1 werden protektive Eigenschaften während inflammatorischen Prozessen, unter anderem im Gehirn, vermutet (Hoffmann, 2020). In Bezug auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen werden TFF Peptide in ersten klinischen Studien als mögliche Therapieoption evaluiert (Aamann et al., 2014).

1.2.1 Pathologische Bedeutung von *TFF1* in malignen Erkrankungen

TFF Peptide vermitteln einerseits vorteilhafte Effekte während der Frühphasen von Schleimhautverletzungen, scheinen allerdings ebenso unerwünschte Effekte während chronischen Entzündungsprozessen und onkogener Transformation zu vermitteln. So kann

die Induktion und Überexpression von TFF Peptiden u.a. zur Kanzerogenese beitragen, indem das Überleben und die Streuung von Krebszellen, sowie die Fähigkeit zur Invasion und Angiogenese-Induktion gefördert werden. Dies steht im Widerspruch zu den protektiven Eigenschaften im Gastrointestinaltrakt und somit wird eine duale Rolle der TFF Peptide angenommen, die u.a. von Umgebungsprozessen abhängt (Emami et al., 2004). Die Expression der TFF Peptide ist in einer Vielzahl von Organsystemen auch in Bezug auf Tumorerkrankungen untersucht worden, da in diversen Tumorentitäten und Krebszelllinien TFF Peptide exprimiert werden. Die Expression von TFF1 konnte in diversen primären humanen Karzinomen sowie den entsprechenden Metastasen nachgewiesen werden. So wird TFF1 unter anderem in malignen Veränderungen von Mamma, Kolon, Pankreas, Uterus, Ovar und Prostata exprimiert (Regalo et al., 2005; Ribieras et al., 1998). Es wird angenommen, dass TFF1 eine allgemeine Rolle in humanen Neoplasien spielen könnte (Henry et al., 1991). Die Veränderungen der TFF Expression in diversen Tumorentitäten lassen allerdings die Frage offen, ob die TFF Peptide hier eine aktive Rolle in der Tumorprogression spielen, oder einen daran unbeteiligten Nebeneffekt darstellen (Regalo et al., 2005). Aufgrund der Beeinflussung von Schlüsselpunkten der onkogenen Transformation werden die TFF Peptide in der Literatur sowohl in Bezug auf eine mögliche Rolle als Onkogen sowie als Tumorsuppressor diskutiert (Perry et al., 2008).

Die Detektion Östrogen-regulierter Gene in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 führte zur erstmaligen Identifikation von TFF1, damals zunächst unter der Bezeichnung pS2 (Masiakowski et al., 1982). TFF1 wird nicht in Östrogen-Rezeptor negativen, aber in Östrogen-abhängigen Mammakarzinom-Zelllinien exprimiert und hier können die TFF1 mRNA Konzentrationen durch Östrogen bis zu 100-fach gesteigert werden (Prest et al., 2002). Auch in der gesunden humanen Mamma wird TFF1 exprimiert (Madsen et al., 2007; Poulsom et al., 1997), allerdings nur in geringem Ausmaß im Vergleich zu benignen und malignen Veränderungen der Mamma (Poulsom et al., 1997). Das Mammakarzinom ist somit eine Tumorentität, in der TFF1 im Vergleich zu gesundem Gewebe überexprimiert wird (Buache et al., 2011).

Es gibt Hinweise auf eine Funktion von *TFF1* als Onkogen in Bezug auf das Mammakarzinom. So kann *TFF1* das onkogene Potential von Brustkrebszellen *in vitro* und *in vivo* steigern (Amiry et al., 2009). Die Beobachtung, dass TFF1 die Migrationsfähigkeit von Mammakarzinom-Zelllinien steigern kann (Buache et al., 2011; Prest et al., 2002) steht zudem in Einklang mit der Identifikation von TFF1 als möglichen Marker für disseminierte Krebszellen des Mammakarzinoms (Perry et al., 2008). Andererseits hat sich für das Mammakarzinom gezeigt, dass die Expression von TFF1 mit einer guten Prognose und mit dem Erfolg einer Hormontherapie bei Östrogenrezeptor-positiven Tumoren assoziiert ist

(Ribieras et al., 1998). Aufgrund der statistischen Assoziation zwischen der Expression von Östrogen-Rezeptoren und der Expression von TFF1 in Mammakarzinom-Zelllinien wird TFF1 als möglicher Marker für das Ansprechen von Mammakarzinom-Zellen auf eine Hormontherapie diskutiert (Ribieras et al., 1998; Prest et al., 2002). Die positive Korrelation der Expression von TFF1 mit einer besseren Prognose und Überleben könnte auf der Östrogen-abhängigen Regulation von TFF1 basieren (Amiry et al., 2009). Die Assoziation der TFF1 Expression mit einer guten Prognose konnte auch in aktuellen Studien erneut bestätigt werden. So zeigte eine Studie von Yi et al. (2020), dass in Bezug auf das Mammakarzinom die Expression von TFF1 positiv mit dem Überleben korreliert.

Insgesamt zeigen sich für TFF1 in Bezug auf das Mammakarzinom sowohl Hinweise auf onkogene wie auch tumorsuppressive Funktionen, sodass die Funktion von TFF1 hier weiter in der Diskussion steht. Insgesamt scheinen die tumorsuppressiven Eigenschaften von TFF1 in Bezug auf das Mammakarzinom zu überwiegen und es wird als vielversprechender Aspekt angesehen, um in Zukunft die Prognose abzuschätzen (Yi et al., 2020).

Die physiologische Rolle von TFF Peptiden im Gastrointestinaltrakt lässt mögliche onkogene Eigenschaften vermuten. Da TFF Peptide hier in der epithelialen Restitution involviert sind und dafür anti-apoptotisch, pro-migratorisch sowie stimulierend auf die Angiogenese wirken, scheint es offensichtlich, dass die Deregulation dieser Prozesse die Grundlage für TFF-vermittelte onkogene Prozesse bildet (Perry et al., 2008).

Es zeichnet sich allerdings eine duale Rolle von TFF1 bezüglich maligner Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts ab: Einerseits agiert TFF1 im Sinne einer Schutzfunktion in Bezug auf defekte Epithelien z.B. im Magen und zeichnet sich in dieser Umgebung durch tumorsuppressive Eigenschaften aus, andererseits besteht eine Assoziation zu Prozessen, die das Überleben von Krebszellen fördern. Dabei könnte der Status der TFF1 Expression im gesunden Gewebe eine entscheidende Rolle für diese unterschiedlichen Effekte spielen (Rodrigues et al., 2006), denn die Expression von TFF1 ist nicht auf maligne Tumore aus Geweben beschränkt, die auch im Normalzustand TFF1 exprimieren, d.h. auch eine ektopische Expression ist möglich (Henry et al., 1991). Während z.B. in gesundem humanen Kolongewebe kein TFF1 nachgewiesen werden konnte, wird es im Epithel von hyperplastischen Polypen, Adenomen und Adenokarzinomen des Kolons exprimiert (Rodrigues et al., 2006). Die Expression von TFF1 ist in Kolonkarzinomen also im Vergleich zu gesundem Gewebe erhöht. Hierbei konnte zwar keine Assoziation von TFF1 zum Überleben nachgewiesen werden, die TFF1 Expression zeigte allerdings eine Assoziation zu Metastasierung und TNM-Stadium. Dies deutet auf eine Assoziation der TFF Peptide mit Malignität in Bezug auf das Kolonkarzinom hin (Yusufu et al., 2019).

Bezüglich des Magenkarzinoms konnte gezeigt werden, dass TFF1 in gastrointestinalen Zelllinien die Induktion von Apoptose hemmen kann (Bossenmeyer-Pourié et al., 2002). Unabhängig von den verschiedenen Wegen der Apoptose-Induktion, die hierbei von Bossenmeyer-Pourié et al. (2002) untersucht wurden, wurde die Apoptose durch TFF1 gehemmt. Somit übt TFF1 hier einen anti-apoptotischen Effekt aus (Bossenmeyer-Pourié et al., 2002), was im Sinne einer onkogenen Eigenschaft zu betrachten ist. Zudem konnte für das Magenkarzinom in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass TFF1 als Marker für Lymphknotenmetastasen und für ein schlechteres Outcome dienen könnte (Perry et al., 2008). Dem gegenüber stehen viele Hinweise auf eine funktionelle Relevanz von TFF1 im Sinne eines Tumorsuppressors, sodass TFF1 in Bezug auf das Magenkarzinom primär als Tumorsuppressor angesehen wird (Taupin und Podolsky, 2003; Soutto et al., 2015). Schon Lefebvre et al. zeigten 1996, dass die Inaktivierung des *TFF1*-Gens im murinen *in vivo* Modell zu Hyperplasien und Dysplasien der Magenschleimhaut im Bereich des Antrums und des Pylorus führt. Außerdem zeigten hier 30% der Versuchstiere die Entwicklung eines intraepithelialen oder intramukösen Karzinoms. Hieraus wurde geschlossen, dass TFF1 eine hohe Relevanz für die Differenzierung der Magenschleimhaut des Antrums und Pylorus hat und in Bezug auf die Magenschleimhaut als Tumorsuppressor-Gen agieren könnte (Lefebvre et al., 1996). TFF1 wird in der humanen Magenschleimhaut exprimiert und die Expression ist im Vergleich zur normalen humanen Magenschleimhaut in Metaplasien, Dysplasien und Adenokarzinomen reduziert (Taupin et al., 2001; Soutto et al., 2015). Außerdem zeigt sich der Verlust von TFF1 mit dem Fortschreiten von intestinalen Metaplasien zu Dysplasien progressiv. Dies unterstützt die Ansicht, dass TFF1 eine wichtige Rolle für das Magenkarzinom im Sinne eines Tumorsuppressors spielt (Taupin et al., 2001).

Auch in humanen RB-Zelllinien konnte die Expression von *TFF1* nachgewiesen werden und zeigte sich im Vergleich zur gesunden humanen Retina erhöht (Weise und Dünker, 2013; Philippeit et al., 2014). In verschiedenen RB-Zelllinien ist *TFF1* unterschiedlich stark exprimiert und es konnte eine negative Korrelation zwischen der *TFF1*-Expression und der Wachstumskinetik festgestellt werden. So zeigte sich bei RB-Zelllinien mit höherer *TFF1* Expression ein langsames Wachstum, während RB-Zelllinien mit geringerer *TFF1*-Expression eine schnellere Wachstumskinetik aufwiesen (Weise und Dünker, 2013).

Unsere Arbeitsgruppe konnte in Gewebeproben aus RB Patiententumoren die Expression von *TFF1* nachweisen und eine Korrelation mit klinischen Parametern der Patienten feststellen (Busch et al., 2018b). Dabei korrelierten höhere *TFF1* Expressionslevel mit höheren Tumorstadien und weniger differenzierten Tumorzellen. Zudem zeigte sich, dass Patienten mit höherer *TFF1* Expression zum Zeitpunkt der Diagnose älter waren als

Patienten mit niedrigerer *TFF1* Expression. Hiermit zeichnet sich ab, dass eine Expression von *TFF1* im Retinoblastom vor allem in fortgeschrittenen Tumorstadien stattzufinden scheint (Busch et al., 2018b).

Die Zusammenstellung dieser Beispiele an malignen Erkrankungen verdeutlicht, dass die Funktion von *TFF1* nicht ausschließlich vom Organsystem abhängt, sondern darüber hinaus scheinbar Zelltyp-abhängig ist. Einen weiteren Hinweis auf die Abhängigkeit der Beeinflussung des Zellverhaltens durch *TFF1* vom Zelltyp bietet die Beobachtung, dass *TFF1* die Proliferation von nicht-malignen pankreatischen Zelllinien stimuliert, allerdings keinen Effekt auf die Proliferation von malignen pankreatischen Zelllinien hat (Arumugam et al., 2011). Somit sind grundsätzliche Verallgemeinerungen bezüglich der Funktion und Effekte von *TFF1* schwierig zu treffen. Insgesamt setzt sich die wissenschaftliche Diskussion um die Rolle von *TFF1* in malignen Erkrankungen fort und eine sichere Einordnung seiner Funktion im Retinoblastom im Spektrum zwischen tumorsuppressiven und onkogenen Eigenschaften steht bisher aus.

Die aktuell zur Verfügung stehenden Therapieverfahren des Retinoblastoms können diverse Nebenwirkungen mit maßgeblichen Auswirkungen auf die Lebensqualität der Patienten verursachen (Pritchard et al., 2016). Auch systemische Erkrankungen wie Zweitmalignome oder Metastasierung können durch die aktuellen Chemo- und Strahlentherapien verursacht werden (Ancona-Lezama et al., 2020). Daher sollten neue Therapiestrategien entwickelt werden, um Nebenwirkungen und Spätfolgen zu minimieren und dabei eine hohe Heilungsrate aufrecht zu erhalten (Pritchard et al., 2016). Die Entstehung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika kann zudem die Anwendbarkeit der aktuellen Therapieoptionen einschränken und unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Therapieansätze (Busch et al., 2018a).

1.3 Zielsetzung und Fragestellungen

Da sich in der Behandlung des Retinoblastoms mit Chemotherapeutika, der Grundlage der bulbuserhaltenden Therapieoptionen, Limitierungen aufgrund von unerwünschten Nebenwirkungen sowie dem Auftreten von Chemotherapie-Resistenzen ergeben, ist die Etablierung neuer Therapiestrategien erstrebenswert (Busch et al., 2018a).

Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Rolle von *TFF1* in Retinoblastomzelllinien charakterisiert, mit dem langfristigen Ziel, Ansatzpunkte für neue oder adjuvante Therapien für das Retinoblastom zu finden.

Der bisherige Forschungsstand weist auf eine mögliche Funktion von *TFF1* als Tumorsuppressor im Retinoblastom hin, denn die Überexpression von *TFF1* verursacht in humanen RB-Zelllinien eine signifikante Reduktion des Wachstums basierend auf einer Reduktion der Proliferationsrate und Induktion von Apoptose (Busch et al., 2017).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde das *TFF1*-Expressionslevel in ausgewählten RB-Zelllinien mittels lentiviralem Knockdowns supprimiert. Mit dem Ziel, die Auswirkungen eines *TFF1* Knockdowns auf RB-Zelllinien zu charakterisieren und so die Rolle von *TFF1* als Tumorsuppressor im Retinoblastom zu evaluieren, wurden dabei insbesondere folgende Fragestellungen verfolgt:

- Wie wirkt sich ein lentiviraler *TFF1* Knockdown auf die Zellviabilität, Proliferation und Apoptose, sowie das kontaktunabhängige Wachstum von Retinoblastomzellen aus?
- Welche Auswirkungen hat ein lentiviraler *TFF1* Knockdown auf die Tumorigenität von Retinoblastomzellen und deren Migrations- und Invasivitäts-Verhalten *in vivo* im Chorioallantoismembran (CAM) Modell?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden die humanen Retinoblastom Zelllinien (RB-Zelllinien) RBL-30, RBL-13 und Weri-Rb1, sowie die embryonale Nierenzelllinie HEK293T verwendet.

Tabelle 1: Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Etablierung
RBL-30	unilaterales Retinoblastom	(Griegel et al., 1990)
RBL-13	unilaterales Retinoblastom	(Griegel et al., 1990)
WERI-Rb1	unilaterales Retinoblastom	(McFall et al., 1977)
HEK293T	embryonale Nierenzellen	(DuBridge et al., 1987)

Die Zelllinien waren in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden und wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die RB-Zelllinien wurden für den lentiviralen Knockdown von *TFF1* verwendet, ihre Auswahl aufgrund ihrer Eignung für diese Anwendung ist in Kapitel 3.1 näher beschrieben. Die Zelllinie HEK293T kam für die Produktion lentiviraler Partikel zur Anwendung.

2.2 Zellkulturmedien

Die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
RB-Vollmedium	DMEM supplementiert mit 15% FBS 4 mM L-Glutamin 100 u/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10 µg/ml Insulin 50 µM 2-Mercaptoethanol
HEK293T-Vollmedium	DMEM supplementiert mit 10% FBS 4 mM L-Glutamin

	100 u/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Medium zur Kryokonservierung	DMEM supplementiert mit 20% FBS 10% DMSO

2.3 Bakterienkulturmedien

Zur Produktion von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente DH5α *Escherichia coli* Bakterien verwendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Bakterienkulturmedien

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

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/ Reagenz	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol, 99%	Carl Roth, Karlsruhe
2-Propanol, ≥ 99,8%	Carl Roth, Karlsruhe
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
5-Bromo-2'desoxyuridin (BrdU), ≥ 99,9%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid/ Bis-Lösung, 30%	Bio-Rad Laboratories, München
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure, ≥ 99,8%	Carl Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA), ≥ 98%	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim

Caspase Inhibitor III (Boc-D-Fmk)	Calbiochem EMD Biosciences, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybri-Max™	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAN-Biotech, Aidenbach
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/ Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) without Ca and Mg	PAN-Biotech, Aidenbach
Ethanol, ≥ 99,8%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetales bovines Serum (FBS)	PAN-Biotech, Aidenbach
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hexadimethrinbromid (Polybrene), ≥ 94%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Immunfluoreszenz-Eindeckmedium	Dako, Dänemark
Insulin, human	PromoCell, Heidelberg
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	PAN-Biotech, Aidenbach
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
LB-Agar Pulver (Lennox L Agar)	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt
LB-Broth Base (Lennox L Broth Base)	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol, ≥ 99,9%	Carl Roth, Karlsruhe
Mineralöl (<i>Bio Reagent</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS), ≥ 99,5 %	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	AppliChem, Darmstadt
Nonidet P-40	Calbiochem EMD Biosciences, USA
Normales Ziegenserum (NGS)	Dako, Dänemark
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, Thermo Scientific, USA

Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyethylenimin (PEI), verzweigt	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Merck, Darmstadt
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Applied Science, Mannheim
RNase AWAY®	Carl Roth, Karlsruhe
Saccharose, ≥ 99,5 %	Carl Roth, Karlsruhe
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt
Terralin® liquid	Schülke & Mayr, Norderstedt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories, München
TFF1, human rekombinant	BioVision, USA
Tissue Tec Mounting Medium	Sakura Finetek, USA
Tris Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris, ≥ 99,3%	Carl Roth, Karlsruhe
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau Farbstoff, 0,4%	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
Trypsin/ EDTA Lösung, 0,25%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Western Lightning® Plus-ECL Substrat Kit	Perkin Elmer, USA
WST-1	Roche, Mannheim
Xylolersatz Shandon™	Thermo Scientific, USA
Xylolersatz-Eindeckmittel Shandon™	Thermo Scientific, USA

2.5 Basispuffer

Sämtliche Puffer wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt. Weitere in dieser Arbeit verwendete Puffer sind in den jeweiligen Unterpunkten der Methoden aufgelistet.

Tabelle 5: Basispuffer

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

2.6 Antikörper

Tabelle 6: Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Hersteller
anti-aktivierte Caspase-3	Primärantikörper, Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, USA
anti-aktivierte Caspase-7	Primärantikörper, Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling, USA
anti-BrdU	Primärantikörper, Ratte, monoklonal	Abcam, UK
anti-TFF1	Primärantikörper, Kaninchen, monoklonal	Abcam, UK
anti-β-Aktin	Primärantikörper, Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, USA
Ziege-anti-Kaninchen	Sekundärantikörper, Alexa Fluor®594-konjugiert	Molecular Probes, Life Technologies, Darmstadt
Ziege-anti-Kaninchen	Sekundärantikörper, HRP-konjugiert	Dako, Dänemark
Ziege-anti-Ratte	Sekundärantikörper, Alexa Fluor®594-konjugiert	Molecular Probes, Life Technologies, Darmstadt

2.7 Kommerzielle Kits

Tabelle 7: Kommerzielle Kits

Kit-Bezeichnung	Hersteller
miRNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
NucleoBond® Xtra Midi EF Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, USA
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden

2.8 TaqMan® Gene Expression Assays

Tabelle 8: TaqMan® Gene Expression Assays

Assay	Verwendung	Artikelnummer	Hersteller
18S	Endogene Referenz	Hs99999901_s1	Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt
GAPDH	Target	Hs99999905_m1	
TFF1	Target	Hs00907239_m1	

2.9 Plasmid-Vektoren

Tabelle 9: Plasmid-Vektoren

Bezeichnung	Verwendungszweck	Bezug
pCD/NL-BH	lentivirales Verpackungsplasmid	Dr. H. Hanenberg, Essen
pCL7EGwo	Expressionsvektor zur stabilen GFP-Expression	Dr. H. Hanenberg, Essen
pczVSV-G	lentivirales Verpackungsplasmid	Dr. H. Hanenberg, Essen
pPRIME-CMV-Neo-FF3	Negativkontrolle bei stabiler Expression	Dr. S. Elledge, USA (Addgene 11665)
shTFF1 #1 - #6	stabiler <i>TFF1</i> Knockdown, siehe Tabelle 10	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tabelle 10: shRNA Plasmide für den lentiviralen *TFF1* Knockdown

Bezeichnung	TRC-Nummer*	Verwendungszweck	Hersteller
sh <i>TFF1</i> #1	TRCN0000373750	<i>TFF1</i> Knockdown	Sigma-Aldrich
sh <i>TFF1</i> #2	TRCN0000033614		
sh <i>TFF1</i> #3	TRCN0000373751		
sh <i>TFF1</i> #4	TRCN0000373674		
sh <i>TFF1</i> #5	TRCN0000033615		
sh <i>TFF1</i> #6	TRCN0000033616		

*TRC= The RNAi Consortium (shRNA library)

2.10 Geräte

Tabelle 11: Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Mettler PM 2000	Mettler-Toledo, Giessen
Becherglas	Brand, Wertheim
Brutmaschine BSS 300 MP GTFS	Grumbach, Mücke-Sellnrod
CO ₂ -Inkubator Galaxy 170 S	New Brunswick, Eppendorf, Hamburg
CO ₂ -Inkubator HERA cell 150	Heraeus, Thermo Scientific, USA
CO ₂ -Inkubator Micro Galaxy	Nunc, Thermo Scientific, USA
Dampfsterilisator Varioklav	HP Medizintechnik, Oberschleißheim
Dremel® 3000	Dremel, Bosch Power Tools, Niederlande
Eismaschine AF 80	Scotsman, Italien
Fluoreszenzlampe	Nikon, Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop Eclipse E600	Nikon, Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop Leica CTR 6500	Leica, Wetzlar
Gefrierbehälter Mr. Frosty™	Thermo Scientific, USA
Handzähler	Tamaco, Taiwan
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Inversmikroskop Eclipse Ts2	Nikon, Düsseldorf
Inversmikroskop Labovert FS	Leitz, Wetzlar
Inversmikroskop Motic AE 20 Serie	Motic, Wetzlar
Kaltlichtquelle KL1500 LCD	Schott, Mainz

Kryostat CM 3050	Leica, Nussloch
Kühl-Gefrierkombination (4°C und -20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
LAS-3000 <i>Mini Image Reader</i>	Fujifilm, Düsseldorf
Messzylinder	Brand, Wertheim
Mikroskopsystem SMZ 1000	Nikon, Düsseldorf
Mikrowelle MW 800	Lotus, Indien
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pipetten Discovery Pro	HTL Abimed GmbH, Langenfeld
Pipettierhilfe Pipetus® und Pipetus® Junior	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Präparierbesteck (Pinzetten, Scheren)	Hammacher, Solingen
Projektionslampe KL1500 <i>electronic</i>	Schott, Mainz
Reaktionsgefäßständer	Brand, Wertheim
<i>Realtime</i> PCR System 7300	Applied Biosystems, Thermo Scientific, USA
Rollenmischer SRT6	Stuart, UK
Rundschüttler Certomat® R	Sartorius, Göttingen
SDS-PAGE Elektrophoresekammer <i>Mini Protean II™</i>	Bio-Rad Laboratories, München
Sicherheitswerkbank Heraeus HB 2448S	Bio-Flow-Technik, Meckenheim
Sicherheitswerkbank Klasse II NU-440-400E	Nuaire, UK
Spannungsgerät Power Pac™ Basic	Bio-Rad Laboratories, München
Spektralphotometer Epoch Reader	BioTek, Bad Friedrichshall
Stereomikroskop Stemi DV4	Carl Zeiss, Jena
Thermozykler Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank (-80°C)	Oehmen Labortechnik, Essen
Tiefkühlschrank (-80°C)	Panasonic Biomedical, Niederlande
Tischzentrifuge 5415 D und 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Mini Modell C1301	Labnet, USA
Vortex MS2 und VF2	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Tischzentrifuge 5430 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech, Osterode
Zentrifuge Megafuge 11 R mit Aerosolschutz	Heraeus, Thermo Scientific, USA

2.11 Software

Tabelle 12: Software

Software (Version)	Verwendung	Hersteller
7300 System Software (1.4)	Auswertung <i>Realtime</i> RT-PCRs	Applied Biosystems, Thermo Scientific, USA
Adobe Photoshop CS (8.0.1)	Bearbeitung und Zuschnitt der Fluoreszenzaufnahmen und Fotos	Adobe Systems, USA
Gen5 (1.10.8)	Spektralphotometrische Auswertungen	BioTek, Bad Friedrichshall
GraphPad Prism (4.00)	Erstellung von Graphen, statistische Auswertung	GraphPad Software Incorporated, USA
IC Capture (2.4)	Aufnahmen des Soft Agarose Assay	The Imaging Source, Bremen
Leica Application Suite (3.4)	Fluoreszenzaufnahmen	Leica, Wetzlar
Microsoft Excel	Auswertung <i>Realtime</i> RT-PCRs	Microsoft Corporation, USA
NIS-Elements (3.0)	Fluoreszenzaufnahmen	Laboratory Imaging, Tschechien

2.12 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser (12 mm Ø)	Menzel GmbH, Braunschweig
Deckgläser, 24 x 60 mm	Engelbrecht, Edermünde
Einbetttschälchen Cryomold®	Sakura Finetek, USA
Entsorgungsbeutel Sekuroka® PP	Carl Roth, Karlsruhe
Filterpapier Whatman®	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Insulinspritze <i>Myjector</i> U100 (0,5 ml)	Terumo, USA
Klebeband Timemed™ (20 mm breit)	Fisher Scientific, Schwerte
Kosmetiktücher "Plus", 2-lagig	Tapira, Friedewald
Kryoröhrchen (2 ml, 4 ml)	Carl Roth, Karlsruhe

Nitrozellulosetransfermembran Protran BA83	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Objektträger, 76 x 26 mm, Mattrand	Engelbrecht, Edermünde
Parafilm „M“ Laboratory Film	American National Can, USA
Pasteurpipetten (Glas)	Brand, Wertheim
Pasteurpipetten (Kunststoff)	Neolab, Heidelberg
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
pH Indikator Stäbchen (pH 0-14, pH 4-7)	Merck, Darmstadt
Pipetten Cellstar® (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10 µl)	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, gestopft (10, 20, 200, 1000 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Polypropylen Röhrchen CELLSTAR® mit Schraubdeckel (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße mit Sicherheitsverschluss (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsplatte MicroAmp™ (96-well)	Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt
Schutzfolien MicroAmp™	Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt
Spritzen Discardit™ II (10 ml, 20 ml)	BD, Heidelberg
Sterilfilter Minisart (0,45 µm Porengröße)	Sartorius, Göttingen
SuperFrost® Plus Objektträger, 76 x 26 mm, Mattrand	R. Langenbrinck, Emmendingen
Unterlagen MoliNea® E	Hartmann, Heidenheim
Wägebapier	Machery-Nagel, Düren
Wägeschalen	Carl Roth, Karlsruhe
Wattestäbchen	Ebelin, dm-drogerie markt GmbH, Karlsruhe
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Corning, USA
Zellkulturplatten (24-well, 96-well)	Corning, USA
Zellkulturplatten (6-well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen (10 cm Ø)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Zellschaber drehbar (13 mm)	Oehmen Labortechnik, Essen
Zellstofftücher Vala® Clean	Paul Hartmann, Heidenheim

2.13 Molekularbiologische Methoden

2.13.1 RNA- und miRNA-Isolation

Die RNA-Präparation wurde mit sterilen RNase-freien gestopften Spitzen durchgeführt. Zur Isolation der RNA wurde das *NucleoSpin® RNA II Kit* (Macherey-Nagel) nach den Angaben des Herstellers verwendet, dabei wurden die Proben mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Diese Variante der RNA-Isolation wurde für die gewonnenen Gewebeproben aus CAM-Stanzen und Tumoren genutzt.

Die Isolation von miRNA wurde mit dem *miRNeasy® Mini Kit* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurden die Proben mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Diese Variante der RNA-Isolation wurde für die Aufarbeitung von Zelllysaten verwendet, um in weiteren, über diese Arbeit hinausgehenden, Analysen die Möglichkeit zu haben miRNA Expressionsanalysen nach *TFF1* Knockdown zu machen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die isolierte RNA bei -80°C gelagert.

2.13.2 RNA Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde mittels *Epoch Reader* (BioTek ®) photometrisch bei einer Wellenlänge von 260/ 280 nm bestimmt. Konzentrationen über 1 µg/µl wurden mit RNase-freiem Wasser verdünnt und erneut gemessen, da sie außerhalb des linearen Messbereichs des Epoch Readers (BioTek ®) liegen.

2.13.3 cDNA Synthese (Reverse Transkription)

Zur Analyse von RNA mittels *Realtime* RT-PCR wurde die isolierte Einzelstrang-RNA zunächst mittels Reverser Transkriptase (RT), welche als RNA-abhängige DNA-Polymerase agiert, zu doppelsträngiger cDNA umgesetzt. Hierfür wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet, wobei je Ansatz 1 µg RNA eingesetzt wurde. Die cDNA wurde nach Abschluss der Synthese mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt, sodass eine Konzentration von 0,01 µg/µl erreicht wurde. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Zum Ausschluss von Pufferkontaminationen oder Verunreinigungen wurden bei jeder cDNA-Synthese Negativkontrollen ohne RNA bzw. ohne Reverse Transkriptase (RT) angesetzt.

2.13.4 Quantitative *Realtime* RT-PCR

Zur Quantifizierung der Genexpression auf RNA-Ebene wurde das Prinzip der *Realtime* Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genutzt.

Basierend auf der Amplifikation einer Ausgangs cDNA (Template) mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase und entsprechenden Primern ermöglicht die *Realtime* RT-PCR den Nachweis der Expression eines Zielgens. Um eine Quantifizierung der zu Beginn eingesetzten cDNA zu ermöglichen, wird bei der *Realtime* RT-PCR nach dem *TaqMan*-Detektionsprinzip zusätzlich zu den sequenzspezifischen Oligonukleotiden ein Fluoreszenz-markiertes Detektionsoligonukleotid eingesetzt. Das Detektionsoligonukleotid zeichnet sich durch zwei Fluorochrome aus, welche als Reporter und Quencher bezeichnet werden. Der Quencher nimmt das vom Reporter emittierte Fluoreszenzsignal auf, sodass zunächst kein Signal des Reporters detektierbar ist. Bei Hybridisierung mit der Zielsequenz (Targetmolekül) wird der Reporter durch die Exonukleaseaktivität der verwendeten *Taq*-Polymerase freigesetzt, sodass das emittierte Fluoreszenzsignal nicht mehr durch den Quencher aufgenommen wird und daher detektierbar ist. Je mehr Reporter-moleküle freigesetzt werden, desto stärker ist das Fluoreszenzsignal, und somit ist Letzteres ein Maß für die Menge des synthetisierten PCR Produktes. Da bei der *Realtime* RT-PCR die Menge der Amplifikationsprodukte anhand der Signalzunahme während jedem Zyklus bestimmt wird, ist es möglich einen linearen Zusammenhang zur Ausgangskopienzahl der Zielsequenz herzustellen. Neben dem Genprodukt von Interesse (Target) wird ein sogenanntes *housekeeping*-Gen als endogene Referenz amplifiziert. Dies dient als interne Kontrolle, um Schwankungen der Amplifikationseffizienz zwischen einzelnen Proben zu erkennen und in die Auswertung einzubeziehen (Lottspeich und Engels, 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ribosomale 18S RNA-Untereinheit als endogenes Referenzgen verwendet. Amplifizierte Zielgene waren zum einen *TFF1* zur Kontrolle eines erfolgreichen Knockdowns, sowie humanes *GAPDH* (*hGAPDH*) zum Nachweis von humanem Gewebe in isolierten CAM (Chorioallantoismembran) Stanzen.

Als Template wurde die wie in Kapitel 2.13.3 beschriebene synthetisierte cDNA verwendet. Zur Durchführung der *Realtime* RT-PCR wurden die in Kapitel 2.8 aufgelisteten *TaqMan*[®] *Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) sowie das *Realtime* PCR System 7300

(Applied Biosystems) verwendet. Das Temperaturprogramm zur Durchführung der PCR ist in Tabelle 14: beschrieben.

Tabelle 14: Temperaturprogramm des *Realtime* PCR-Systems 7300, Zyklusanzahl 40 für Denaturierung und Hybridisierung

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Heizphase	50°C	2 min
Initiale Denaturierung	95°C	10 min
Denaturierung	95°C	15 sec
Hybridisierung	60°C	1 min

Die Auswertung der *Realtime* RT-PCRs zum Nachweis des *TFF1* Knockdowns wurde mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) durchgeführt. Hierbei findet eine relative Auswertung statt, indem die Probe anhand einer Kontrolle kalibriert wird. Somit wird die relative Expression des Zielgens in Bezug auf die Kontrolle bestimmt. Der C_T -Wert definiert dabei eine Zyklus-Zahl, bei der die Amplifikation anhand der Messung der Fluoreszenz einen Schwellenwert im exponentiellen Bereich überschreitet. Zur Bestimmung der relativen Expression wird zunächst der C_T -Wert des Zielgens gegen den C_T -Wert des Referenzgens normalisiert, indem letzterer von ersterem subtrahiert wird (1). Anschließend wird vom so bestimmten ΔC_T (Probe) der auf gleiche Weise bestimmte ΔC_T -Wert der als Kalibrator dienenden Kontrolle, ΔC_T (Kontrolle), subtrahiert (2). Die relative Expression des Zielgens (RE; relative Expression) ergibt sich aus der Potenz von $-\Delta\Delta C_T$ zur Basis 2 (3).

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

und

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

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

$$(3) RE = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Zur Auswertung der CAM-Stanzen erfolgte eine absolute Quantifizierung, Details hierzu finden sich in Kapitel 2.17.2.

2.13.5 Produktion von Plasmid-DNA

Um die Expression von *TFF1* in den RB-Zelllinien zu supprimieren, wurde basierend auf dem Prinzip der RNA Interferenz (RNAi) ein lentiviraler Knockdown durchgeführt. Hierfür, sowie zur Erstellung der Negativkontrollen und zur Markierung der verwendeten RB-Zelllinien mit Grün Fluoreszierendem Protein (GFP), wurden für die Etablierung des lentiviralen Transduktionssystems Plasmide zur Herstellung der lentiviralen Partikel benötigt.

2.13.5.1 Herstellung der Plasmide

Die verwendeten Plasmidkonstrukte waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden und sind Tabelle 9 zu entnehmen. Darüber hinaus wurden zur Vermittlung des lentiviralen *TFF1* Knockdowns Plasmide bei Sigma-Aldrich erworben (siehe Tabelle 10).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Vermehrung der verwendeten Plasmide durchgeführt.

2.13.5.2 Bakterientransformation

Die Transformation der Plasmide wurde in chemisch kompetenten DH5 α Escherichia coli Bakterien durchgeführt. Details zu den verwendeten Kulturmedien sind Kapitel 2.3 zu entnehmen.

Die bei -80°C gelagerten Bakterien wurden zunächst für 10 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50 μ l der Zellsuspension mit je 10 ng der jeweiligen Plasmid DNA vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Durchführung eines Hitzeschocks im Wasserbad bei 37°C für 30 sec, was der Plasmid DNA das Eindringen in die Zellen ermöglicht, folgte eine Inkubation auf Eis für 2 min. Dann wurde je Ansatz 950 μ l LB-Medium ohne Antibiotikum hinzugegeben, gefolgt von einer Inkubation bei 37° in einem Schüttelinkubator mit 225 rpm für 1 h. Anschließend folgte die Aussaat der Zellen mit 100 μ l des Transformationsansatzes auf Antibiotika-haltigen Agar-Platten und eine Inkubation über Nacht bei 37°C. Je nach spezifischer Resistenz wurden die verwendeten Agar-Platten mit LB-Agar und einer Plattenkonzentration von 100 μ g/ml Ampicillin bzw. 30 μ g/ml Kanamycin angesetzt. Aus den über Nacht inkubierten Bakterienkulturen wurden nachfolgend mit einer Impföse Einzelkolonien gepickt und als Starterkolonien in je 5 ml LB-Medium mit Zusatz des entsprechenden Antibiotikums angesetzt. Nach einer Inkubation bei 37° in einem Schüttelinkubator mit 180 rpm für 6 bis 8 h wurde aus den Kolonien ein Zellpellet gewonnen und zur Plasmid-Isolation verwendet (siehe Kapitel 2.13.5.3). Bei Bedarf großer Mengen Plasmid-DNA wurden die Starterkolonien zunächst in 250 ml LB-Medium mit Antibiotikum-Zusatz erneut unter den oben genannten Bedingungen inkubiert,

bevor die Bakterien zur Plasmid-Isolation verwendet wurden. Zur Herstellung eines Glycerol Stocks wurden 800 µl Zellsuspension mit 200 µl Glycerin versetzt und bis zur erneuten Verwendung bei -80°C gelagert.

Die verwendeten sh*TFF1* Plasmide wurden als transformierter *Escherichia coli* Stamm als Glycerol Stock erworben (siehe Tabelle 10), welcher bei -80°C gelagert wurde. Das Ansetzen der Starterkolonien erfolgte hier nach den Angaben des Herstellers unter Nutzung des bereits beschriebenen LB-Mediums.

2.13.5.3 Isolation von Plasmid-DNA

Zur Plasmidisolierung wurden die Bakterienkulturen bei 4000 rpm bei 4°C für 25 min zentrifugiert und anschließend mithilfe des *NucleoBond® Xtra Midi EF Kit* (Macherey-Nagel) nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Da dieses Kit Endotoxin-frei arbeitet, konnte das Risiko einer Verunreinigung der Plasmid-DNA mit Endotoxinen gering gehalten und somit die Transfektionseffizienz optimiert werden. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bis zur Verwendung zur Transfektion bei -20°C gelagert.

2.14 Proteinbiochemische Methoden

2.14.1 Protein-Isolation

Zum Nachweis eines effektiven *TFF1* Knockdowns auf Proteinebene wurden Zellysate hergestellt, um hieraus das Gesamtprotein zu isolieren und mittels Western Blot *TFF1* nachzuweisen. Dafür wurde das entnommene Zellpellet von $1,5 \times 10^6$ Zellen nach einem Waschschrift in kaltem PBS in 80 µl Radioimmunpräzitationsassay (RIPA)-Lysepuffer (Spruck et al., 2006) resuspendiert (Vgl. Tabelle 15). Zur Lyse wurde das Zellpellet für 30 min bei 4°C unter Rotation inkubiert. Durch den nachfolgenden Zentrifugationsschritt für 10 min bei 14.000 rpm bei 4°C wurden Zellreste abgetrennt, sodass das im Überstand enthaltene Protein aufgereinigt abpipetiert werden konnte. Der das Protein enthaltende Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 15: Zusammensetzung des RIPA-Puffers

Bezeichnung	Zusammensetzung
RIPA-Puffer pH 8,0	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl 1% Nonidet P-40 0,5% Natriumdeoxycholat

frisch zusetzen	0,1% SDS 10 mM NaF 1 mM DTT 1 mM PMSF 0,1 mM Na ₃ VO ₄ 1x Protease Inhibitor Cocktail
-----------------	--

2.14.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung erfolgte mittels Bicinchonsäure (BCA)-Assay (Smith et al., 1985), hier wurde das *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Die Quantifizierung des Proteingehalts mittels BCA Assay basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der die Proteine einen Komplex mit zweiwertigen Kupferionen bilden, woraus ein Farbumschlag nach violett resultiert. Dieser korreliert in seiner Intensität mit der Proteinkonzentration und kann photometrisch gemessen werden. Die Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde photometrisch mittels Epoch Reader (BioTek®) bei einer Wellenlänge von 562 nm durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte stets in Duplikaten und mit einer 1:9 Verdünnung der Proben mit Wasser. Als Negativkontrolle diente RIPA-Lysepuffer, ebenfalls in einer Verdünnung von 1:9.

2.14.3 Gelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung des Gesamtproteins wurde die Methode der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) angewendet, bei der die Proteine mit Hilfe eines elektrischen Felds in einem Polyacrylamidgel umgeben von Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgetrennt werden. Zur exakteren Auftrennung der Proteine wurde ein diskontinuierliches System genutzt, d.h. die Gelmatrix bestand aus zwei Bereichen: Sammelgel und Trenngel. Diese unterscheiden sich bzgl. pH-Wert und Porengröße (Davis, 1964). Die verwendeten Sammel- und Trenngele wurden selbst gegossen, die Zusammensetzung ist Tabelle 16 zu entnehmen.

Zur Vorbereitung wurden die Proben auf eine Proteinmenge von 30 µg eingestellt, auf ein Gesamtvolumen von 30 µl mit RIPA-Lysepuffer aufgefüllt und dann mit 10 µl 4x-SDS-Probenpuffer nach Laemmli (siehe Tabelle 17) versetzt, sodass SDS in Relation zu den Proteinen im Überschuss vorlag. Dies gleicht die Eigenladung der Proteine aus und ist Voraussetzung dafür, dass die Proteine anhand ihres Molekulargewichtes und unabhängig von ihrer Ladung separiert werden können. Im Weiteren wurden die Proben für 5 min auf

95°C erhitzt um die Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden die Proben für 1 min auf Eis runtergekühlt, abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde das Polyacrylamidgel in die SDS-PAGE Elektrophoresekammer eingespannt und nachfolgend die gesamte Kammer mit SDS-Elektrophoresepuffer (siehe Tabelle 17) aufgefüllt. Die vorbereiteten Proben wurden mit einem Volumen von 40 µl aufgetragen. Als Kontrolle dienten 20 ng rekombinantes humanes TFF1 (rTFF1), welche dem gleichen vorbereitenden Prozedere unterzogen und ebenfalls mit einem Volumen von 40 µl aufgetragen wurden. Als Marker für die Proteingröße wurde ein molekularer Größenstandard (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, Fermentas) mit einem Volumen von 6 µl aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 125 V für 80 min, im Anschluss wurden die Trenngele mittels Western Blot weiter analysiert.

Tabelle 16: Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel

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

Tabelle 17: Zusammensetzung der Puffer für die Gelelektrophorese

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

2.14.4 Western Blot

Die zuvor mittels SDS-PAGE separierten Proteine werden beim Western Blot mit Hilfe eines elektrischen Felds auf eine Trägermembran übertragen und anschließend mittels Immundetektion visualisiert (Towbin et al., 1979). Dafür wurde das Polyacrylamidgel nach Abschluss der Gelelektrophorese zunächst für 2 min in Towbin-Transferpuffer (siehe Tabelle 18) äquibriert, um Reste des SDS zu entfernen. Sowohl die verwendete Trägermembran aus Nitrozellulose, als auch die Filterpapiere wurden ebenfalls mit Towbin-Transferpuffer durchnässt und die Komponenten nachfolgend so geschichtet, dass sich die Membran anodenseitig auf dem Gel befand und beides zusammen mit Filterpapier umgeben war. Der Proteintransfer auf die Membran fand bei 135 V für 1h statt. Im Anschluss wurde mittels Ponceau Färbung, welche Proteine reversibel und unspezifisch rot anfärbt, überprüft ob der Proteintransfer erfolgreich war. Dafür wurde die Nitrozellulosemembran für ca. 1 min in Ponceau S Lösung (siehe Tabelle 18) inkubiert, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Durch einen Waschschriff mit TBS-T wurde die Nitrozellulosemembran wieder entfärbt. Anschließend erfolgte die Blockade der auf der Membran verbliebenen Protein-Bindungsstellen mit Block-Puffer (siehe Tabelle 18) für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Rundschüttler, um unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden.

Tabelle 18: Zusammensetzung der Puffer für Western Blot

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

Der Primärantikörper (anti-TFF1 bzw. anti- β -Aktin) wurde auf 1:1.000 mit TBS-T verdünnt und mit 0,025% BSA und 0,02% NaN₃ angesetzt. Zur optimalen Bindung des Primärantikörpers erfolgte die Inkubation bei 4°C über Nacht auf einem Rollenmischer. Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden drei Waschschriffe in TBS-T für jeweils 5 min auf dem Rundschüttler durchgeführt, um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Der Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen HRP-konjugiert, Dako) wurde 1:10.000 in TBS-T verdünnt und mit 2% Magermilchpulver angesetzt. Die Inkubation der

Membran mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Rundschüttler. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T wurden die Proteinbanden mit Hilfe des *Western Lightning® Plus-ECL Substrate Kits* (Perkin Elmer) visualisiert. Dafür wurde zunächst das Luminol-Reagenz mit dem Oxidationsreagenz im Verhältnis 1:1 gemischt und dann auf die Membran gegeben. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase dient als Katalysator für die Reaktion des Luminols mit dem Oxidationsreagenz, sodass die Reaktion nur dort stattfindet, wo sich Sekundärantikörper und damit auch Protein befindet. Die durch Reaktion des Luminols mit dem Oxidationsreagenz emittierte Chemolumineszenz kann mit Hilfe eines Kamerasystems dokumentiert werden. Hierfür wurde das *LAS-3000 Mini Image Reader* (Fujifilm) Kamerasystem genutzt.

2.15 Zellkulturtechnik

2.15.1 Kultivierung und Subkultivierung der Zellen

Die Kultivierungsbedingungen wurden durch die CO₂-Inkubatoren konstant bei einem Kohlenstoffdioxid Gehalt von 10% (Retinoblastomzellen) bzw. 5% (HEK293T) und einer Temperatur von 37 °C in wasserdampfgesättigter Umgebung gehalten.

Die Kultivierung der Retinoblastomzellen erfolgte als Suspensionskultur in RB-Vollmedium (siehe Kapitel 2.2) in Zellkulturflaschen, die Kultivierung der Zelllinie HEK293T hingegen erfolgte als adhärenzte Kultur in HEK293T-Vollmedium (siehe Kapitel 2.2) in Zellkulturschalen.

Die Zellen wurden ab einer Konfluenz von ca. 80% passagiert. Hierfür wurde bei den Suspensionszellen ein Teil der Zellsuspension entnommen und durch vorgewärmtes frisches RB-Vollmedium ersetzt. Alle zwei bis drei Wochen wurden die Suspensionszellen für 5 min bei 800 x g abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in frischem RB-Vollmedium aufgenommen, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in eine neue Zellkulturflasche ausgesät.

Die adhärenz wachsende Zelllinie HEK293T wurde zum Passagieren im Verhältnis 1:10 gesplittet. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit 2 ml vorgewärmtem PBS gewaschen und anschließend für 2 min bei 37°C mit 2 ml 0,25%-Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, sodass die Zellen enzymatisch von der Oberfläche der Zellkulturschale gelöst wurden. Nachfolgend wurde das gleiche Volumen Zellkulturmedium hinzugegeben um die enzymatische Reaktion zu stoppen und die Zellsuspension für 5 min bei 800 x g zentrifugiert. Anschließend wurde nach Verwerfen des Überstandes ein Teil der Zellen in frischem HEK293T-Vollmedium resuspendiert und in eine neue Zellkulturschale ausgesät.

2.15.2 Adhärenz und Fixierung auf Deckgläsern

Für diverse Versuche war es notwendig, die verwendeten Zellen auf Deckgläsern zu fixieren. Da die Zelllinien RBL-13, RBL-30 und WERI-Rb1 Suspensionszellen sind, mussten die Deckgläser als Voraussetzung für die Adhärenz der Zellen zunächst mit Poly-D-Lysin beschichtet werden.

Dazu wurden die verwendeten Deckgläser (12 mm Ø) für 30 min bei Raumtemperatur mit einer Poly-D-Lysin-Lösung (10 µg/ ml PBS) inkubiert. Anschließend wurde in einem Waschschrift die Poly-D-Lysin-Lösung entfernt und durch PBS ersetzt. So wurden die Deckgläser bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Zur Anfertigung zytochemischer Färbungen wurden 1×10^5 Zellen in 100 µl RB-Vollmedium je beschichtetem Deckglas ausgesät. Nach Inkubation der Zellen für 2 h (DAPI Assay), 4 h (BrdU Assay) oder 24 h (Caspase-Inhibition), wurden die Deckgläser mit 4% Paraformaldehydlösung für 1 h bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. In Anschluss daran konnten mit den nun auf den Deckgläsern fixierten Zellen die verschiedenen Färbungen durchgeführt werden (siehe Kapitel 2.16).

2.15.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in DMEM mit 20% FBS und 10% DMSO aufgenommen. Nach Aliquotierung in Kryoröhrchen wurden die Zellen im Mr. Frosty® Gefrierbehälter bei -80°C eingefroren und langfristig gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurde die Zellsuspension zunächst in einem 37°C warmen Wasserbad angetaut und dann in 10 ml warmem Vollmedium resuspendiert. Anschließend wurden wie Zellen für 5 min bei 800 x g zentrifugiert und erneut in frischem Vollmedium resuspendiert. Die Zellen wurden dann vorerst in einem Gesamtvolumen von 10 ml kultiviert, wobei am ersten Tag nach dem Auftauen noch einmal das Medium ausgewechselt wurde, um tote Zellen sowie Reste des DMSOs zu entfernen.

2.15.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Trypanblau-Färbung und Neubauer Zählkammer. Dafür wurde ein Aliquot der zu zählenden Zellsuspension entnommen und resuspendiert, um die Zellen zu vereinzeln. Es wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt und in der Neubauer Zählkammer gezählt. Da Trypanblau die intakte Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen kann, werden nur apoptotische Zellen blau

angefärbt, da deren Zellmembran defekt ist. So lassen sich die apoptotischen Zellen von den ungefärbten vitalen Zellen in der Durchlichtmikroskopie gut differenzieren.

Je Aliquot wurden 8 Großquadrate am Durchlichtmikroskop ausgezählt, um dann nach folgender Formel die Zellzahl pro Milliliter zu bestimmen:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellzahl aus 8 Quadraten}}{8} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Die adhärente Zelllinie HEK293T musste vor dem Zählen zunächst in Suspension gebracht werden. Hierfür wurden die Zellen wie bereits in Kapitel 2.15.1 beschrieben von der Zellkulturschale gelöst und in frischem Vollmedium resuspendiert, um dann von dieser Suspension ein Aliquot zur Zellzahlbestimmung zu entnehmen.

2.15.5 Transfektion von HEK-293T

Zur Markierung der Zelllinien mit Grün-fluoreszierendem Protein (GFP) sowie zur Vermittlung des *TFF1* Knockdowns wurde ein lentivirales Transduktionssystem genutzt. Hierfür wurden zunächst lentivirale Partikel mittels Polyethylenimin (PEI) Transfektion der Zelllinie HEK293T produziert. Polyethylenimin (PEI) dient hier der Verbesserung der Transfektionseffizienz (Boussif et al., 1995).

Im Rahmen der Transfektion wurde Plasmid-DNA (siehe Kapitel 2.13.5) in die Verpackungszelllinie HEK293T eingebracht und so zu intakten Viruspartikeln prozessiert. Als Bestandteile der Viruspartikel dienten das gewünschte Expressionsplasmid sowie stets die Verpackungsplasmide pczVSV-G und pCD/NL-BH. Als Expressionsplasmid wurde zur GFP-Markierung der Zellen zusätzlich das Plasmid pCL7EGwo verwendet, während für den *TFF1* Knockdown das jeweilige sh*TFF1*-Plasmid beziehungsweise das als Negativkontrolle dienende Plasmid pPRIME-CMV-Neo-FF3 (Stegmeier et al., 2005) verwendet wurde.

Einen Tag vor Durchführung der Transfektion wurden 6×10^6 Zellen je 10 cm Zellkulturplatte in 10 ml HEK293T-Vollmedium ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde die PEI-Arbeitslösung aus 45 μ l PEI (1 mg/ml) und 955 μ l DMEM ohne Zusätze je Platte angesetzt. Je Plasmid wurden 6 μ g Plasmid-DNA eingesetzt, sodass insgesamt 18 μ g Plasmid-DNA in 1000 μ l DMEM angesetzt wurden. Nach zügigem Mischen der PEI-Arbeitslösung mit der DNA-Lösung folgte ein Inkubationsschritt für 15 min bei Raumtemperatur. Das Medium der ausplattierten HEK-293T Zellen wurde dann entfernt und gegen 4 ml DMEM mit 15% FBS je Platte ausgetauscht. Nachdem je Zellkulturplatte 2 ml der PEI/DNA-Lösung hinzugegeben wurden, folgte eine Inkubation für 24h unter den regulären Zellkulturbedingungen.

Am ersten Tag nach der Transfektion wurde das Medium gegen 10 ml IMDM mit 10% FBS und Penicillin-Streptomycin Zusatz gewechselt und erneut folgte eine Inkubation für 24h. Zur Ernte der sich im Überstand befindenden Viruspartikel wurde der Überstand der Zellkulturplatten mit sterilen Zelluloseacetatfiltern mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert, gepoolt und anschließend aliquotiert. Die Aliquots des Virusüberstandes wurden bis zur Verwendung für die Transduktion bei -80°C gelagert.

2.15.6 Lentivirale Transduktion

Die GFP-Markierung der Zellen sowie der *TFF1* Knockdown wurden mittels lentiviraler Transduktion durchgeführt. Lentivirale Transduktionssysteme zeichnen sich dadurch aus, dass das Expressionsplasmid in das Genom der Wirtszelle integriert wird. Dadurch wird das gewünschte Gen stabil in der Zelle exprimiert und auch an die Tochterzellen weitergegeben.

Das zur Markierung der verwendeten Zellen mit Grün-fluoreszierendem Protein (GFP) verwendete Expressionsplasmid, pCL7EGwo, besteht neben einem CMV-Promotor auch aus einem GFP-Insert, sodass die Zellen nach Integration des Plasmids in ihre DNA ein grün fluoreszierendes Protein produzieren. Dies war notwendig, um die verwendeten Zellen im Rahmen des *in ovo* Chorioallantoismembran (CAM)-Modells unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisieren zu können.

Der Mechanismus des *TFF1* Knockdowns in dieser Arbeit basiert auf dem Prinzip der RNA-Interferenz. Das dabei eingeschleuste Expressionsplasmid produziert als Genprodukt eine *small hairpin* RNA (shRNA), welche durch das Enzym Dicer zu *small interfering* RNA (siRNA) prozessiert wird. Die siRNA wird dann in den RNA-induzierten Silencing Komplex (RISC) eingebaut und kann so komplementäre mRNA binden, welche dann gespalten und abgebaut wird. Somit handelt es sich um ein posttranskriptionelles Gensilencing, mittels dem in diesem Fall die Proteinsynthese von TFF1 supprimiert wurde.

Die verwendeten viralen Partikel wurden wie in Kapitel 2.15.5 beschrieben produziert.

Zur Durchführung der Transduktion wurden zunächst je Ansatz 25×10^6 Zellen in 30 ml RB-Vollmedium ausgesät und für 24h unter den Standard Zellkulturbedingungen (siehe Kapitel 2.15.1) weiter kultiviert. Dann wurden die Zellen nach Resuspension 1:1 gesplittet und abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden jeweils 12 ml des Virusüberstandes sowie 60 µl Polybrene (4 µg/ml) hinzugegeben. Polybrene dient der Optimierung der Transduktion, indem es den Kontakt zwischen den Viruspartikeln und der Zellmembran verstärkt (Davis et al., 2002) und somit die Infektion der Zellen mit den lentiviralen Partikeln verbessert.

Nach weiteren 24 h Kultivierung der Zellen unter Standardbedingungen wurden je Ansatz 24 ml RB-Vollmedium hinzugegeben. Nach erneuter Inkubation für 48 h wurde ein Medium-Wechsel durchgeführt, indem die Zellen abzentrifugiert und der Überstand verworfen wurde, um den viralen Überstand zu entfernen. Dann wurden die Zellen in 30 ml frischem RB-Vollmedium aufgenommen.

Die weiteren Versuchsansätze starteten nach mindestens weiteren 72 h Inkubation, also an Tag 6 nach Durchführung der lentiviralen Transduktion.

2.15.7 Caspase-Inhibition

Um zu untersuchen, ob die Apoptose der RB-Zelllinien Caspase-vermittelt abläuft, wurden die Zellen mit einem allgemeinen Caspase-Inhibitor, Boc-D-Fmk, behandelt. So wurde die Caspase-Aktivität und damit die Caspase-abhängige Apoptose in den Zellen blockiert, sodass durch im Anschluss durchgeführte DAPI Assays (siehe Kapitel 2.16.3) die Caspase-unabhängige Apoptoserate beurteilt werden konnte. Hierfür wurden die Zellen wie in Kapitel 2.15.2 beschrieben auf Deckgläsern (12 mm Ø) ausgesät, wobei dem RB-Vollmedium in 1:1000 Verdünnung Boc-D-Fmk (10 µg/ µl) zugesetzt wurde. Die Zellen wurden dann auf den Deckgläsern für 24h weiter kultiviert und anschließend mit 4% Paraformaldehydlösung fixiert. Die Durchführung des DAPI Assays ist in Kapitel 2.16.3 näher beschrieben. Als Kontrolle wurden bei jedem Versuchsansatz DAPI Assays ohne Caspase-Inhibition durchgeführt.

2.16 Funktionelle *in vitro* Analysen

2.16.1 WST-1 Viabilitätsassay

Der Water-soluble tetrazolium (WST-1) Assay dient der kalorimetrischen Messung der Zellviabilität. Der Redoxindikator Tetrazolium ist ein schwach rot gefärbtes Salz, welches durch die mitochondriale Atmungskette enzymatisch zum dunkelroten Formazan umgesetzt wird. Nur lebende Zellen besitzen eine intakte Atmungskette und setzen somit mehr Tetrazolium zu Formazan um als Zellen mit einer geringen Viabilität, sodass die Stärke des Farbumschlags mit der Zellviabilität korreliert. Der Farbumschlag kann photometrisch gemessen werden und daher als Maß für die Viabilität der Zellen dienen.

Zur Durchführung des WST-1 Assays wurden zunächst in 96-Well Platten 4×10^4 Zellen/Well in je 100 µl RB-Vollmedium ausgesät. Nach 48 h Inkubation unter normalen Zellkulturbedingungen wurden je Well 10 µl der WST-1 Lösung hinzugegeben und nach weiteren 30, 60 und 90 min Inkubation eine photometrische Messung im Epoch Reader

(BioTek ®) bei 450 nm durchgeführt. Vor jeder Messung wurden die Zellen in den Wells vorsichtig resuspendiert, um Schwankungen der Messwerte zu vorbeugen.

2.16.2 5-Bromo-2'-desoxyuridin Zellproliferationsassay

Zur Analyse der Proliferationsrate der verschiedenen Zelllinien wurden Zellproliferationsassays mit 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) durchgeführt. BrdU ist ein Nukleosidanalogen von Thymidin bzw. Desoxyuridin und kann daher während der Replikation in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA der Zellen eingebaut werden. Somit markiert BrdU DNA-synthetisierende und folglich proliferierende Zellen. Zur Detektion des BrdU in den Zellen wurden ein Primärantikörper, der spezifisch an BrdU bindet, sowie ein Fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper verwendet.

Zur Durchführung des BrdU Assays wurden je 10×10^4 Zellen in Suspension mit RB-Vollmedium und 1:1000 verdünntem BrdU wie in Kapitel 2.15.2 beschrieben auf Deckgläsern (12 mm Ø) ausgesät und für 4 h bei 37° inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 4% PFA für 1 h bei 4°C auf den Deckgläsern fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen zur Permeabilisierung für 30 min mit 1% Triton behandelt und anschließend mittels 2 M Salzsäure für 60 min bei 37°C die DNA denaturiert. Nachdem die Salzsäure mit Borsäure/ Natriumboratpuffer neutralisiert wurde, kamen zum Blocken 0,3% Triton + 4% bovines Serumalbumin (BSA) + 5% normales Ziegenserum (NGS) für 1 h bei Raumtemperatur zur Anwendung, um im Weiteren eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu vermeiden. Nachfolgend wurden die Deckgläser nach dreimaligem Waschen mit PBS über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper 1:1000-fach in PBS verdünnt mit 0,1% Triton + 4% BSA + 1% NGS inkubiert. Als Zweitantikörper wurde Alexa 594, ein rot fluoreszierender Sekundärantikörper verwendet, um die Fluoreszenz der BrdU-positiven Zellen gut von der grün fluoreszierenden GFP-Markierung der Zellen abgrenzen zu können. Nach Inkubation mit dem 1:1000 in PBS verdünnten Zweitantikörper für 1h bei Raumtemperatur wurden die Deckgläser mit DAPI 1:500 in Immunfluoreszenz-Eindeckmedium (DAKO) eingedeckt.

Zur Auswertung wurde jeweils der Anteil BrdU-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt, indem die Zellen bei 40-facher Objektivvergrößerung ausgezählt wurden. Die Auszählung wurde stets verblindet durchgeführt, wobei die Zellen zur Bestimmung der Gesamtzellzahl im Durchlicht gezählt wurden, während die BrdU-positiven Zellen im Rot-Kanal der Fluoreszenz gezählt wurden. Dabei wurde eine Gesamtzellzahl von mindestens 700-1000 Zellen ausgezählt, um repräsentative Ergebnisse zu erzielen. Abbildung 2.1 zeigt beispielhaft ein Foto der fluoreszenzmikroskopischen Ansicht eines BrdU Assays.

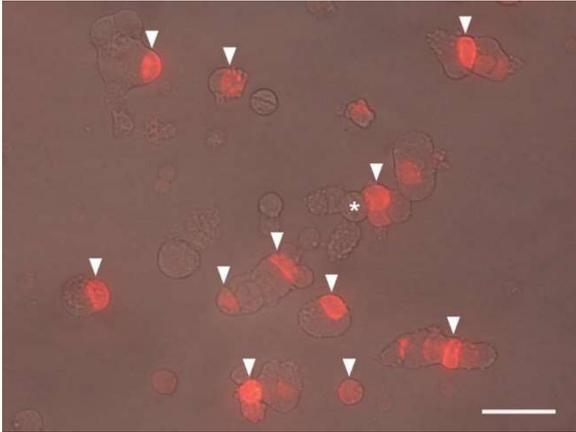


Abbildung 2.1: Exemplarische Aufnahme einer BrdU-Färbung

Digitale Überlagerung von Durchlichtbild und Fluoreszenzbild einer immunzytochemischen BrdU-Färbung von Retinoblastomzellen bei 40-facher Objektivvergrößerung. Eichbalken entspricht 50 µm. Die rot fluoreszierenden, durch die weißen Pfeilspitzen gekennzeichneten Zellen haben BrdU in ihre DNA eingebaut und zeigen daher ein rotes Fluoreszenzsignal. Der Stern markiert exemplarisch eine BrdU-negative Zelle.

2.16.3 4',6-Diamidin-2-phenylindol Zelltodassay

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, welcher sich an die DNA anlagert und somit Zellkerne markiert. Bei Übergang in die Apoptose verändert sich die zelluläre Kernmorphologie. Das Chromatin kondensiert und der Zellkern schnürt im weiteren Verlauf apoptotische Körperchen ab. Da apoptotische Zellen anhand dieser Morphologie des Zellkerns von nicht-apoptotischen Zellen differenziert werden können, ermöglicht die Fluoreszenzfärbung der Zellkerne mit DAPI die Bestimmung der Apoptoserate.

Es wurden wie in Kapitel 2.15.2 beschrieben 10×10^4 Zellen in 100 µl RB-Vollmedium je Deckglas ausgesät und für 24h weiter kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen mit 4% PFA für 1 h bei 4°C auf den Deckgläsern fixiert und nach dreimaligem Waschen in PBS mit 1:500 im Immunfluoreszenz-Eindeckmedium (DAKO) verdünnten DAPI eingedeckt.

Die Objektträger wurden stets verblindet mit einer Gesamtzellzahl von mindestens 700-1000 Zellen pro Objektträger bei 40-facher Objektivvergrößerung ausgezählt. Die Auszählung wurde im Blau-Kanal der Fluoreszenz durchgeführt und die Differenzierung zwischen vitalen und apoptotischen Zellen erfolgte anhand der bereits genannten morphologischen Kriterien. Abbildung 2.2 zeigt beispielhaft ein Foto der fluoreszenzmikroskopischen Ansicht einer DAPI-Färbung.

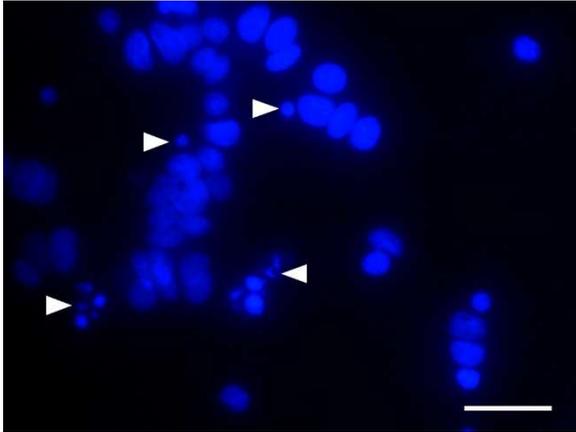


Abbildung 2.2: Exemplarische Aufnahme einer DAPI-Färbung

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme DAPI gefärbter Retinoblastomzellen bei 40-facher Objektivvergrößerung. Eichbalken entspricht 50 µm. Die blaue Fluoreszenz stellt die durch DAPI Fluoreszenz-markierten Zellkerne dar. Die weißen Pfeilspitzen kennzeichnen exemplarisch apoptotische Zellen, welche sich durch abgeschnürte apoptotische Körperchen oder Fragmentierung auszeichnen.

2.16.4 Aktivierte Caspase-3 Immunfluoreszenz Assay

Zur weiteren Analyse der Apoptose in RB-Zellen wurden Immunfluoreszenz-Färbungen von aktivierter Caspase-3 und -7, Mediatoren der Apoptose, angefertigt. Dafür wurden wie in Kapitel 2.15.2 beschrieben 10×10^4 Zellen in 100 µl RB-Vollmedium je Deckglas ausgesät und für 24h kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen mit 4% PFA für 1 h bei 4°C auf den Deckgläsern fixiert und nach dreimaligem kurzem Waschen in PBS für 5 min mit eiskaltem 100% Methanol inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS folgte die Permeabilisierung und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen bei Raumtemperatur mit 0,3% Triton + 4% BSA + 5% NGS. Die Inkubation mit dem Primäantikörper anti-aktivierte Caspase-3 wurde nach weiterem dreimaligem Waschen in PBS mit 1:400 in PBS verdünntem Antikörper mit 0,1% Triton + 4% BSA + 1% NGS durchgeführt und erfolgte über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurde nach dreimaligem Waschen in PBS der Sekundäantikörper Alexa 594 in 1:1000-facher Verdünnung in PBS mit 1 % BSA für 60 min bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Deckgläser mit DAPI 1:500 in Immunfluoreszenz-Eindeckmedium (DAKO) eingedeckt. Die Immunfluoreszenz-Färbung von aktivierter Caspase-7 erfolgte wie die Färbung von aktivierter Caspase-3, es wurde lediglich ein anderer Primäantikörper verwendet. Die Auszählung wurde stets verblindet mit einer Gesamtzellzahl von mindestens 700-1000 Zellen pro Objektträger bei 40-facher Objektivvergrößerung durchgeführt, wobei die Zellen zur Bestimmung der Gesamtzellzahl mit Hilfe der simultan durchgeführten DAPI-Färbung im Blau-Kanal der Fluoreszenz gezählt wurden, während zur Auszählung der aktivierte Caspase-3 bzw. -7 positiven Zellen der Rot-Kanal der Fluoreszenz genutzt wurde.

2.16.5 Wachstumskinetik

Um die Wachstumskinetik der RB-Zelllinien zu untersuchen wurden Wachstumskurven erstellt. Nach der Aussaat von Triplikaten mit je 300.000 Zellen (Zelllinie RBL-30) bzw. 150.000 Zellen (Zelllinie WERI-Rb1) in 500 µl RB-Vollmedium in Zellkulturplatten (24-Well) wurde die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer nach 24, 48, 72 und 96 h, sowie für die Zelllinie WERI-Rb1 nach 168 und 216 h bestimmt. Hierfür wurden 10 µl Aliquots aus der Zellsuspension entnommen. Da die Zellen im Verlauf neues Medium benötigten, wurden täglich jeweils 200 µl RB-Vollmedium pro Well zugegeben und die Veränderung des Gesamtvolumens in die Berechnung der Gesamtzellzahl einbezogen.

2.16.6 Soft Agarose Assay

Die Fähigkeit zu Zellkontakt-unabhängigem und nicht-adhärentem Wachstum ermöglicht Metastasierungsprozesse und ist ein charakteristisches Merkmal von Tumorzellen. Mithilfe des Soft Agarose Assays kann diese Fähigkeit untersucht werden, indem die Zellen vereinzelt in einer Matrix aus Agarose ausgesät werden und nachfolgend die Koloniebildungsrate bestimmt wird.

Dafür wurden zunächst Zellkulturmedien aus den in Tabelle 19 gelisteten Bestandteilen angesetzt und mit einem 0,45 µm Filter steril filtriert. Danach wurde in Zellkulturplatten (6-Well) eine Bodenschicht (Lower Agarose) gegossen, indem die aufgewärmte und daher flüssige 1%ige Agarose mit dem ebenfalls aufgewärmten DMEM/F12 Vollmedium im Verhältnis 1:1 gemischt wurde und dann in jedes Well 2 ml dieser Mischung gegeben wurden. Zum Aushärten wurde die Lower Agarose für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die obere Agarose Schicht (Soft Agarose), in der die Zellen enthalten sind, gegossen. Dazu wurde aufgewärmte 0,7%ige Agarose mit aufgewärmten DMEM/F12 Vollmedium im Verhältnis 1:1 gemischt und nach Hinzugabe von 5000 Zellen je Well gründlich resuspendiert, um die Zellen zu vereinzeln. Diese Suspension wurde mit ebenfalls 2 ml je Well verteilt. Nachfolgend wurden die 6-Well Platten bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Nach Aushärtung der Soft Agarose am Tag der Aussaat wurden 500 µl RB-Vollmedium aufgetropft, um ein Austrocknen der Soft Agarose zu verhindern. Im Verlauf der Inkubationszeit wurde dies alle 3-4 Tage wiederholt, um dem Austrocknen der Soft Agarose weiter vorzubeugen und den Zellen frische Nährstoffe zur Verfügung zu stellen. Am Tag der Aussaat wurde mittels Mikroskopie kontrolliert und dokumentiert, ob die Zellen erfolgreich vereinzelt ausgesät wurden. Bei überwiegend vereinzelter Aussaat der Zellen wurden die 6-Well-Platten für 3 Wochen inkubiert und an Tag 7, 14 und 21 die Bildung von Zellaggregaten dokumentiert. An Tag 21 wurde die Anzahl der Einzelzellen sowie die

Anzahl der Kolonien mittels Mikroskopie bei 10-facher Objektivvergrößerung in 6 Gesichtsfeldern pro Well bestimmt und anhand dessen errechnet, wieviel Prozent der ausgesäten Einzelzellen neue Kolonien gebildet haben. Dabei ergibt sich die Koloniebildungsrate als Anteil Kolonie-bildender Zellen an der Gesamtzellzahl wie folgt:

(1) Gesamtzellzahl = Anzahl Einzelzellen + Anzahl Kolonien

(2) Koloniebildungsrate [%] = $\frac{100}{\text{Gesamtzellzahl}} \times \text{Anzahl Kolonien}$

Tabelle 19: Zellkulturmedien Soft Agarose

Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM/ F12 Medium, 2-fach konzentriert	1g DMEM/ F12 Pulver 0,4 g NaHCO ₃ 50 ml steriles H ₂ O
DMEM/ F12 Vollmedium, 2-fach konzentriert	19,5 ml DMEM/ F12 Medium supplementiert mit 5 ml FBS 0,5 ml Penicillin/ Streptomycin 50 µl Insulin 50 µl 2-Mercaptoethanol

Da bereits bekannt ist, dass die verwendeten RB-Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 in der Lage sind, im Soft Agarose Assay Kolonien aus Einzelzellen zu bilden (Busch et al., 2015), wurde auf das Ansetzen von Positivkontrollen mittels der Zelllinie HEK-293T verzichtet.

2.17 Funktionelle *in ovo* Analysen

Zur Analyse des Einflusses von TFF1 auf die Invasivität und das Metastasierungsverhalten von RB-Zelllinien *in ovo* wurden Chorioallantoismembran (CAM) Assays durchgeführt.

Die Verwendung von Hühnerembryonen im Rahmen des CAM Assays ist eine etablierte Methode zur Erforschung der Metastasierungsprozesse von Tumorzellen. Der Kapillarplexus der CAM ist mit seinen Kapillaren so aufgebaut, dass die Oberfläche möglichst groß ist und daher einen guten Gas- und Nährstoffaustausch ermöglicht. So dient die CAM dem Embryo funktionell als eine Art Lunge (Deryugina und Quigley, 2008).

Die Verwendung des CAM Assays bietet viele Vorteile bei der Erforschung des Metastasierungsprozesses von Tumorzellen. Unter anderem zeichnet sich der Hühnerembryo durch seine natürliche Immundefizienz aus, sodass eine Inokulation von

diversen Spezies und Geweben möglich ist. Außerdem ist die CAM als Gefäßplexus der extraembryonalen Membranen gut erreichbar, aber mit dem Kreislauf des Embryos verbunden. In seiner Gesamtheit bietet das CAM Assay die Möglichkeit, alle Schritte der Metastasierungskaskade in einem zusammenhängenden *in ovo* und damit *in vivo* System abzubilden. Die Kosten sowie der Zeit- und Arbeitsaufwand halten sich zudem im Vergleich zu anderen *in vivo* Modellen in Grenzen (Zijlstra et al., 2002). In Bezug auf die Metastasierungskaskade ermöglicht das Spontan-Metastasen Modell des CAM Assays (siehe 2.17.1) die Untersuchung der Fähigkeit zur lokalen Ausbildung von Tumoren nach Inokulation sowie der Fähigkeit der Intravasation. Das Experimentelle-Metastasen-Modell des CAM Assays (siehe 2.17.2) ermöglicht die Untersuchung der Extravasation und Kolonisation, denn hier werden die Zellen direkt in die CAM-Gefäße injiziert (Deryugina und Quigley, 2008).

Die Anwendung des CAM Assays zur Erforschung des Zellverhaltens von RB-Zelllinien war zu Beginn dieser Arbeit bereits in der Arbeitsgruppe etabliert (Busch et al., 2015), dabei orientierte sich die Durchführung an den publizierten Protokollen von Zijlstra et al. (2002) und Palmer et al. (2011). Um die verwendeten Zellen fluoreszenzmikroskopisch visualisieren zu können, wurden die Zelllinien vor Beginn der Arbeiten mit Grün fluoreszierendem Protein (GFP) markiert (siehe Kapitel 2.15.6).

Die befruchteten Hühnereier wurden aus der Geflügelzucht Brinkschulte in Senden bezogen und in einem Rotationsinkubator bei 38°C und 50% Luftfeuchtigkeit bebrütet. Der CAM Assay wurde nach den entsprechenden Leitlinien des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) durchgeführt. Nach deutschem Tierschutzgesetz im Zeitraum der Datenerhebung war für diese Methode kein Tierversuchsantrag erforderlich, da die Hühnereier nicht bis zum Schlupfvorgang bebrütet wurden.

2.17.1 CAM Assay: Spontan-Metastasen-Modell

Um die Fähigkeit der verschiedenen RB-Zelllinien zur spontanen Metastasierung zu untersuchen, wurde der CAM Assay nach dem Spontan-Metastasen-Modell durchgeführt (Zijlstra et al., 2002; Palmer et al., 2011). Dabei werden auf der CAM Zellen inokuliert, um nach Fortführung der Inkubation für weitere 7 Tage zu untersuchen, ob aus den applizierten Zellen Tumore entstanden sind oder Tumorzellen in der unteren CAM nachweisbar sind. Nach 10 Tagen Bebrütung wurden die befruchteten Eier im Dunkeln gegen eine Lichtquelle gehalten, sodass die Gefäße unter der Schale sichtbar wurden. So kann die Chorioallantoisvene der CAM identifiziert und ca. 1 cm vor der Hauptverzweigung markiert werden, um dann in diesem Bereich mit Hilfe eines Dremels in der Kalkschale ein ca. 1x1cm

großes Fenster zu eröffnen (siehe Abbildung 2.3). Dazu wurde zunächst mit Hilfe einer spitzen Schere ein Loch in die Luftkammer der Eier gestochen, sodass die CAM beim Abheben der Schale absinken konnte. Dann wurde die CAM mit einem Wattestäbchen an der Stelle, an der danach die Zellen appliziert werden angeraut, um das Anhaften der Zellen an die CAM zu verbessern. Je Ei wurden 1×10^6 RB-Zellen in 50 μ l PBS auf die angeraute CAM appliziert, welche nun als „obere CAM“ definiert wurde (Vgl. Abbildung 2.4 D). Um ein Abschwemmen der Zellen zu verhindern, wurden die Eier nach Applikation der Zellen für 10 min nicht bewegt. Dann wurde die Kalkschale mit Klebeband verschlossen und die Bebrütung im Inkubator unter den oben genannten Bedingungen für 7 Tage fortgeführt. An Entwicklungstag 17 folgte die Präparation der Hühnereier. Die hierzu verwendeten Utensilien (Vgl. Abbildung 2.5 A) wurden vor Benutzung sowie vor jedem neuen Ei in einer Reihe aus 10M NaOH, Ethanol absolut, Aqua und Aqua desinfiziert und der Arbeitsplatz mit Terralin[®] liquid (Schülke & Mayr) gereinigt. Um die Hühnerembryonen vor der Präparation zu narkotisieren, wurden die Eier für mindestens 15 min auf Eis gekühlt. Bei der Präparation wurden die Eier mit einer Schere entlang der Längsachse aufgeschnitten und so in eine obere und untere Hälfte geteilt. Nach der Öffnung der Eier wurden die Hühnerembryonen dekapitiert. Dann wurde die obere CAM inspiziert und bei Bildung eines Tumors dieser zunächst fotografisch *in ovo* dokumentiert. Im Anschluss wurde der Tumor aus der CAM ausgeschnitten und nach Lagerung in PBS auf Eis bis zum Ende der Präparation bei -80°C auf Trockeneis schockgefroren. Exemplarisch wurden einige Tumore mittels histologischer Methoden weiter aufgearbeitet (siehe Kapitel 2.18.1).

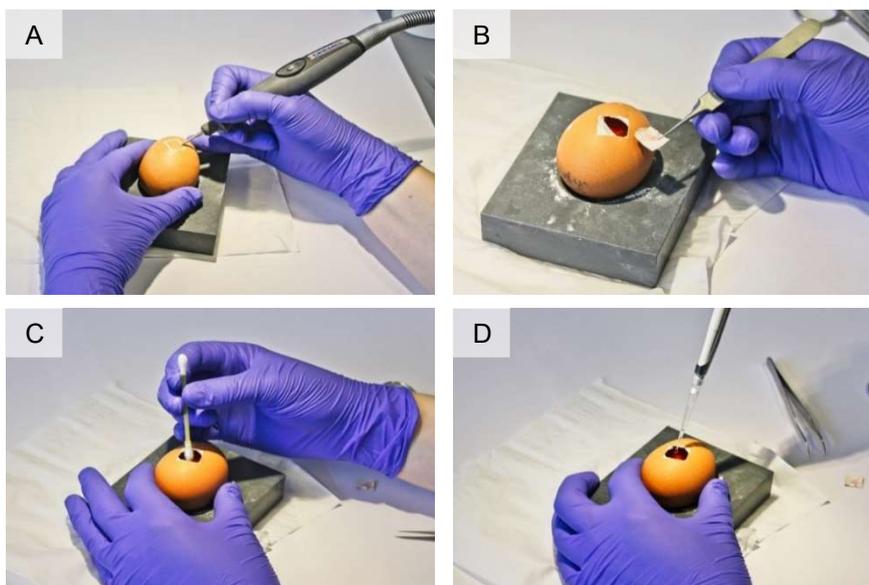


Abbildung 2.3: Durchführung des Spontan-Metastasen-Modells

(A) Die Kalkschale wird vorsichtig mit einem Dremel[®] eröffnet und die Eihaut dabei leicht verletzt, sodass die darunter liegende CAM absinkt. (B) Eröffnetes Ei mit abgesunkener CAM. (C) Die CAM wird mit einem Wattestäbchen etwas angeraut. (D) Anschließend werden die Zellen auf die CAM aufgetropft.

2.17.2 CAM Assay: Experimentelles-Metastasen-Modell

Das Experimentelle-Metastasen-Modell (Palmer et al., 2011; Zijlstra et al., 2002) basiert auf dem bereits beschriebenen CAM Assay, allerdings werden die Zellen nicht als Inokulum auf die CAM aufgebracht, sondern in das Hauptgefäß der CAM injiziert. Im Gegensatz zum Spontan-Metastasen-Modell werden die befruchteten Eier erst an Entwicklungstag 12 eröffnet. Da die Gefäße der CAM an Embryonaltag 12 wesentlich größer sind als an Embryonaltag 10, gelingt Injektion der Zellen in das Gefäß deutlich besser.

Nach Markierung des CAM Hauptgefäßes (Vgl. Kapitel 2.17.1) wurde für die Eröffnung der Eier keine Manipulation der Luftblase vorgenommen und die äußere Eihaut nicht verletzt, da in diesem Fall die CAM nicht absinken durfte. So blieb die CAM nach Eröffnung des Eis unter der ebenfalls erhaltenen äußeren Eihaut gespannt, was eine Voraussetzung für die praktische Durchführung der Injektion darstellt. Um die Gefäße der CAM für die Injektion sichtbar zu machen, wurde Mineralöl aufgeträufelt. So wird die äußere weiße Eihaut vorübergehend durchscheinend, sodass die Gefäße der CAM sichtbar sind (siehe Abbildung 2.4 B).

Die RB-Zellen wurden mittels Insulinspritze unter einem Mikroskop in das CAM-Gefäß injiziert. Je Ei wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen in 50 μ l DMEM Grundmedium in das Hauptgefäß der CAM injiziert und die Nadel sowie Spritze danach mit Terralin[®] liquid (Schülke & Mayr) und PBS gereinigt.

Die Präparation wurde bei Durchführung des Experimentelle-Metastasen Modells an Entwicklungstag 18 durchgeführt und der Ablauf entsprach grundsätzlich dem des Spontan-Metastasen-Modells (siehe Kapitel 2.17.1). Allerdings wurden hier zusätzlich zur Inspektion und ggf. Dokumentation der oberen CAM auch Gewebestanzen der „unteren“ CAM gewonnen, welche als gegenüberliegende Hälfte der oberen CAM definiert wurde (Vgl. Abbildung 2.4 D). Dazu wurden zur Standardisierung der Gewebemenge immer sechs gleichmäßig über die untere CAM verteilte Stanzen gleicher Größe gewonnen. Nachfolgend wurde zunächst mittels Fluoreszenzmikroskopie qualitativ beurteilt, ob RB-Zellen aus den Gefäßen in umliegendes Gewebe eingewandert sind. Da die verwendeten Zelllinien GFP-markiert waren, konnten in der Fluoreszenz die grün leuchtenden Signale eindeutig RB-Zellen zugeordnet werden. Danach wurden die sechs CAM-Stanzen eines Eis gepoolt auf Trockeneis bei -80°C schockgefroren, um im Weiteren mittels *Realtime* RT-PCR zur Beurteilung des Gehalts an RB-Zellen die Expression von *hGAPDH* zu quantifizieren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die CAM-Stanzen bei -80°C gelagert. Details bzgl. der Aufarbeitung des CAM-Gewebes sind Kapitel 2.18.1 zu entnehmen.

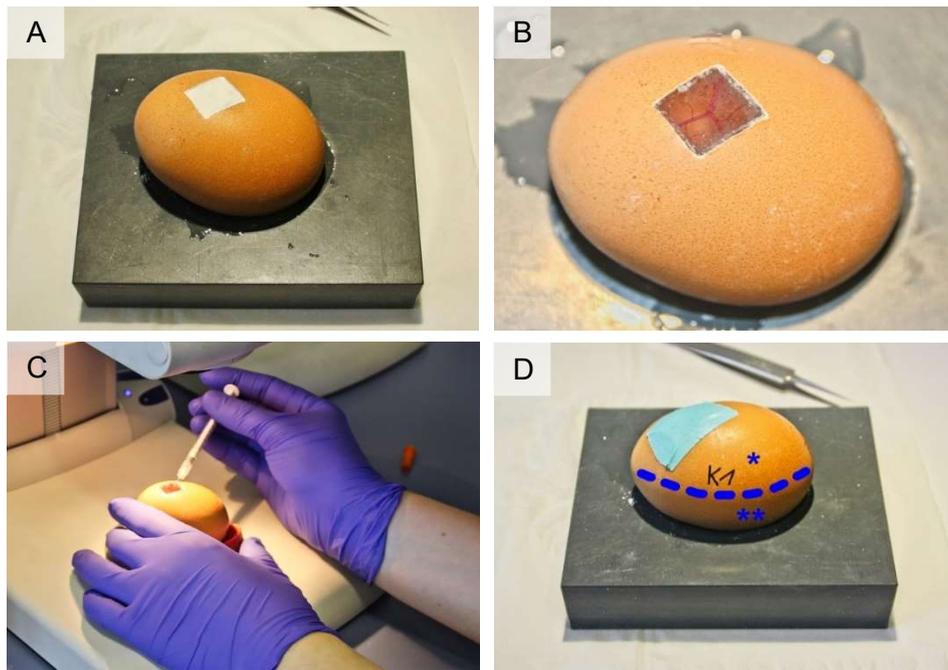


Abbildung 2.4: Durchführung des Experimentelle-Metastasen-Modells

(A) Für die Durchführung der Injektion von Zellen in das CAM-Gefäß wird nur die Kalkschale mithilfe des Dremel®s entfernt und die Eihaut nicht verletzt. (B) Durch die Applikation eines Tropfens Mineralöl wird die weiße Eihaut vorübergehend durchsichtig. (C) Unter dem Stereomikroskop kann die Zellsuspension bei durchsichtiger CAM mithilfe einer Feindosierungsnadel einer Insulinspritze in das freigelegte CAM-Gefäß injiziert werden. (D) Anschließend wird der eröffnete Bereich der Kalkschale mit Klebeband verschlossen und das Ei zurück in den Inkubator gelegt. Die gestrichelte Linie markiert die Grenze zwischen oberer (*) und unterer (**) CAM.

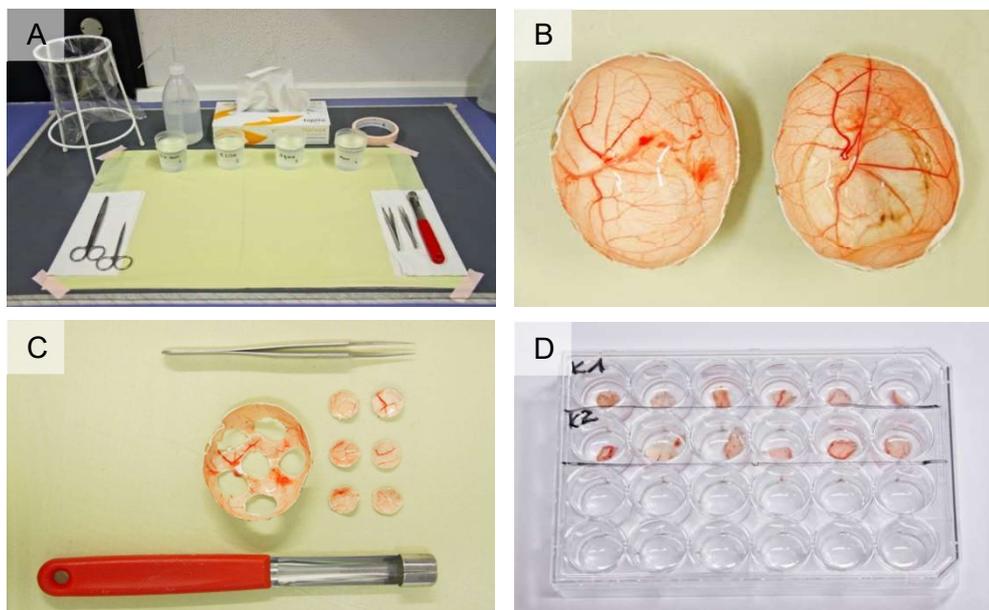


Abbildung 2.5: Präparation im Rahmen des CAM Assays

(A) Aufbau des Arbeitsplatzes für die Präparation, (B) Ansicht von innen auf die obere und untere CAM mit zahlreichen Gefäßen *in ovo*, (C) Gewinnung von Gewebestücken der unteren CAM, (D) Lagerung der Gewebestücken in PBS bis zur mikroskopischen Beurteilung

Um den Gehalt an RB-Zellen im Gewebe beurteilen zu können, wurden die Gewebestellen bezüglich der Expression von humanem GAPDH (*hGAPDH*) und *18S* als endogene Referenz untersucht, wie von Busch et al. (2015) beschrieben. Die mittels *Realtime* RT-PCR bestimmte Konzentration an *hGAPDH* korreliert mit der Konzentration an RNA der RB-Zellen, da *hGAPDH* in den humanen Retinoblastomzellen, nicht aber in den Zellen des Hühnerembryos exprimiert wird. Als endogene Referenz dient hierbei *18S*, da es sowohl im CAM-Gewebe als auch in den humanen RB-Zellen exprimiert wird. Um eine absolute Quantifizierung durchzuführen, wurde für jede Auswertung eine Standardkurve erstellt, indem in aufsteigender Konzentration eine bekannte Menge RNA aus den Retinoblastomzellen in eine absteigende Menge an aus unbehandelten CAM-Stanzen isolierter RNA eingesetzt wurde. Dann wurde mittels *Realtime* RT-PCR *18S* und *hGAPDH* quantifiziert und durch Bildung des Quotienten *18S/ hGAPDH* ins Verhältnis gesetzt. So konnte anhand der Standardkurve berechnet werden, welche RNA Menge dem mittels *Realtime* RT-PCR bestimmten Quotienten *18S/ hGAPDH* der behandelten CAM-Stanzen entspricht.

Im Folgenden ist beispielhaft eine Standardkurve für die Quantifizierung mittels dieser Methode abgebildet (siehe Abbildung 2.6).

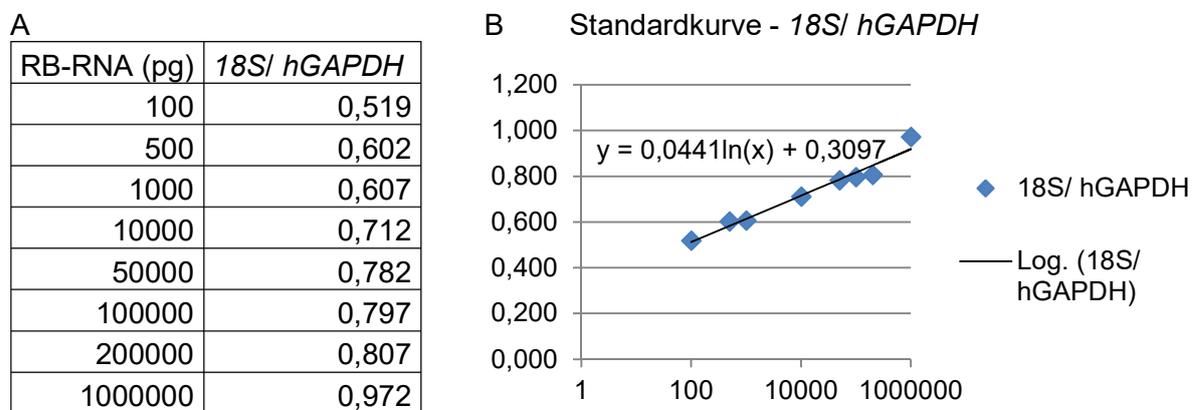


Abbildung 2.6.: Ermittlung einer Standardkurve zur absoluten Quantifizierung mittels *Realtime* RT-PCR

(A) Die Tabelle zeigt eine Konzentrationsreihe an definierter Menge RB-RNA sowie den entsprechenden Quotienten *18S/ hGAPDH*. (B) Das Diagramm zeigt die aus der Konzentrationsreihe mittels Ausgleichsgrade bestimmte Standardkurve.

Nach Ermittlung der Standardkurve konnte die RB-RNA Konzentration der Proben mit folgender Formel berechnet werden: Konzentration (RB-RNA) = $e^{(y-0,3097)/0,0441}$

2.18 Histologische Methoden

2.18.1 Gewebeaufarbeitung

Die aus den CAM Assays gewonnenen und bei -80°C auf Trockeneis schockgefrorenen Gewebeproben wurden zur Verwendung für *Realtime* RT-PCR Analysen mithilfe eines Mörsers fein zermahlen, sodass das Gewebepulver nachfolgend zur RNA-Isolation verwendet werden konnte (siehe Kapitel 2.13.1). Um zu verhindern, dass das Gewebe bei dieser Prozedur auftaut, wurden alle Utensilien auf Trockeneis kaltgestellt. Zwischen den einzelnen Proben wurden alle verwendeten Materialien zur Vermeidung von Kontaminationen mit Ethanol und Wasser gereinigt, sowie anschließend zusätzlich mit Terralin desinfiziert.

Ein Teil der im CAM Assay isolierten Tumore wurde zur Erstellung von histologischen Färbungen fixiert. Hierzu wurden die Tumore in 4% PFA je nach Größe des Tumors für 1-2 h bei 4°C auf einem Rundschüttler inkubiert. Danach folgte in aufsteigender Konzentration zuerst eine Inkubation für 30 min in 15% Succrose, anschließend für 30 min in 30% Succrose. Im Anschluss daran wurden die Tumore unter Verwendung von Tissue Tec Mounting Medium in Einbettschälchen eingedeckt und zur Aushärtung zunächst über Nacht bei -80°C , nachfolgend bei -20°C gelagert.

Mittels Kryostat wurden $10\ \mu\text{m}$ dicke Serienschnitte von den eingedeckten Tumoren angefertigt und auf Super-Frost Objektträger aufgezogen. Im Weiteren wurden die Tumorschnitte mit DAPI oder HE gefärbt (siehe Kapitel 2.18.2 bzw. 2.18.3).

2.18.2 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Färbung

Zur Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Vgl. 2.16.3) wurden die Tumorschnitte zunächst für 5 min in PBS auf einem Rundschüttler gewaschen, um Reste des Tissue Tec Mounting Mediums zu lösen. Zum Eindecken wurden Deckgläser der Größe 24 x 60 mm sowie $70\ \mu\text{l}$ Immunfluoreszenz-Eindeckmedium mit 1:500 verdünntem DAPI verwendet.

2.18.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) wurde ebenfalls bei der Aufarbeitung der Tumorschnitte angewendet. Dafür wurden die Objektträger mit den Tumorschnitten zuerst für 5 min in PBS auf einem Rundschüttler gewaschen, um Reste des Eindeckmediums zu entfernen. Nach einem kurzen Waschschrift mit Millipore H_2O wurden die Tumorschnitte für 5 min in Hämatoxylin inkubiert. Darauf folgte nach einem Waschschrift mit H_2O eine kurze

Inkubation mit Salzsäure, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Anschließend folgte mit 10 min Inkubation in H₂O das Bläuen des Hämatoxylins und dann ein weiterer Waschschrift mit Millipore H₂O. Danach wurden die Objektträger für 2 min in Eosin inkubiert. Zur Entwässerung folgten, nach einem weiteren Waschschrift mit Millipore H₂O, 1 min Inkubation in 70% Ethanol und 1 min Inkubation in 96% Ethanol, gefolgt von 1 min Inkubation in Isopropanol. Zum Schluss wurden die Schnitte 2x 5 min in Xylolersatz inkubiert und anschließend mit Xylolersatz-Eindeckmittel und 24 x 60 mm Deckgläsern eingedeckt.

2.19 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism Version 4.00 für Windows (GraphPad Software Incorporated, USA, www.graphpad.com) durchgeführt. Dabei stammten die Daten im Regelfall aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die Auswertung erfolgte durch den ungepaarten zweiseitigen t-Test (DAPI-, BrdU-, aktivierte Caspase-3 und -7 Assays, Soft Agarose Assay, Tumorbildungsrate im CAM Assay), gepaarten zweiseitigen t-Test (Auswertung der *TFF1* Knockdown-Effizienz, WST-1 Viabilitätsassay, Anteil *hGAPDH*⁺ Stenzen im CAM Assay), Mann-Whitney-Test (Quantifizierung von *hGAPDH* im CAM Assay), sowie *One-Way*-ANOVA und Newman-Keuls Test bei mehr als 2 Daten Sets (Caspase-Inhibition).

Die Auswertung der quantitativen *Realtime* RT-PCRs erfolgte in Microsoft Excel mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001).

Zur statistischen Auswertung der Wachstumskurven wurde ein Permutationstest mithilfe der Webschnittstelle <http://bioinf.wehi.edu.au/software/compareCurves/> (Stand: Juli 2017) durchgeführt.

Die statistische Signifikanz wurde mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ definiert. In den Abbildungen wird das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt.

3 ERGEBNISSE

Um die biologische Funktion von *TFF1* in Bezug auf Proliferation, Apoptose, Migrationsverhalten und Invasivität von Retinoblastomzellen (RB-Zellen) zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit in ausgewählten RB-Zelllinien die *TFF1*-Expression mittels lentiviralen Knockdowns (KD) supprimiert. Anschließend wurden die RB-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in ovo* analysiert und mit Kontroll-Zellen mit unveränderter endogener *TFF1* Expression verglichen.

3.1 Auswahl der verwendeten Retinoblastomzelllinien

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Retinoblastomzelllinien (RB-Zelllinien) RBL-13, RBL-30 und WERI-Rb1 verwendet.

Bei diesen Zelllinien handelt es sich um Suspensionszellen, die in Zellaggregaten wachsen. Die Zelllinie WERI-Rb1 zeichnet sich durch ein schnelles Wachstum bei besonders niedriger Apoptoserate, eine ausgeprägte Fähigkeit zu Zellkontakt-unabhängigem Wachstum, sowie einem hohen Potential für Migration im CAM Assay aus. Die Zelllinie RBL-30 zeigt hingegen eine langsamere Wachstumskinetik, geringere Effizienz bzgl. Zellkontakt-unabhängigem Wachstum und zeigt im CAM Assay ein Potential für Migration sowie Invasivität. Die Zelllinie RBL-13 zeichnet sich durch die außergewöhnlich ausgeprägte Bildung von Zellaggregaten in der Suspensionskultur aus (siehe Abbildung 3.1). Sie zeigt ähnlich wie die Zelllinie RBL-30 im Vergleich zu anderen RB-Zelllinien eine langsame Wachstumskinetik und ist zu Zellkontakt-unabhängigem Wachstum fähig. Sowohl im Spontan-Metastasen-Modell wie auch im Experimentelle-Metastasen-Modell des CAM Assays ist die Zelllinie RBL-13 zur Tumorbildung fähig (Busch et al., 2015).

Voraussetzung für einen erfolgreichen *TFF1* Knockdown war die Auswahl von RB-Zelllinien mit vergleichsweise hoher endogener *TFF1* Expression, um größtmögliche Differenzen im Expressionslevel von *TFF1* zu erreichen und so die Effekte bestmöglich detektieren zu können. Als Grundlage für die Auswahl der Zelllinien diente die von unserer Arbeitsgruppe bereits analysierte relative *TFF1*-mRNA Expression, bezogen auf die humane Retina als Referenz (siehe Abbildung 3.2). Philippeit et al. (2014) konnten zeigen, dass in mehreren RB-Zelllinien *TFF1*-mRNA signifikant höher exprimiert wird als in der humanen Retina. Besonders die Zelllinien RBL-13, RBL-30, RB 383 und WERI-Rb1 eigneten sich aufgrund der hohen endogenen *TFF1*-mRNA Expression grundsätzlich für die Durchführung des *TFF1* Knockdowns (Abbildung 3.2).

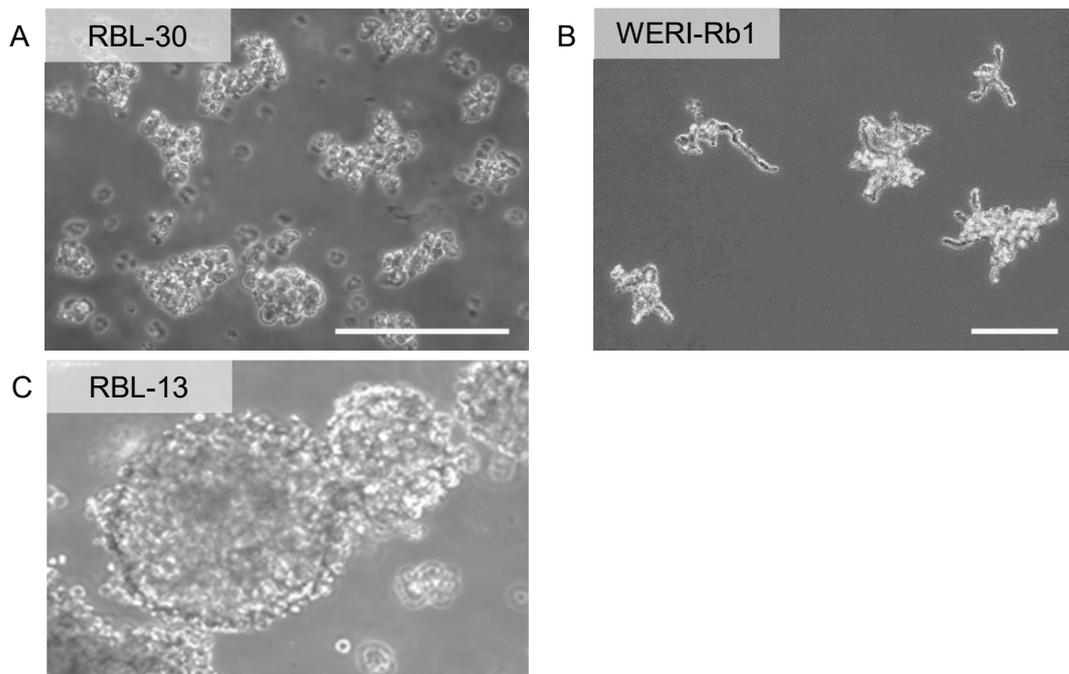


Abbildung 3.1: Zelllinien RBL-30, WERI-Rb1 und RBL-13

Repräsentative Fotos der RB-Zelllinien in der Phasenkontrast-Mikroskopie. Die Zelllinie RBL-30 zeigt ein Wachstum in Aggregaten (A), die Zelllinie WERI-Rb1 zeigt eine Aggregat-bildung sowie angedeutet das typische Wachstum in kettenförmigen Strukturen (B) und Zelllinie RBL-13 zeigt eine außergewöhnliche Form von Zellaggregaten in Form von dreidimensionalen Aggregaten (C) (Busch et al., 2015). Eichbalken entsprechen 100 μ m.

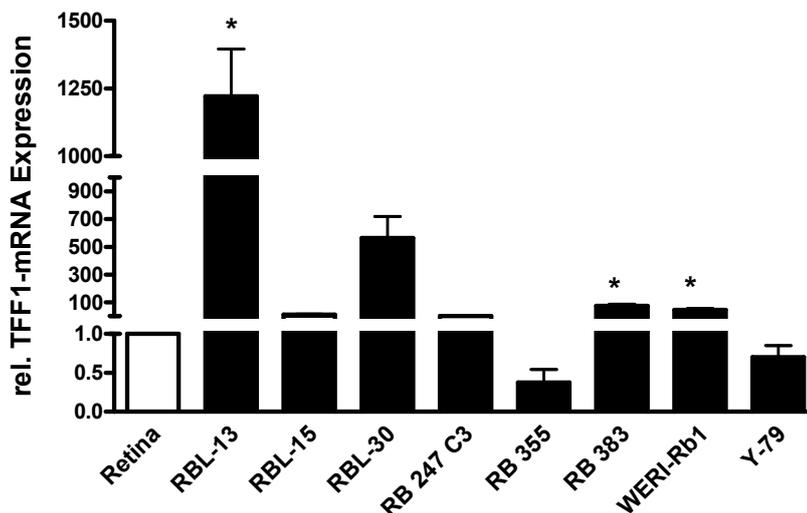


Abbildung 3.2: Endogene *TFF1* Expression von verschiedenen RB-Zelllinien

Endogene *TFF1* Expression von acht RB-Zelllinien im Vergleich zur gesunden humanen Retina als Positivkontrolle. Die Balken stellen das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) von drei unabhängigen RNA Analysen dar. Hierbei wurde die statistische Signifikanz mit * $p < 0,05$ im Vergleich zur humanen Retina definiert. Abbildung modifiziert nach Philippeit et al. (2014).

Die Zelllinie RB-383 stand im Erhebungszeitraum der Daten in unserer Arbeitsgruppe nicht zur Verfügung. Daher wurde die Etablierung des lentiviralen *TFF1* Knockdowns in den oben näher beschriebenen Zelllinien RBL-13, RBL-30 und WERI-Rb1 angestrebt.

Da die Zelllinien auch für den *in ovo* Chorioallantoismembran (CAM) Assay genutzt wurden, wurden mittels lentiviraler Transduktion GFP-markierte RB-Zellen verwendet. Die Etablierung der GFP-markierten Zelllinien wurde im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe durchgeführt.

3.2 Etablierung eines stabilen *TFF1* Knockdowns in Retinoblastomzelllinien

Mit dem Ziel der Etablierung eines stabilen lentiviralen *TFF1* Knockdowns (*TFF1* KD) in den RB-Zelllinien WERI-Rb1, RBL-30 und RBL-13 wurden zunächst je Zelllinie einmalig mehrere käuflich erworbene sh-Klone auf ihre Effektivität getestet, die *TFF1* Expression zu reduzieren (siehe Abbildung 3.3). Hierfür wurde die *TFF1* Expression nach lentiviraler Transduktion mittels *Realtime* RT-PCR bestimmt und mit der Expression in den Kontrollen verglichen. Für die Kontrollen wurde anstelle der sh-Klone der Kontrollvektor pPRIME-CMV-Neo-FF3 (Stegmeier et al., 2005) verwendet, welcher mittels CMV-Promotor für eine Luciferase mikro-RNA transkribiert.

Für die RB-Zelllinie RBL-13 erreichten in der Etablierung die Klone sh*TFF1* #3 und sh*TFF1* #6 mit einer Reduktion der *TFF1* Expression auf 18% bzw. 23% der endogenen Expression ähnliche Ergebnisse. Hier prüften wir den Effekt einer Kombination der beiden Klone sh*TFF1* #3 und sh*TFF1* #6. Die simultane Anwendung ergab mit einer Reduktion der *TFF1* Expression auf 47% jedoch keine verbesserte Knockdown-Effizienz (Daten nicht gezeigt), sodass darauf verzichtet und im Weiteren sh*TFF1* #3 verwendet wurde.

Je nach Zelllinie wurden im Weiteren für die Durchführung des *TFF1* KD die Plasmidvektoren sh*TFF1* #2 (TRCN0000033614) oder sh*TFF1* #6 (TRCN0000033616) verwendet. Der Klon sh#1 wurde zur Etablierung des lentiviralen Knockdowns in der Zelllinie WERI-Rb1 nicht mehr verwendet, da dieser Klon in der Anwendung in der Arbeitsgruppe nie zu einem erfolgreichen *TFF1* KD geführt hatte.

In der Etablierung konnte für die Zelllinie RBL-30 eine Reduktion der *TFF1* Expression auf 3%, bzw. für die Zelllinie WERI-Rb1 auf 14% des endogenen Expressionslevels erreicht werden (siehe Abbildung 3.3).

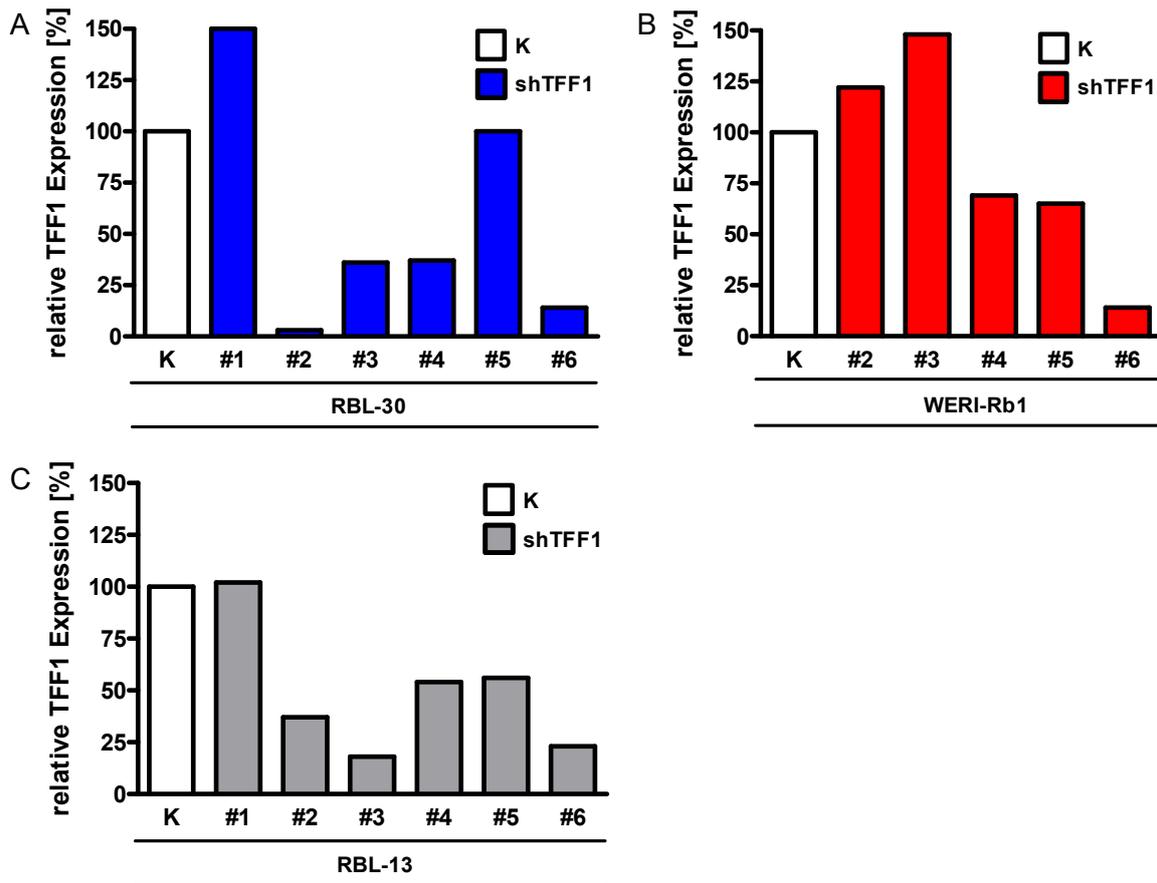


Abbildung 3.3: TFF1 Expression nach lentiviralem Knockdown mit verschiedenen sh-Klonen

Relative *TFF1* Expression nach lentiviralem Knockdown (KD) mit verschiedenen sh-Klonen (#1 - #6) in der Zelllinie RBL-30 (A; #2 – 3%), WERI-Rb1 (B; #6 – 14%) und RBL-13 (C; #3 – 18% und #6 – 23%) nach Analyse mittels *Realtime* RT-PCR, bezogen auf die Expression in den Kontrollen (K), die hier als 100% definiert wurde.

3.3 Nachweis des stabilen *TFF1* Knockdowns

Um den erfolgreichen *TFF1* KD vor den durchzuführenden funktionellen Untersuchungen zu bestätigen, wurde für jeden Versuchsansatz der Erfolg des KD mittels *Realtime* RT-PCR an Tag 8 nach lentiviraler Transduktion auf RNA-Ebene quantifiziert.

Bei Verwendung der Zelllinie RBL-13 konnte wiederholt kein zufriedenstellender *TFF1* KD erreicht werden (Daten nicht gezeigt), sodass im Weiteren nur die Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 verwendet wurden.

Abbildung 3.4 zeigt eine übergreifende Auswertung der KD Effizienz aus allen einbezogenen Versuchsansätzen. Durchschnittlich wurde in den Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 nach lentiviralem *TFF1* KD eine *TFF1* KD Effizienz von 92% erreicht.

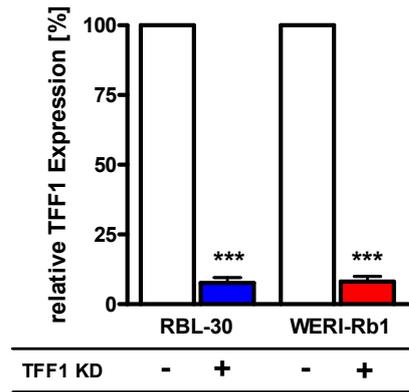


Abbildung 3.4: Nachweis des erfolgreichen *TFF1* Knockdowns auf RNA-Ebene mittels *Realtime* RT-PCR

Relative *TFF1*-Expression nach lentiviralem Knockdown (KD, +) nach Analyse mittels *Realtime* RT-PCR, bezogen auf die Expression in den Kontrollen (-), die als 100% definiert wurden. Die relative Expression wurde mittels $-\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet, Auswertung mit gepaartem zweiseitigen t-Test, *** $p < 0,001$. Die Balken stellen das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Darüber hinaus konnte der *TFF1* KD für die Zelllinie RBL-30 mittels Western Blot auf Protein-Ebene nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.5). Hierbei diente β -Aktin als endogene Kontrolle, sowie rekombinantes *TFF1* (r*TFF1*) als positiv-Kontrolle. In der Kontrolle (K) sind sowohl die *TFF1*-Bande bei 12 kDa als auch die β -Aktin-Bande bei 45 kDa nachweisbar. Nach lentiviralem *TFF1* KD ist die β -Aktin-Bande als Ladekontrolle weiterhin nachweisbar, allerdings keine *TFF1*-Bande. Dies weist einen erfolgreichen *TFF1* KD auf Proteinebene nach.

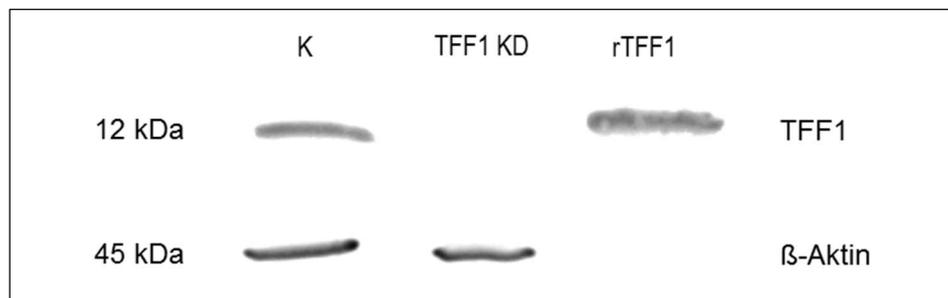


Abbildung 3.5: Nachweis des erfolgreichen *TFF1* Knockdowns auf Protein-Ebene mittels Western Blot

Repräsentative Darstellung eines Western Blots nach lentiviralem *TFF1* Knockdown (KD) sowie der Kontrolle (K) in der Zelllinie RBL-30. Rekombinantes *TFF1* (r*TFF1*) bei 12 kDa dient als Referenz, β -Aktin bei 45 kDa als Ladekontrolle.

3.4 Untersuchungen zum Einfluss des stabilen *TFF1* Knockdowns auf die Zellviabilität

Mittels WST-1 Assay wurde die Zellviabilität nach *TFF1* KD im Vergleich zur Kontrolle analysiert. Für beide untersuchten RB-Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 konnte keine signifikante Änderung der Zellviabilität nach *TFF1* KD festgestellt werden (siehe Abbildung 3.6). Es zeigt sich eine Tendenz zur Steigerung der Zellviabilität nach *TFF1* KD in der Zelllinie RBL-30, sowie eine Tendenz zur Reduktion der Zellviabilität nach *TFF1* KD in der Zelllinie WERI-Rb1.

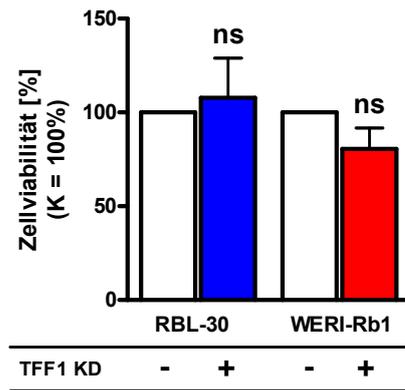


Abbildung 3.6: Einfluss von *TFF1* KD auf die Zellviabilität in den Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1

Zellviabilität ermittelt durch WST-1 Assay nach *TFF1* KD (+), bezogen auf die Kontrollen (K, -), die hier als 100% definiert wurden. Die dargestellten Messungen erfolgten 60 min nach Zugabe der WST-1-Arbeitslösung. Auswertung von mindestens 3 unabhängigen je in 2 Triplikaten angesetzten Versuchen mit gepaartem zweiseitigen t-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; nicht signifikant (ns) $p \geq 0,5$. Die Balken stellen das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

3.5 Untersuchungen zur Wachstumskinetik und Proliferation nach stabilem *TFF1* Knockdown

Um den Einfluss von *TFF1* auf die Wachstumskinetik der RB-Zelllinien zu untersuchen, wurden Wachstumskurven nach *TFF1* KD im Vergleich zu den Kontroll-Zellen über einen Untersuchungszeitraum von bis zu 216 h nach Aussaat erstellt. Hier zeigten beide RB-Zelllinien nach *TFF1* KD im Vergleich zu den Kontrollen ein geringeres Wachstum (siehe Abbildung 3.7).

Die Zelllinie RBL-30 zeigte in den Kontrollen in den ersten 24 h nach Aussaat der Zellen nahezu eine Stagnation der Zellzahl, anschließend ein positives Wachstum und erreichte 96 h nach Aussaat ein durchschnittliches Wachstum auf das ca. 1,6-fache der Ausgangszellzahl. Nach *TFF1* KD zeichnete sich innerhalb der ersten 24 h eine Reduktion des Wachstums ab. Im weiteren Verlauf kam es zu einer weitgehenden Stagnation der Zellzahl bei ca. dem 0,7-fachen der Ausgangszellzahl. (siehe Abbildung 3.7 A).

Die Kontrollen der Zelllinie WERI-Rb1 zeigten in den ersten 96 h eine Steigerung der Gesamtzellzahl um das 1,8-fache. Nach 96 h zeigte sich das Wachstum hier stark progredient, sodass sich die Gesamtzellzahl zum Messzeitpunkt 216 h nach Aussaat durchschnittlich um das 5,4-fache steigerte. Nach *TFF1* KD zeigte die Zelllinie WERI-Rb1 eine weitgehende Stagnation der Gesamtzellzahl über den gesamten Untersuchungszeitraum. Nach 216 h zeigte sich ein geringes Wachstum auf das 1,4-fache der Ausgangszellzahl (siehe Abbildung 3.7 B).

Die statistische Auswertung ergab für beide Zelllinien zu jedem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen der absoluten Zellzahl der Kontrollen und nach *TFF1* KD. Auch die Gesamtauswertung der Wachstumskurven zeigte für beide Zelllinien eine hochsignifikante Reduktion des Wachstums nach *TFF1* KD, für die Zelllinie RBL-30 mit $p = 0,0003$ und für die Zelllinie WERI-Rb1 mit $p = 0,0002$.

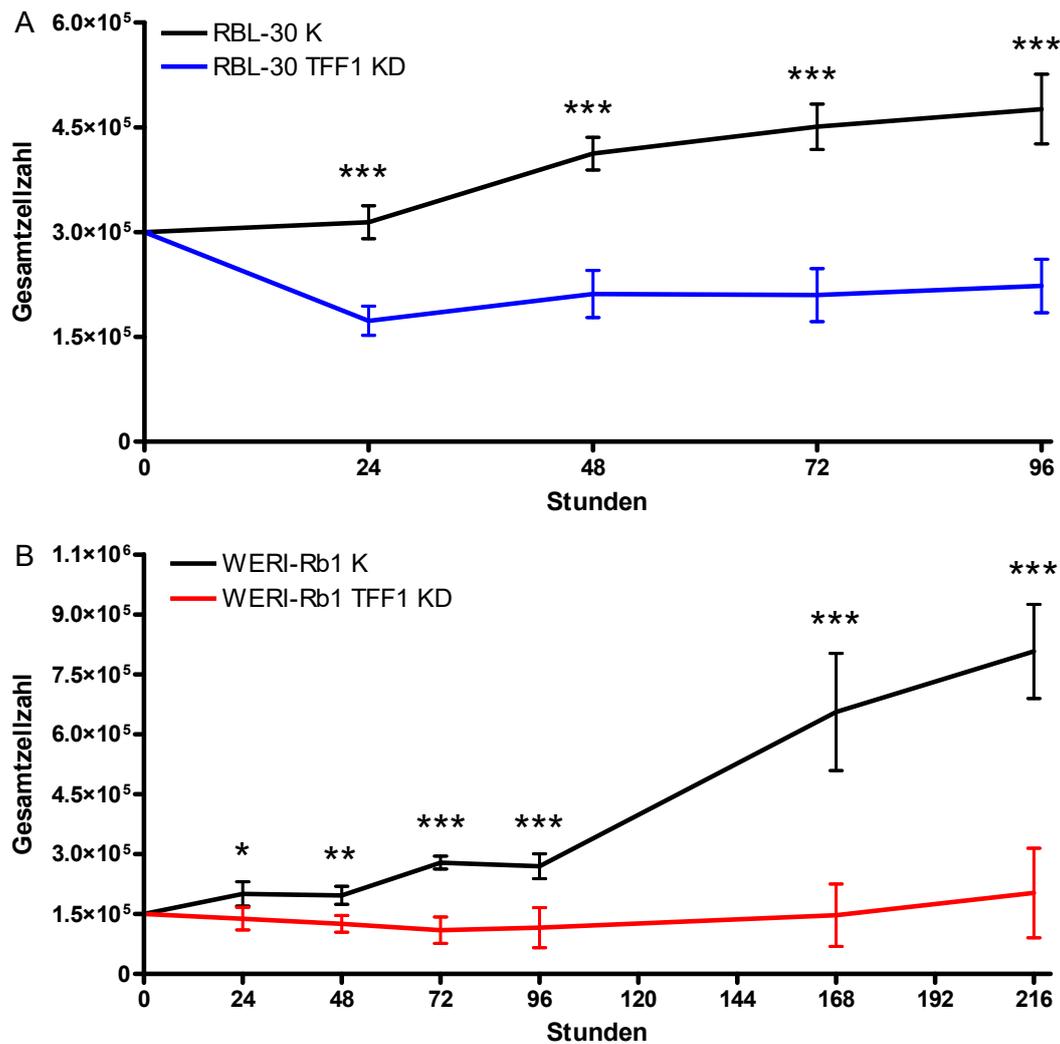


Abbildung 3.7: Wachstumskurven der Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 nach lentiviraler Transduktion

Wachstumskurven der Zelllinien RBL-30 (A) und WERI-Rb1 (B), jeweils der Kontrollen (K) bzw. nach *TFF1* Knockdown (*TFF1* KD). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Zu jedem Messzeitpunkt ist das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt, sowie die statistische Signifikanz des einzelnen Messpunkts.

Um zu untersuchen, ob die Wachstumseffekte nach *TFF1* KD durch eine Veränderung der Proliferation der Zellen hervorgerufen werden, wurden im Weiteren BrdU Assays angefertigt (siehe Abbildung 3.8). In beiden untersuchten Zelllinien konnte keine signifikante Veränderung der Proliferationsrate durch den *TFF1* KD gezeigt werden. Die Tendenz zur Reduktion der Zellviabilität nach *TFF1* KD im WST-Assay (Vgl. Kapitel 3.4) in der Zelllinie WERI-Rb1 spiegelt sich hier in einer Tendenz zur Reduktion der Proliferationsrate wider. Ebenso zeichnete sich in der Zelllinie RBL-30 im WST-Assay eine Tendenz zur Steigerung der Zellviabilität ab, wie sich auch hier eine Tendenz zur Steigerung der Proliferationsrate nach *TFF1* KD zeigt.

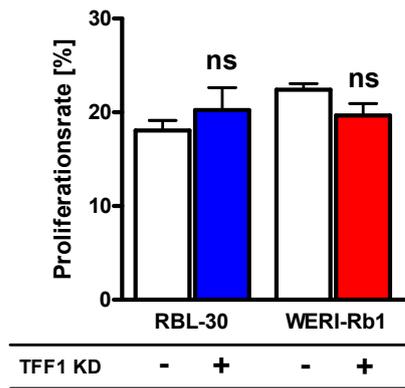


Abbildung 3.8: Einfluss von *TFF1* KD auf die Proliferationsrate der Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1

Proliferationsrate der Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 nach *TFF1* KD (+) bzw. in den Kontrollen (-) nach BrdU Assay. Auswertung von mindestens 3 unabhängigen in je zwei Triplikaten angesetzten Versuchen mit ungepaartem zweiseitigen t-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; nicht signifikant (ns) $p \geq 0,5$. Die Balken stellen das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

3.6 Untersuchungen zum Einfluss des stabilen *TFF1* Knockdowns auf das Apoptoseverhalten

Die Analyse des Apoptoseverhaltens erfolgte zunächst mittels DAPI Assay und wurde im Weiteren durch DAPI Assays nach Caspase-Inhibition sowie immunzytochemische Anfärbung von aktivierter Caspase-3 (aktivierte Caspase-3 Immunfluoreszenz Assay) mit und ohne Caspase-Inhibition ergänzt.

3.6.1 DAPI Zelltodassay und Caspase-Abhängigkeit nach *TFF1* Knockdown

Um zu untersuchen, ob die Reduktion im Wachstum nach *TFF1* KD durch eine Veränderung der Apoptoserate hervorgerufen wird, wurde die Apoptoserate der Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 nach *TFF1* KD im Vergleich zu den Kontroll-Zellen analysiert.

Hierbei zeigte sich im DAPI Zelltodassay für beide verwendeten RB-Zelllinien ein durch den *TFF1* KD induzierter signifikanter pro-apoptotischer Effekt (siehe Abbildung 3.9). Während die Apoptoserate der Zelllinie WERI-Rb1 von durchschnittlich 7,2 % in den Kontrollen auf durchschnittlich 11,8% nach *TFF1* KD auf ca. das 1,6-fache gesteigert wurde, verursachte der *TFF1* KD in der Zelllinie RBL-30 eine Verdopplung der Apoptoserate von durchschnittlich 5,3% in den Kontrollen auf durchschnittlich 11,0% nach *TFF1* KD.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die durch den *TFF1* KD induzierte Apoptose Caspase-abhängig ist. Dazu wurden die RB-Zellen nach lentiviraler Transduktion mit einem allgemeinen Caspase-Inhibitor (Boc-D-Fmk) behandelt und im Anschluss daran wurden wie bereits beschrieben DAPI Zelltodassays durchgeführt. Die nach *TFF1* KD gesteigerte Apoptose zeigte sich in beiden Zelllinien Caspase-abhängig, was sich aus der signifikanten Reduktion der Apoptoserate nach Caspase-Inhibition ableiten lässt. Die Apoptose der Kontrollen zeigte sich in beiden Zelllinien Caspase-unabhängig, denn die Caspase-Inhibition führte zu keiner signifikanten Reduktion der Apoptoserate (siehe Abbildung 3.9).

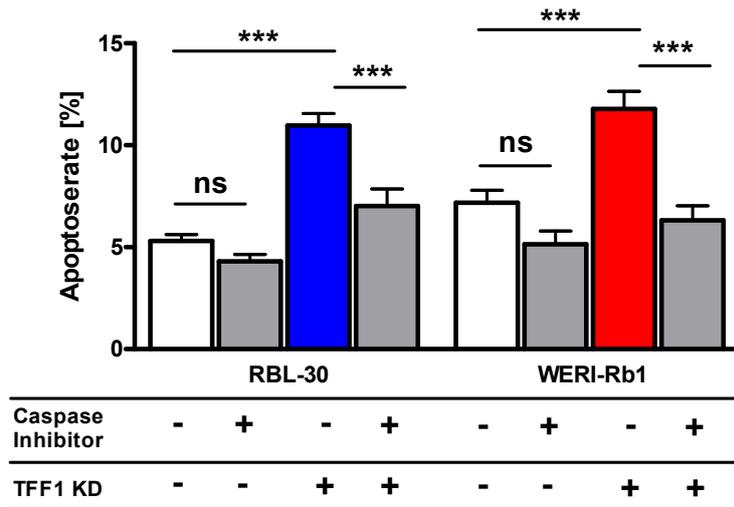


Abbildung 3.9: Untersuchung des Einflusses von *TFF1* KD auf die Apoptose in den Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 mittels DAPI Assay und Caspase-Inhibition

Apoptoserate der Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 nach Analyse mittels DAPI Zelltodassay und Caspase-Inhibition. Die Legende unterhalb der X-Achse zeigt an, ob ein *TFF1* Knockdown (KD) und/oder eine Caspase-Inhibition durchgeführt wurden (+) oder nicht (-). Die Apoptoserate wurde jeweils mittels DAPI Zelltodassay bestimmt. Auswertung von mindestens 3 unabhängigen in je zwei Triplikaten angesetzten Versuchen mit *One-Way-ANOVA* und *Newman-Keuls Test*, *** $p < 0,001$; nicht signifikant (ns) $p \geq 0,5$. Die Balken stellen das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Im Weiteren wurden aktivierte Caspase-3 Immunfluoreszenz Assays nach *TFF1* KD im Vergleich zu den Kontroll-Zellen angefertigt. Hierbei zeigte sich, dass sowohl bei der Zelllinie RBL-30 als auch bei der Zelllinie WERI-Rb1 der Anteil an aktivierter Caspase-3 positiven Zellen nach *TFF1* KD im Vergleich zu den Kontrollen erhöht vorlag, allerdings erreicht dieser Effekt nur bei der Zelllinie WERI-Rb1 eine statistische Signifikanz. Um der Hypothese nachzugehen, dass die Caspase-abhängige Apoptose nach *TFF1* KD in der Zelllinie RBL-30 über Caspase-7 vermittelt werden könnte, wurde hier zusätzlich einmalig eine immunzytochemische Färbung von aktivierter Caspase-7 angefertigt. Hier zeigte sich ebenfalls eine Tendenz zu einem gesteigerten Anteil an aktivierter Caspase-7 positiven Zellen nach *TFF1* KD, welche jedoch keine statistische Signifikanz erreicht (siehe Abbildung 3.10).

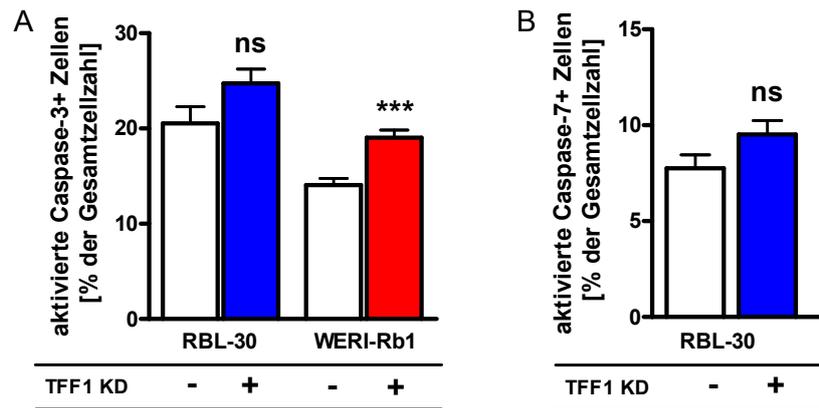


Abbildung 3.10: Einfluss von *TFF1* KD auf aktivierte Caspase-3 in den Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 sowie aktivierte Caspase-7 in der Zelllinie RBL-30

Anteil aktivierter Caspase-3 positiver Zellen in der Zelllinie RBL-30 und WERI-Rb1 an der Gesamtzellzahl (A) sowie aktivierter Caspase-7 positiver Zellen in der Zelllinie RBL-30 (B). Die Legende unterhalb der X-Achse zeigt an, ob ein *TFF1* Knockdown (KD) durchgeführt wurde (+) oder nicht (-).

(A) Auswertung von mindestens 3 unabhängigen in je zwei Triplikaten angesetzten Versuchen mit ungepaartem zweiseitigen t-Test, *** $p < 0,001$; nicht signifikant (ns) $p \geq 0,5$. Die Balken stellen das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

(B) Die Bestimmung von aktivierter Caspase-7 wurde exemplarisch einmalig in je zwei Triplikaten durchgeführt. Auswertung mit ungepaartem zweiseitigen t-Test, nicht signifikant (ns) $p \geq 0,5$. Die Balken stellen das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

3.6.2 Analyse der endogenen Apoptose in der Zelllinie RBL-30

Die endogene Apoptose nativer, unbehandelter WERI-Rb1 Zellen wurde bereits von Haubold et al. (2010) bezüglich der Abhängigkeit von Caspasen untersucht. Aus dieser Publikation ist bekannt, dass die endogene Apoptose der Zelllinie WERI-Rb1 Caspase-unabhängig ist, denn es konnte keine signifikante Reduktion der Anzahl pyknotischer Nuklei im DAPI Assay nach Behandlung mit Boc-D-Fmk gezeigt werden (Haubold et al., 2010).

Für native RBL-30 Zellen war im Datenerhebungszeitraum der vorliegenden Dissertation keine Analyse der Caspase-Abhängigkeit der Apoptose bekannt. Dies ist für die Beurteilung, ob die Vermittlung des *TFF1* KD induzierten pro-apoptotischen Effekts über eine Steigerung der endogenen Apoptose abläuft, von Relevanz. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Apoptose von nativen, unbehandelten, d.h. keiner lentiviralen Transduktion unterzogenen, RBL-30 Zellen aus der laufenden Zellkultur mithilfe der oben bereits beschriebenen Systematik auf ihre Abhängigkeit von Caspasen untersucht.

Hierbei zeigte sich im DAPI Zelltodassay eine endogene Apoptoserate nativer, unbehandelter RBL-30 Zellen von ca. 6%, welche durch den Caspase-Inhibitor Boc-D-Fmk auf ca. 4% gesenkt wurde (siehe Abbildung 3.11 A). Dieser Effekt erreicht statistische

Signifikanz, sodass von einer Caspase-Abhängigkeit der endogenen Apoptose der Zelllinie RBL-30 auszugehen ist.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Apoptose der Zelllinie RBL-30 von aktivierter Caspase-3 abhängig ist. Hierfür wurden aktivierte Caspase-3 Immunfluoreszenz Assays mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit Caspase-Inhibitor angefertigt. Hierbei ist eine statistisch signifikante Reduktion des Anteils an aktivierter Caspase-3 positiven Zellen durch Behandlung mit Caspase-Inhibitor zu erkennen (siehe Abbildung 3.11 B). Somit zeigte sich für die Zelllinie RBL-30, dass die Apoptose endogen in Abhängigkeit von aktivierter Caspase-3 abläuft.

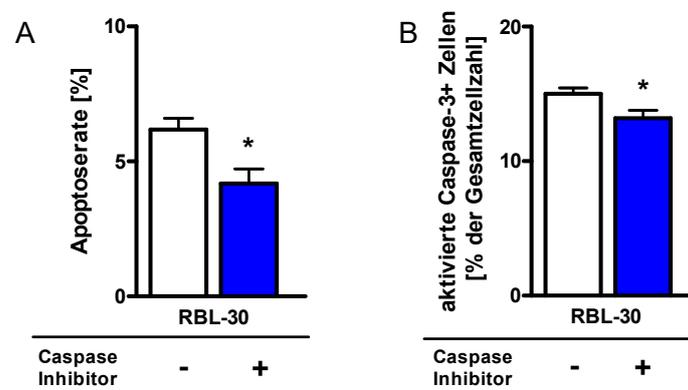


Abbildung 3.11: Untersuchung der Caspase-Abhängigkeit der endogenen Apoptose in der Zelllinie RBL-30

Endogene Apoptoserate nach Analyse mittels DAPI Zelltodassay (A) und aktivierte Caspase-3 Immunfluoreszenz Assay (B). Unterhalb der X-Achse ist jeweils gekennzeichnet, ob eine Vorbehandlung mit Caspase-Inhibitor durchgeführt wurde (+) oder nicht (-). Auswertung von mindestens 3 unabhängigen in zwei Triplikaten angesetzten Versuchen mit ungepaartem zweiseitigen t-Test, * $p < 0,05$. Die Balken stellen das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

3.7 Untersuchungen zum Einfluss des stabilen *TFF1* Knockdowns auf Zellkontakt-unabhängiges Wachstum

Um zu analysieren, ob *TFF1* einen Einfluss auf die Fähigkeit der Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 zu Zellkontakt-unabhängigem Wachstum hat, wurden Soft Agarose Assays durchgeführt. Wie bereits aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bekannt ist, sind beide Zelllinien grundsätzlich in der Lage, im Soft Agarose Assay aus Einzelzellen neue Kolonien zu bilden (Busch et al., 2015). Auch im Rahmen dieser Arbeit bildeten beide Zelllinien Kolonien aus Einzelzellen, welche sich als kugelförmige Aggregate darstellten (siehe Abbildung 3.12). Bereits nach 7 Tagen waren viele Aggregate sichtbar und nahmen über den Kultivierungszeitraum stetig an Größe zu.

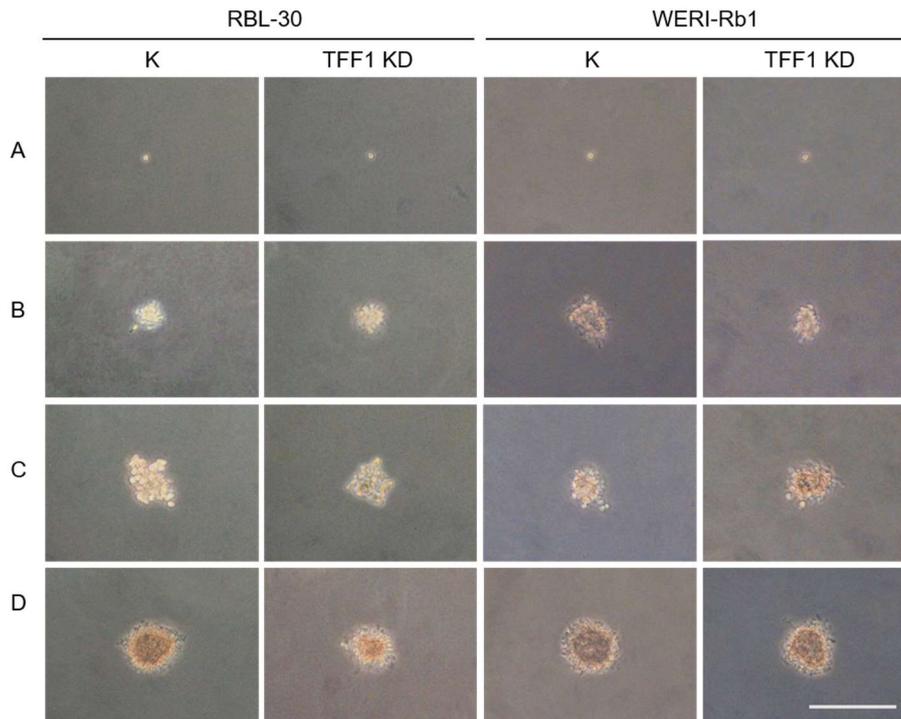


Abbildung 3.12: Fotodokumentation des Einflusses von *TFF1* KD auf Zellkontakt-unabhängiges Wachstum in den Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 mittels Soft Agarose Assay

Darstellung von repräsentativen Zellaggregaten der Zelllinien RBL-30 (links) und WERI-Rb1 (rechts) nach *TFF1* Knockdown (*TFF1* KD) bzw. in den Kontrollen (K) in Soft Agarose Assays am Tag 0 (A; Aussaat von Einzelzellen), nach 7 Tagen (B), nach 14 Tagen (C) und nach 21 Tagen (D). Eichbalken entspricht 100 μ m.

Die Koloniebildungsrate wurde an Tag 21 nach Aussaat bestimmt. Hierbei konnte bei der Zelllinie RBL-30 kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und *TFF1* KD festgestellt werden. Die Koloniebildungsrate der Zelllinie RBL-30 lag bei durchschnittlich 21% nach *TFF1* KD bzw. 24% in den Kontrollen.

In den Kontrollen der Zelllinie WERI-Rb1 lag die durchschnittliche Koloniebildungsrate mit 36% deutlich höher als in den Kontrollen der Zelllinie RBL-30. Außerdem zeigte sich für die Zelllinie WERI-Rb1 eine statistisch signifikante Reduktion der Koloniebildungsrate auf 25% nach *TFF1* KD (siehe Abbildung 3.13).

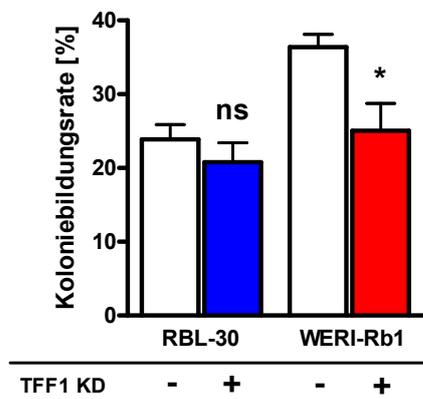


Abbildung 3.13: Einfluss von *TFF1* KD auf die Koloniebildungsrate der Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 im Soft Agarose Assay

Darstellung der Koloniebildungsrate nach *TFF1* KD (+) bzw. in den Kontrollen (-) ermittelt durch Soft Agarose Assay 21 Tage nach Aussaat von Einzelzellen. Auswertung von mindestens 3 unabhängigen in Triplikaten angesetzten Versuchen mit ungepaartem zweiseitigen t-Test, * $p < 0,05$; nicht signifikant (ns) $p \geq 0,5$. Die Balken stellen das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

3.8 CAM Assay nach *TFF1* Knockdown in Retinoblastomzelllinien

Um den Einfluss von *TFF1* auf die Tumorbildung, Invasivität und Fähigkeit zur Migration *in vivo* zu beurteilen, wurden *in ovo* Chorioallantoismembran (CAM) Assays durchgeführt.

3.8.1 Tumorbildungsrate und Invasivität nach Inokulation

Im Rahmen des Spontan-Metastasen-Modells lässt sich die Fähigkeit der RB-Zelllinien zu Tumorbildung und invasivem Wachstum *in ovo* untersuchen.

Aufgrund des bereits beschriebenen Effektes des *TFF1* KD auf das Wachstumsverhalten der Retinoblastomzellen mit einer Reduktion des Wachstums und einem pro-apoptischen Effekt nach *TFF1* KD gestaltete es sich stets schwierig, ausreichende Zellzahlen für dieses Versuchsmodell zur Verfügung zu haben. Daher konnte mit der Zelllinie RBL-30 kein adäquater Datensatz erhoben werden.

Die Zelllinie WERI-Rb1 zeigte sowohl in den Kontrollen wie auch nach *TFF1* KD eine Tumorbildung *in ovo*. Auf den mit *TFF1* KD RB-Zellen behandelten Chorioallantoismembranen (CAM) bildeten sich mit 29,4% tendenziell seltener Tumore als in den mit Kontroll-Zellen behandelten Eiern (42,6%), jedoch erreicht diese Tendenz keine statistische Signifikanz (siehe Abbildung 3.14).

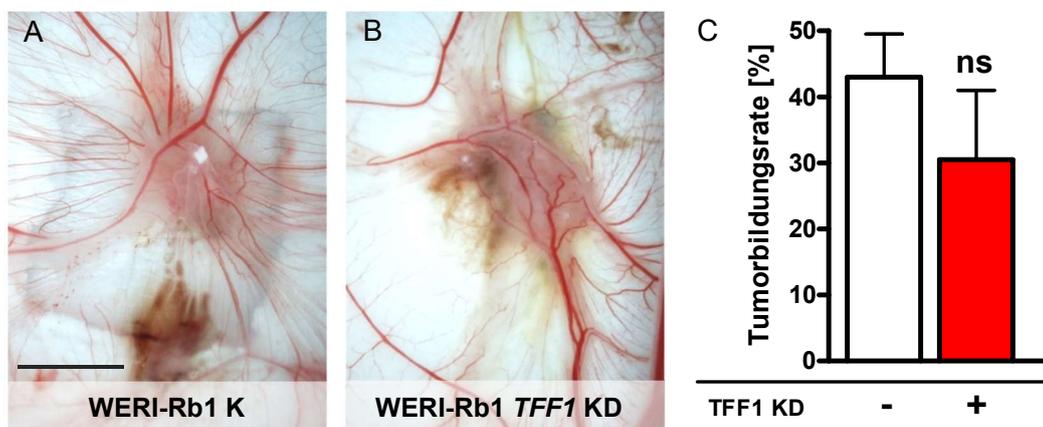


Abbildung 3.14: Einfluss von *TFF1* KD auf die Tumorbildung *in ovo* und die Tumorbildungsrate der Zelllinie WERI-Rb1 im CAM Assay

Repräsentative *in ovo* CAM Tumore nach Inokulation von Kontroll-Zellen (A) bzw. *TFF1* KD Zellen (B) der Zelllinie WERI-Rb1. Der Maßstabsbalken entspricht 0,5 cm und bezieht sich auf beide Bilder. Die Tumorbildungsrate (C) wurde durch Auswertung von insgesamt 47 CAM Assays mit Kontroll-Zellen und 34 CAM Assays mit *TFF1* KD Zellen bestimmt, diese Anzahl wurde jeweils als 100% definiert. Auswertung mit ungepaartem zweiseitigen t-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; nicht signifikant (ns) $p \geq 0,5$. Die Balken stellen das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den mittels visueller Beurteilung der oberen CAM identifizierten Tumore tatsächlich um Tumore handelte, die sich aus inokulierten humanen RB-Zellen gebildet hatten, sowie um die Ausbreitung der RB-Zellen innerhalb der Gewebeschichten der CAM zu beurteilen, wurden einzelne Tumore histologisch aufgearbeitet.

Hierbei wurden Serienschnitte der Tumore angefertigt und nach Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) oder DAPI-Färbung mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Da die verwendeten RB-Zellen durch Grün Fluoreszierendes Protein (GFP) Fluoreszenzmarkiert waren, konnten diese mittels Fluoreszenzmikroskopie als grünes Signal visualisiert werden.

Histologisch besteht die CAM aus 3 Schichten: Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Die mittlere, mesodermale Schicht ist von Blutgefäßen und Stroma geprägt (Deryugina und Quigley, 2008). Abbildung 3.15 zeigt exemplarisch einen Kryoschnitt nach CAM Assay mit Inokulation von WERI-Rb1 Kontrollzellen. Es fällt eine Verbreiterung der mesodermalen Schicht der CAM im Bereich der Applikationsstelle der RB-Zellen im Vergleich zu den Randbereichen der CAM auf (siehe Abbildung 3.15 A).

Die Applikationsstelle der inokulierten RB-Zellen hebt sich gut sichtbar ab, denn in diesem Bereich ist durch das GFP-Signal eine Anhäufung an RB-Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie visualisierbar. Im Bereich der Applikationsstelle der inokulierten RB-Zellen grenzen sich sowohl in der HE-Färbung, wie auch in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen unterschiedliche Bereiche ab. In der digitalen Überlagerung von DAPI und GFP Färbung (siehe Abbildung 3.15 B, unten) zeichnet sich eine gut sichtbare Grenzlinie ab, welche durch die Überlagerung des DAPI Signals mit dem GFP Signal in diesem Bereich entsteht. Unterhalb dieser Linie ist ebenfalls blaues Fluoreszenzsignal vorhanden, allerdings deutlich schwächer. Dies weist auf den Übergang von einem zellichten Bereich (viel DAPI Signal) in einen weniger zellichten Bereich (weniger DAPI Signal) hin. Eine Grenzlinie in der Ausprägung des GFP Signals liegt etwas unterhalb, zur besseren Sichtbarkeit markiert durch eine gestrichelte Linie. Diese Grenze ist ebenfalls relativ scharf begrenzt, sodass insgesamt nicht der Eindruck eines invasiven Wachstums im Sinne einer lokalen Tumordinfiltration entsteht. Bei Betrachtung des in Ausschnitt C vergrößerten Anteils der mesodermalen Schicht sind in der digitalen Überlagerung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen teilweise gruppiert angeordnete, vorwiegend einzeln versprengte, grüne Fluoreszenzsignale als Korrelat der GFP-markierten RB-Zellen zu erkennen. Auch im restlichen Mesoderm des Präparats ließen sich fluoreszenzmikroskopisch disseminiert vereinzelte GFP-positive Signale detektieren.

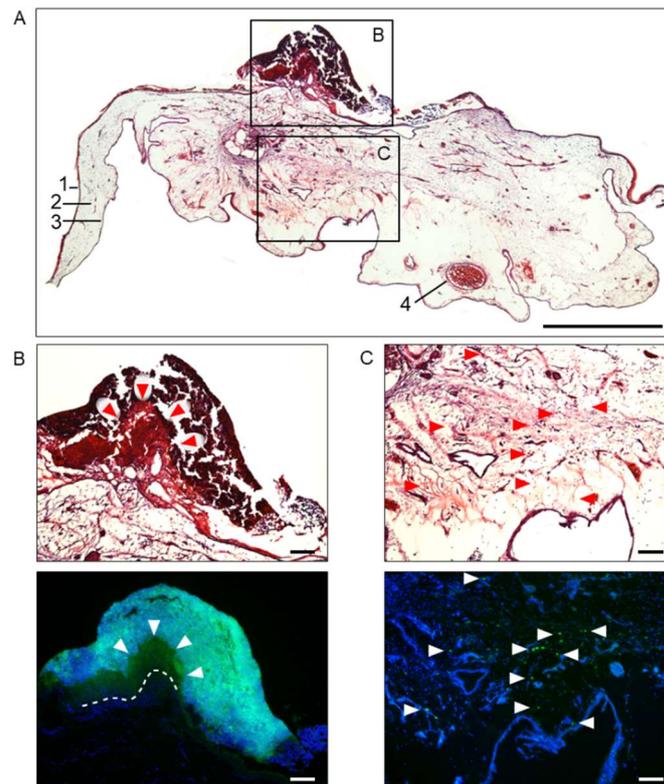


Abbildung 3.15: HE- und DAPI-Färbung von Kryoschnitten von CAM Kontroll-Tumoren der Zelllinie WERI-Rb1

(A) Übersicht des aufgearbeiteten CAM-Gewebes nach HE-Färbung in 4-facher Objektivvergrößerung, Ektoderm (1), Mesoderm (2), und Endoderm (3), Blutgefäß in der mesodermalen Schicht (4). Die Kästen markieren die in im unteren Teil der Abbildung als B und C vergrößert dargestellten Ausschnitte. Eichbalken entspricht 1 mm. (B) Die Applikationsstelle der RB-Zellen in 10-facher Objektivvergrößerung und (C) ein Ausschnitt der mesodermalen Schicht der CAM in 10-facher Objektivvergrößerung, jeweils in HE-Färbung (oben) und DAPI-Färbung (unten), bei letzterer erfolgte eine digitale Überlagerung von DAPI (blau) und GFP (grün). Die Eichbalken entsprechen 100 µm. In (B) markieren die Pfeilspitzen die Grenze zwischen einem Bereich mit ausgeprägtem DAPI-Signal zu einem Bereich mit deutlich weniger DAPI-Signal. Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Grenze zwischen GFP-positivem und GFP-negativem Gewebe. In (C) markieren die Pfeilspitzen exemplarisch die überwiegend vereinzelt liegenden grünen Fluoreszenzsignale als Korrelat der GFP-markierten RB-Zellen.

Abbildung 3.16 zeigt exemplarisch einen Kryoschnitt nach CAM Assay mit Inokulation von WERI-Rb1 *TFF1* KD Zellen. In der Übersicht wird auch hier eine Verdickung der mesodermalen Schicht deutlich. Ausschnitt B der Abbildung 3.16 zeigt die Applikationsstelle der RB-Zellen, hier sind wie auch in der oben gezeigten Kontrolle GFP Signale im Bereich der Applikationsstelle zu detektieren. Diese stellen sich hier im Vergleich zu Abbildung 3.15 B weniger ausgeprägt und mit einer diffuseren Abgrenzung zum übrigen Gewebe dar. Das GFP-Signal zieht an die mesodermale Schicht der CAM heran, aufgrund der hier scharfen Abgrenzung ist jedoch nicht von einem lokal invasiven Wachstum der RB-Zellen auszugehen. In Ausschnitt C sind auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in der mesodermalen Schicht sowohl gruppiert angeordnete als auch vereinzelt liegende GFP-Signale im Sinne von RB-Zellen deutlich zu erkennen. Hier sind die RB-Zellen in der

entsprechenden HE-Färbung als basophile Anhäufung von Zellkernen gut erkennbar. Auch in diesem Präparat zeigte sich im gesamten Mesoderm ein disseminiertes Vorkommen von GFP-Signalen in der Fluoreszenzmikroskopie.

Zusammengefasst zeigte die Aufarbeitung der Tumore aus dem CAM Assay, dass es bei den exemplarisch untersuchten Inokulationen von RB-Zellen der Zelllinie WERI-Rb1 auf die obere CAM sowohl bei den Kontrollen als auch nach *TFF1* KD zu einem Eindringen und einer disseminierten Ausbreitung der RB-Zellen in die mesodermale Schicht der CAM kam, während im Bereich der Applikationsstelle kein lokal invasives Wachstum stattfand. Die makroskopische Tumorbildung auf der oberen CAM basierte hier maßgeblich auf einer Verdickung der mesodermalen Schicht der CAM, weniger auf einem lokalen Wachstum von RB-Zellen.

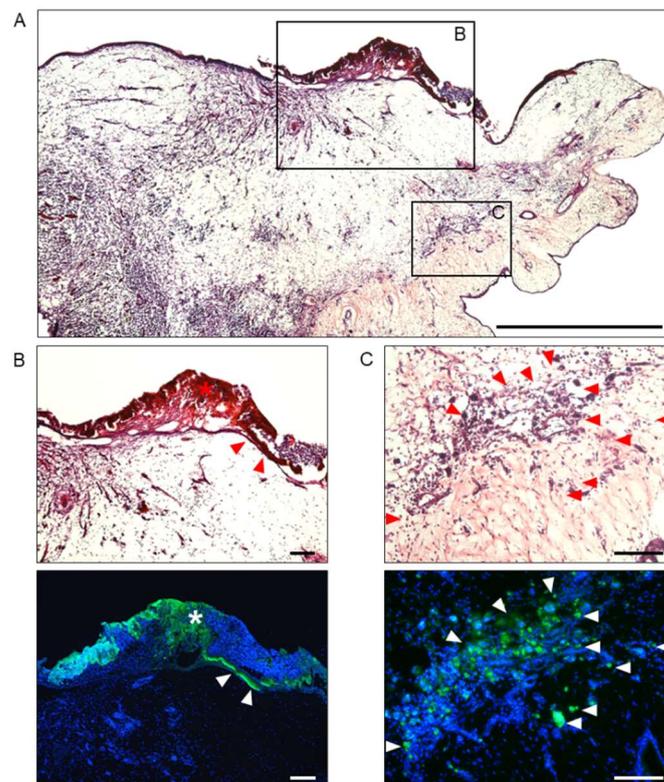


Abbildung 3.16: HE- und DAPI-Färbung von Kryoschnitten von CAM Tumoren nach Inokulation von WERI-Rb1 *TFF1* Knockdown Zellen

(A) Übersicht HE-Färbung in 4-facher Objektivvergrößerung, die Kästen markieren die in im unteren Teil der Abbildung als B und C vergrößert dargestellten Ausschnitte. Eichbalken entspricht 1 mm. (B) Applikationsstelle der RB-Zellen in 10-facher Objektivvergrößerung und (C) mesodermale Schicht der CAM in 20-facher Objektivvergrößerung, jeweils in HE-Färbung (oben) sowie DAPI-Färbung (unten). Bei letzterer erfolgte eine digitale Überlagerung von DAPI (blau) und GFP (grün). Die Eichbalken entsprechen 100 µm.

In (B) markiert das Sternchen den im Vergleich zu Abbildung 3.15 B eher locker von GFP-positiven Zellen durchsetzten Bereich der Applikationsstelle. Die Pfeilspitzen markieren einen Streifen GFP-Signal, der bis an das Mesoderm heranzieht. In (C) markieren die Pfeilspitzen exemplarisch die grünen Fluoreszenzsignale als Korrelat der GFP-markierten RB-Zellen, welche teilweise vereinzelt und teilweise in gruppiertes Anordnung vorliegen.

3.8.2 Zellmigration nach Injektion

Im Rahmen des Experimentelle-Metastasen-Modells wurde *in ovo* die Fähigkeit der Zellen untersucht, nach Injektion in ein CAM-Hauptgefäß in das umliegende extravasale Gewebe zu migrieren.

Da die verwendeten Zellen GFP-markiert waren, konnten diese in den gewonnenen CAM-Stanzen mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden. Für die Zelllinie RBL-30 ließ sich weder in den Kontrollen noch nach *TFF1* KD eine Migration in das extravasale Gewebe über GFP-positive Gewebestanden nachweisen, sodass die CAM-Stanzen hier nicht weiter mittels *Realtime* RT-PCR analysiert wurden. Im Gegensatz dazu migrierten die WERI-Rb1 Zellen sowohl in den Kontrollen wie auch nach *TFF1* KD in das extravasale Gewebe, was durch die Fluoreszenzmikroskopie eindeutig gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 3.17). Die CAM-Stanzen aus den CAM Assays mit der Zelllinie WERI-Rb1 wurden zusätzlich bzgl. der Expression von humanem GAPDH (*hGAPDH*) mittels *Realtime* RT-PCR quantifiziert, um Rückschlüsse auf den Gehalt an humanen RB-Zellen zu ziehen.

In den CAM Assays nach *TFF1* KD waren prozentual weniger CAM-Stanzen positiv auf *hGAPDH* als in den CAM Assays mit Kontroll-Zellen. Wie in Abbildung 3.18 A zu erkennen ist, war der Nachweis von *hGAPDH* in 100% der gepoolten CAM-Stanzen aus den Kontrollen positiv, allerdings nur in durchschnittlich ca. 67% der gepoolten CAM-Stanzen nach *TFF1* KD. Diese Tendenz erreicht keine statistische Signifikanz, deutet aber auf eine Reduktion der Migrationsfähigkeit nach *TFF1* KD hin.

Die detailliertere Auswertung mittels Quantifizierung von humanem *GAPDH* zeigte bei den Kontrollen mit durchschnittlich 250 pg pro CAM-Stanze ca. doppelt so viel Gehalt an RB-Zellen wie der durchschnittliche Gehalt der CAM-Stanzen aus mit *TFF1* KD Zellen behandelten CAMs mit 125 pg (siehe Abbildung 3.18 B). Die Reduktion der Migrationsfähigkeit im Sinne einer reduzierten Menge an humanem *GAPDH* in den CAM-Stanzen nach *TFF1* KD erreicht hier statistische Signifikanz.

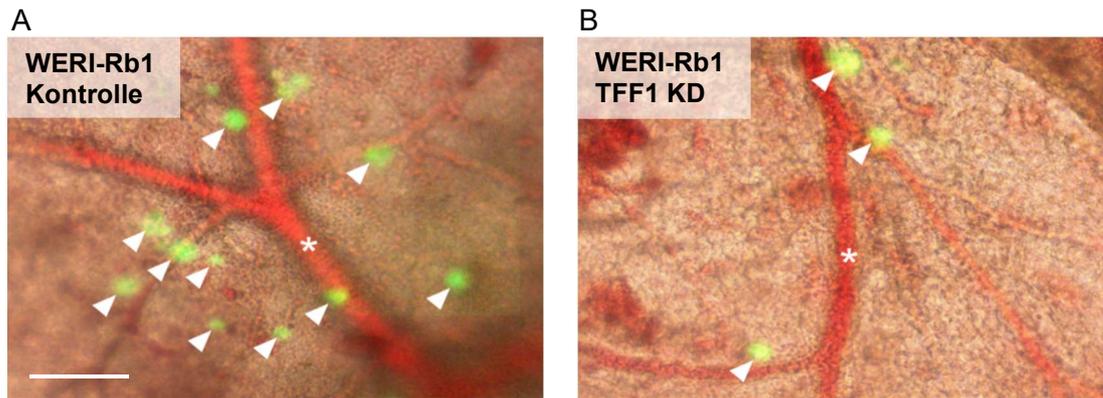


Abbildung 3.17: Untersuchung des Einflusses von *TFF1* KD auf die Zellmigration von WERI-Rb1 Zellen im CAM Assay

Repräsentative Darstellung von RB-Zellen in der unteren CAM mittels digitaler Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie von CAM-Stanzen an Entwicklungstag 18 des CAM Assays. Die Blutgefäße sind exemplarisch mit einem Sternchen markiert, die Pfeilspitzen markieren das Fluoreszenzsignal der GFP-markierten RB-Zellen. Sowohl nach Durchführung des CAM Assays mit Kontroll-Zellen (A), wie auch nach *TFF1* KD (B) sind GFP-markierte Zellen paravasal im CAM Gewebe zu erkennen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m und bezieht sich auf beide Bilder.

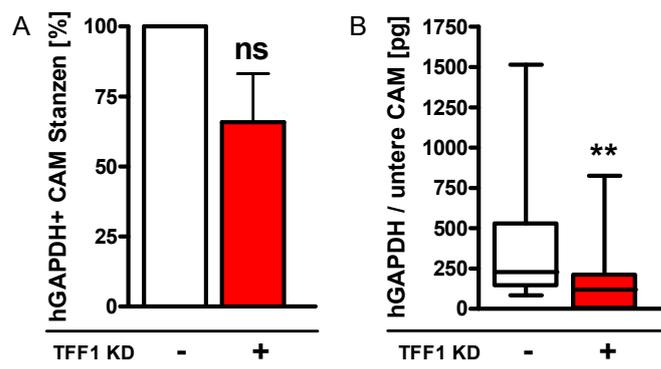


Abbildung 3.18: Analyse des Gehalts an humanen RB-Zellen in CAM-Stanzen der Zelllinie WERI-Rb1 mittels *Realtime* RT-PCR gegen humanes *GAPDH* (*hGAPDH*)

(A) Darstellung des prozentualen Anteils *hGAPDH*-positiver CAM-Stanzen an Tag 18 des CAM Assays in Kontrollen (-) bzw. nach *TFF1* KD (+). Auswertung mit gepaartem zweiseitigen t-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; statistisch nicht signifikant (ns) $p \geq 0,5$. Die Balken stellen das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

(B) Darstellung der absoluten Quantifizierung von *hGAPDH* in CAM-Stanzen. In die Auswertung wurden 22 Kontrollen und 22 Assays nach *TFF1* KD einbezogen. Auswertung mit Mann-Whitney-Test, ** $p < 0,01$.

4 DISKUSSION

Mit der Etablierung der Enukleation als Therapieverfahren für das Retinoblastom stand zunächst das Überleben der Patienten im Vordergrund. Mit Einführung der Brachytherapie und der externen Strahlentherapie (*external beam radiation therapy*, EBRT) kam zu den Therapiezielen neben dem Erhalt des Lebens auch der Erhalt des betroffenen Auges hinzu, gefolgt von dem Ziel, den Visus zu erhalten (Fabian et al., 2018; Munier et al., 2019). Diese Priorisierung hat bis heute Relevanz und mit der Einführung der Chemotherapie wurde eine weitere Wende bezüglich der Therapieverfahren eingeleitet (Fabian et al., 2018). Die Behandlung des Retinoblastoms mit Chemotherapeutika ist jedoch durch unerwünschte Nebenwirkungen und die Entstehung von Chemotherapeutika-Resistenzen limitiert. Daher ist die Entwicklung neuer Therapiestrategien eine wichtige Aufgabe, um die Therapie des Retinoblastoms weiter zu verbessern (Busch et al., 2019).

Die Forschungsarbeit unserer Arbeitsgruppe untersucht TFF Peptide mit Hinblick auf ihr mögliches Potential als ergänzende Therapieoption für das Retinoblastom (Busch et al., 2019). Wir arbeiten daran, die Rolle von TFF Peptiden in Retinoblastomzellen (RB-Zellen) aufzuklären, um langfristig neue Therapieansätze zu etablieren. *Trefoil Factor Family* (TFF) Peptide werden als vielversprechende Kandidaten für diverse medizinische Anwendungsmöglichkeiten angesehen, insbesondere auch für die Therapie von Karzinomen und die supportive Therapie bei Chemotherapien (Hoffmann, 2020). Basierend auf ihren physiologischen Effekten und der Beteiligung an pathophysiologischen Prozessen wird TFF Peptiden auch therapeutisches Potential bezüglich Erkrankungen des Auges wie z.B. Epitheldefekten der Kornea oder der Keratokonjunktivitis sicca zugesprochen (Braga Emidio et al., 2020). Paulsen et al. (2008) konnten an Mäusen *in vivo* zeigen, dass die topische Anwendung von rekombinantem TFF3 die korneale Wundheilung von induzierten Läsionen verbessert. Neben der topischen Anwendung ist auch die systemische Gabe von TFF Peptiden denkbar. Bei Untersuchungen zur i.v. Gabe von TFF Peptiden in Mausmodellen wurde gezeigt, dass die Peptide überwiegend in den Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden, allerdings innerhalb von 2-3 Stunden nicht mehr im Blutkreislauf nachweisbar sind (Braga Emidio et al., 2020). Bisher ist kein TFF-Rezeptor eindeutig identifiziert worden, aber TFF Peptide werden sekretiert und sind daher potentiell für die Hemmung z.B. durch Immunglobuline zugänglich (Perry et al., 2008).

Eine sichere Einordnung der Rolle von *TFF1* im Retinoblastom im Spektrum zwischen tumorsuppressiven und onkogenen Eigenschaften steht bisher aus. Um die Beeinflussung von *TFF1* als Therapieoption des Retinoblastoms zu evaluieren ist es jedoch notwendig, die komplexe Rolle dieses Peptids im Retinoblastom grundlegend zu verstehen.

TFF1 spielt in diversen Organsystemen des Menschen eine Rolle und ist vor allem in Bezug auf den Gastrointestinaltrakt und das Mammakarzinom gut untersucht.

In Bezug auf das Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass die forcierte Expression von *TFF1* die onkogenen Eigenschaften der Mammakarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* steigern kann, während umgekehrt die funktionelle Inhibition von *TFF1* zu einer Hemmung der Onkogenität führte (Amiry et al., 2009). Die Beobachtung, dass *TFF1* außerdem die Migrationsfähigkeit von Mammakarzinom-Zelllinien steigern kann (Buache et al., 2011; Prest et al., 2002), lässt ein höheres Potential für Tumordissemination vermuten (Prest et al., 2002). In Einklang damit konnte *TFF1* als möglicher Marker für disseminierte Krebszellen, Mikrometastasen und Knochenmetastasen des Mammakarzinoms identifiziert werden (Perry et al., 2008), allerdings konnte in klinischen Studien dennoch keine Assoziation zwischen der Expression von *TFF1* und einer schlechten Prognose festgestellt werden (Prest et al., 2002). Die funktionelle Inhibition von *TFF1* wird als möglicher neuer Therapieansatz für das Mammakarzinoms diskutiert (Amiry et al., 2009).

Im Gegensatz dazu stehen Veröffentlichungen, die auf einen positiven Effekt einer *TFF1* Expression in Bezug auf das Mammakarzinom hinweisen (Buache et al., 2011) und somit auf eine Funktion von *TFF1* als Tumorsuppressor hindeuten. Unter anderem die *TFF1* Überexpression und Knockdown Experimente von Buache et al. (2011) zeigen für *TFF1* in Mammakarzinom-Zelllinien *in vitro* und *in vivo* anti-tumorale Effekte. *TFF1* zeigte sich hier durch Steigerung der Migration und Invasion *in vitro* nach *TFF1* Überexpression als motogener Faktor, dennoch verursachte der Knockdown von *TFF1* eine Steigerung der Tumorigenität (Buache et al., 2011). Weitere Studien belegen die Hemmung des Wachstums, der Proliferation, Migration und Koloniebildungsrate in Mammakarzinom-Zellen durch *TFF1* *in vitro* (Yi et al., 2020).

In gastrointestinalen Zelllinien hemmt sowohl die Behandlung mit rekombinantem *TFF1* wie auch eine mittels Transfektion induzierte *TFF1* Expression die Proliferation über eine Inhibition des Zellzyklusprogress (Bossenmeyer-Pourié et al., 2002). Der anti-proliferative Effekt von *TFF1* wurde in weiteren Studien bestätigt. So führt z.B. der Verlust der *TFF1* Expression in *TFF1-Knockout* Mäusen zu einer gesteigerten Proliferation von Magenepithelzellen (Soutto et al., 2015). Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass der pro-proliferative Effekt eines *TFF1*-Verlusts durch die Exposition gegenüber *TFF1* wieder aufgehoben werden kann. Dies untermauert eine tumorsuppressive Funktion von *TFF1* bzgl. des Magenkarzinoms über eine Hemmung der Proliferation (Soutto et al., 2015). Auch Untersuchungen zu somatischen Mutationen von *TFF1* verdeutlichen die funktionelle Relevanz dieses Peptids für das Magenkarzinom: Durch Behandlung von Magenkarzinom-Zelllinien mit mutierten *TFF1* Versionen gehen die Tumor-suppressiven Eigenschaften verloren und das Invasivitätspotential kann gesteigert werden. Während die Behandlung

mit Wildtyp-TFF1 *in vitro* eine signifikante Hemmung des Wachstums von Magenkrebszellen verursacht, konnte dieser Effekt durch die Behandlung mit zwei verschiedenen mutierten TFF1 Versionen nicht erzielt werden. Zudem steigerte sich das *in vitro* analysierte Invasionspotential durch die Behandlung der Magenkrebszellen mit Wildtyp-TFF1 und die Behandlung mit den verwendeten mutierten TFF1 Varianten führte zu einer noch ausgeprägteren Steigerung des Invasionspotentials (Yio et al., 2006).

In humanen Kolonkarzinomzellen verursacht die Überexpression von *TFF1* eine gesteigerte Resistenz gegenüber induzierter Apoptose. Dies deutet darauf hin, dass TFF1 das Überleben von Krebszellen hier fördert. Darüber hinaus fördert die induzierte Expression von *TFF1* in humanen Kolonkarzinomzellen die onkogene Transformation, indem z.B. die Fähigkeit zu Zellkontakt-unabhängigem Wachstum gesteigert wird. Es wird vermutet, dass *TFF1* in Bezug auf das Kolonkarzinom zur Induktion von Adenomen und Adenokarzinomen beiträgt, hier also onkogene Eigenschaften ausübt (Rodrigues et al., 2006).

In der Literatur zeigen sich somit sowohl Hinweise auf eine Rolle von *TFF1* als Tumorsuppressor sowie als Onkogen. Bisherige Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe deuten überwiegend auf eine mögliche Funktion von *TFF1* als Tumorsuppressor in RB-Zellen hin.

Durch die Überexpression von *TFF1* in RB-Zelllinien und nachfolgende Analysen des Zellverhaltens konnte erstmals eine Funktion von *TFF1* im Sinne eines Tumorsuppressors in RB-Zellen gezeigt werden, denn die Überexpression von *TFF1* verursacht hier *in vitro* einen pro-apoptischen und anti-proliferativen Effekt, sowie eine Reduktion des Tumorwachstums *in ovo* im CAM Assay (Busch et al., 2017).

In einer retrospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression von TFF1 in Gewebeproben aus RB-Tumoren mit klinischen Parametern der Patienten korreliert: Hohe TFF1 Expressionslevel korrelierten mit höheren TNM Stadien und undifferenzierteren Tumorzellen (Busch et al., 2018b). Dies gibt Ausblick darauf, dass *TFF1* nicht nur als potentieller Ansatzpunkt für zukünftige Therapieoptionen von Interesse ist, sondern möglicherweise auch für die Etablierung als Prognosefaktor Potential hat. Die Beobachtung, dass TFF1 in weniger differenzierten RB-Tumoren stärker exprimiert wird, könnte einerseits für eine Rolle von *TFF1* im Sinne eines Onkogens in Bezug auf das Retinoblastom sprechen (Busch et al., 2018b), andererseits wäre vor dem Hintergrund der anti-tumorigenen Effekte der *TFF1* Überexpression (Busch et al., 2017) auch eine TFF1-Induktion in höheren Tumorstadien als eine Art Schutzfunktion denkbar.

Die möglicherweise hohe Relevanz von TFF1 in der Pathogenese des Retinoblastoms wird auch durch die Arbeiten von Liu et al. (2021) untermauert. Bei den hier definierten Subtypen

des Retinoblastoms zeichnet sich Subtyp 1 durch wenige zusätzliche genetische Veränderungen neben dem ursächlichen *RB1*-Verlust aus. Retinoblastome des beschriebenen Subtyps 2 dagegen weisen zusätzlich zur *RB1* Mutation weitere genetische Veränderungen auf und zeigen ein aggressiveres Verhalten als Tumoren des Subtyps 1. Neben *MYCN* Amplifikationen sind hierbei auch Veränderungen der *TFF1* Expression relevant: *TFF1* ist in Tumoren des Subtyps 2 im Vergleich zu Tumoren des Subtyps 1 hochreguliert, denn in fast allen untersuchten Tumoren des Subtyps 2 konnte eine *TFF1* Expression festgestellt werden. Dagegen konnte in Tumoren des Subtyps 1 nur wenig oder keine *TFF1* Expression nachgewiesen werden (Liu et al., 2021) und auch in der gesunden humanen Retina wird *TFF1* kaum exprimiert (Weise und Dünker, 2013). Zudem konnten Liu et al. (2021) die Expression von *TFF1* in Retinoblastomen nachweisen, die einen metastasierenden Verlauf gezeigt hatten, während dies für die untersuchten Tumore ohne metastasierenden Verlauf nicht zutraf (Liu et al., 2021).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen eines *TFF1* Knockdowns (*TFF1* KD) in Bezug auf das Proliferations-, Apoptose-, Migrations- und Invasivitätsverhalten der RB-Zellen analysiert.

4.1 Evaluation des lentiviralen *TFF1* Knockdowns in Retinoblastomzelllinien

Die Etablierung des *TFF1* KD mittels lentiviraler Transduktion war in zwei der verwendeten Zelllinien erfolgreich. Mit den Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 konnten sowohl in der Etablierung, wie auch in den folgenden Versuchsansätzen, adäquate Knockdown-Effizienzen erreicht werden, allerdings gelang dies für die Zelllinie RBL-13 nicht.

Als Durchschnitt aller in die Auswertung einbezogenen Versuchsansätze wurde in den beiden Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 eine *TFF1* KD-Effizienz von 92% erreicht.

Ursachen für die Problematik bei der Etablierung eines *TFF1* KD in der Zelllinie RBL-13 könnten in der Morphologie und den Wachstumscharakteristika dieser Zelllinie liegen. Die Zelllinie RBL-13 wächst zwar wie für RB-Zelllinien üblich als Suspensionszellen, bildet aber über die für RB-Zellen typische Aggregatbildung hinaus dreidimensionale Zellaggregate (Busch et al., 2015). Bereits bei anderen Zellkulturarbeiten haben sich Probleme mit der Zelllinie RBL-13 ergeben: So war z.B. im Rahmen einer Charakterisierung von RB-Zelllinien die Erstellung einer Wachstumskurve bei Aussaat von Zellaggregaten in 24 Well Platten für die Zelllinie RBL-13 aufgrund der starken Aggregatbildung nicht möglich, da es dadurch zu starken Ungenauigkeiten bei der Zellzahlbestimmung kam (Busch et al., 2015). Auch bei den Zellkulturarbeiten zur vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass die Zelllinie RBL-13

ausgeprägt zur Bildung von Aggregaten neigt, die nur schwierig durch starkes Resuspendieren vereinzelt werden können.

Somit wurde die Zelllinie RBL-13 nicht weiterverwendet, da stark variierende und unzureichende KD-Effizienzen bezüglich Versuchsplanung und Interpretation der Ergebnisse ein Problem darstellen. Es liegt nahe zu vermuten, dass die lentiviralen Partikel aufgrund der starken Aggregatbildung der Zelllinie RBL-13 bei der lentiviralen Transduktion keinen ausreichenden Anteil der Zellen erreichen konnten, um gute *TFF1* KD Ergebnisse zu erzielen.

4.2 Einfluss des *TFF1* Knockdowns auf das Proliferations- und Apoptose-Verhalten von Retinoblastomzellen

Das Proliferations- und Apoptose-Verhalten von Zellen bestimmt in der Konsequenz das Wachstumsverhalten einer Zellpopulation. Das Wachstumsverhalten der RB-Zelllinien wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Erstellung von Wachstumskurven untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der *TFF1* KD eine signifikante Reduktion des Wachstums im Vergleich zu den Kontrollen verursacht.

In der Zelllinie WERI-Rb1 zeichnete sich jedoch eine Beeinflussung der Kontrollen allein durch die Transduktion im Sinne eines langsameren Wachstums ab. Unsere Arbeitsgruppe hat für die native, unbehandelte Zelllinie WERI-Rb1 eine durchschnittliche Verdopplungszeit von 62 h bestimmt (Busch et al., 2015). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erreichte das Wachstum bei den Kontrollzellen der Zelllinie WERI-Rb1 nach 72 bis 96 h jedoch nur durchschnittlich das ca. 1,8-fache der Ausgangszellzahl. Daher wurde für die Zelllinie WERI-Rb1 der Untersuchungszeitraum der Wachstumskurve auf 216 h verlängert.

Für die native, unbehandelte Zelllinie RBL-30 liegt die Verdopplungszeit im Durchschnitt bei 140 h und sie ist damit eine RB-Zelllinie, die sehr langsam wächst (Busch et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit erreichte die Zelllinie RBL-30 zum Zeitpunkt 96 h nach Aussaat durchschnittlich das 1,6-fache der Ausgangszellzahl. Somit ist eine Verdopplung noch nicht ganz erreicht, was aber mit den oben genannten Daten vereinbar ist (Busch et al., 2015). Daher wurden die Wachstumskurven hier, wie ursprünglich geplant, bis 96 h nach Aussaat erstellt und der Beobachtungszeitraum nicht wie für die Zelllinie WERI-Rb1 auf 216 h verlängert.

Nach *TFF1* KD lag in den beiden Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 zu allen untersuchten Zeitpunkten eine signifikant niedrigere Zellzahl vor als in den Kontrollen. Mittlerweile publizierte Daten zeigen allerdings, dass die Überexpression von *TFF1* in den RB-Zelllinien

Y-79 und RB355 ebenfalls eine signifikante Reduktion des Wachstums verursacht (Busch et al., 2017).

Die signifikante Reduktion des Wachstums nach *TFF1* KD steht im Widerspruch zu der Hypothese, dass der Verlust von *TFF1* das Wachstum der Zellen enthemmen würde, wie es bei Verlust eines Tumorsuppressors zu erwarten gewesen wäre. Zudem steht diese Beobachtung im Widerspruch dazu, dass bei Untersuchungen bezüglich der endogenen *TFF1* Expression von RB-Zelllinien eine negative Korrelation zwischen der *TFF1* Expression und Wachstumskinetik festgestellt wurde: Die Zelllinien mit der höchsten *TFF1* Expression (RBL-30, RBL-13, RBL 383) zeigen ein sehr langsames Wachstum, während die Zelllinien mit der geringsten *TFF1* Expression (Y-79 und RB 247C3) die schnellste Wachstumskinetik aufweisen (Weise und Dünker, 2013). Diese Korrelation scheint sich jedoch auf die endogene Expression von *TFF1* zu beziehen und ist offenbar nicht auf den *TFF1* KD übertragbar.

Die Hemmung des Wachstums einer Zellpopulation kann auf einer verminderten Proliferationsrate, einer erhöhten Apoptoserate oder einer Kombination dieser Faktoren basieren.

Bezüglich der Proliferationsrate konnte in beiden untersuchten RB-Zelllinien mittels BrdU Zellproliferationsassay keine signifikante Veränderung nach *TFF1* KD festgestellt werden. Daher ist davon auszugehen, dass der *TFF1* Knockdown keinen maßgeblichen Einfluss auf die Proliferation in RB-Zelllinien hat und dieser Aspekt des Zellverhaltens somit nicht die entscheidende Grundlage der Veränderung der Wachstumskinetik nach *TFF1* KD bildet. Dies steht in Einklang mit Daten eines siRNA-vermittelten transienten *TFF1* KD in WERI-Rb1 Zellen: Auch hier ist die Proliferationsrate nach *TFF1* KD unverändert, allerdings bestand bei dieser Methodik eine *TFF1* Restexpression von 30%, was das Gewicht der Daten einschränkt (Weise und Dünker, 2013). Eine Überexpression von *TFF1* in den RB-Zelllinien Y-79 und RB355 verursacht hingegen eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate im BrdU-Zellproliferationsassay (Busch et al., 2017).

Im Vergleich dazu führt in Mammakarzinom-Zelllinien weder die Überexpression noch der Knockdown von *TFF1* zu einer Veränderung der Proliferation *in vitro* (Buache et al., 2011) und auch in pankreatischen Krebszelllinien wird die Proliferation nicht durch *TFF1* beeinflusst (Arumugam et al., 2011). In Bezug auf das Magenkarzinom zeichnet sich dagegen eine anti-proliferative Rolle von *TFF1* ab. So steigert der Verlust der *TFF1* Expression beispielsweise die Zellproliferation der murinen Magenschleimhaut *in vivo*. Außerdem wurde hier *in vitro* festgestellt, dass die Steigerung der Proliferation nach *TFF1*-Verlust durch Wiederherstellung der *TFF1*-Expression aufgehoben wird (Soutto et al., 2015). Zudem zeigten schon Calnan et al. (1999), dass die Behandlung einer humanen

Magenkarzinomzelllinie mit rekombinantem TFF1 *in vitro* eine Dosis-abhängige Reduktion der Proliferation verursacht. Bossenmeyer-Pourié et al. (2002) konnten ebenfalls eine Hemmung der Proliferation in gastrointestinalen Zelllinien nach Behandlung mit rekombinantem TFF1 wie auch nach mittels Transfektion induzierter *TFF1* Expression über eine Hemmung des Zellzyklusprogress nachweisen. Auch die Überexpression von *TFF3* in RB-Zelllinien führt zu einer signifikanten Verminderung der Proliferationsrate (Grosse-Kreul et al., 2016). Diese Daten deuten insgesamt auf tumorsuppressive Eigenschaften von TFF Peptiden durch eine Hemmung der Proliferation hin und stehen damit in Einklang mit den oben genannten Daten zur *TFF1* Überexpression in RB-Zelllinien von Busch et al. (2017). Insgesamt zeichnet sich somit für RB-Zelllinien ab, dass TFF Peptide hier einen anti-proliferativen Effekt ausüben, was die Hypothese einer tumorsuppressiven Rolle von TFF1 im Retinoblastom unterstützt. Auch wenn sich in Bezug auf die Proliferation kein gegenteiliger Effekt nach *TFF1* KD im Vergleich zur Überexpression feststellen ließ, fügt sich die ausbleibende Veränderung der Proliferationsrate nach *TFF1* KD bezüglich der Einordnung von *TFF1* im Sinne eines Tumorsuppressors ein.

Die Apoptoserate ist ein weiterer Faktor, der die Wachstumskinetik einer Zelllinie maßgeblich beeinflusst.

Die Untersuchung des Einflusses des *TFF1* KD auf die Apoptoserate der Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 mittels DAPI Zelltodassay ergab für beide RB-Zelllinien einen statistisch hoch signifikanten pro-apoptotischen Effekt. Dieser spiegelt sich in den Wachstumskurven wider und scheint der treibende Faktor für die Wachstumsstagnation der Zellen nach *TFF1* KD zu sein, da wie bereits beschrieben kein signifikanter Einfluss von *TFF1* KD auf die Proliferation der Zellen nachweisbar war.

Die Beobachtung, dass der Verlust von TFF1 zu einer Steigerung der Apoptose führt, steht in Einklang mit Daten, die eine Schutzfunktion der TFF Peptide für Epithelien durch die Inhibition von Apoptose zeigen. So konnte z.B. in gastrointestinalen Zelllinien gezeigt werden, dass TFF1 einen anti-apoptotischen Effekt ausübt, indem die Induktion der Apoptose gehemmt wird (Bossenmeyer-Pourié et al., 2002). Auch die Überexpression von *TFF1* in humanen Kolonkarzinomzellen verursacht eine gesteigerte Resistenz gegenüber induzierter Apoptose (Rodrigues et al., 2006) und unterstützt damit die Annahme anderer Forschungsarbeiten (Vgl. z.B. Bossenmeyer-Pourié et al. (2002)), dass TFF1 in zelluläre Schutzmechanismen gegenüber Apoptose involviert ist.

Die Überexpression von *TFF1* in Y-79 und RB355 RB-Zellen verursacht jedoch ebenfalls einen signifikanten pro-apoptotischen Effekt (Busch et al., 2017). Somit ist hier zunächst kein Unterschied zwischen der Überexpression und dem Knockdown von *TFF1* in RB-

Zelllinien festzustellen, denn beide Veränderungen der *TFF1* Expression verursachen eine signifikante Induktion von Apoptose.

In gastrointestinalen Zelllinien vermittelt *TFF1* seinen in diesem Fall anti-apoptischen Effekt über eine Hemmung der Aktivität von Caspasen (Bossenmeyer-Pourié et al., 2002). Für den *TFF1*-induzierten pro-apoptischen Effekt nach *TFF1*-Überexpression in RB-Zelllinien zeigen Versuchen mit Caspase-Inhibition, dass dieser ebenfalls in Abhängigkeit von Caspasen vermittelt wird. Im Speziellen konnte hier die Beteiligung von aktivierter Caspase-3 nachgewiesen werden (Busch et al., 2017).

Um zu überprüfen, ob der gleichermaßen nach Überexpression wie auch Knockdown von *TFF1* auftretende pro-apoptische Effekt auch gleichermaßen vermittelt wird, wurde die Beteiligung von Caspasen an der Apoptose-Induktion nach *TFF1* KD untersucht. Dabei zeigte sich der *TFF1* KD induzierte pro-apoptische Effekt in den beiden Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 stark Caspase-abhängig, denn es konnte eine signifikante Reduktion der Apoptoserate nach Caspase-Inhibition festgestellt werden. Bei Untersuchung des Anteils an Zellen mit aktivierter Caspase-3 zeigte sich für die Zelllinie WERI-Rb1 eine eindeutige Erhöhung nach *TFF1* KD, sodass der pro-apoptische Effekt hier maßgeblich über aktivierte Caspase-3 vermittelt zu sein scheint. Für die Zelllinie RBL-30 zeigte sich auch eine Steigerung von aktivierter Caspase-3 nach *TFF1* KD, allerdings erreichte diese keine statistische Signifikanz. Dies deutet darauf hin, dass hier neben aktivierter Caspase-3 weitere Faktoren zusätzlich eine Rolle spielen könnten.

Eine Studie von Sitorus et al. (2009) hat anhand von Tumorgewebe von 19 Retinoblastom-Patienten die Expression von in Apoptose- und Proliferations-Prozesse involvierten Proteinen untersucht, u.a. auch Caspase-3. Auch hier zeigte sich, dass die Aktivierung von Caspase-3 in Retinoblastomen Apoptose induziert, denn das Vorkommen von aktivierter Caspase-3 im untersuchten RB-Tumorgewebe zeigt einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem hier ermittelten apoptotischen Index (Sitorus et al., 2009). Allerdings wurden auch einzelne Tumore untersucht, bei denen trotz geringer Aktivierung von Caspase-3 ein hoher apoptotischer Index vorliegt. Dies lässt die Autoren auf das Vorkommen eines aktivierte Caspase-3 unabhängigen Apoptose Signalwegs schließen (Sitorus et al., 2009) und unterstützt damit die Hypothese, dass auch in RB-Zelllinien aktivierte Caspase-3 unabhängige Signalwege in die Vermittlung der Apoptose involviert sein könnten, z.B. nach *TFF1* KD in der Zelllinie RBL-30.

Da die Ergebnisse der allgemeinen Caspase-Inhibition wie bereits beschrieben auch für die Zelllinie RBL-30 eine Caspase-Abhängigkeit der Apoptose nach *TFF1* KD anzeigen, haben wir hier neben aktivierter Caspase-3 als weiteren Ast der Caspase-Kaskade aktivierte Caspase-7 untersucht. Auch Sitorus et al. (2009) hatten in der bereits genannten Arbeit die

Vermutung geäußert, dass bei der aktivierte Caspase-3 unabhängigen Apoptose-Vermittlung stattdessen aktivierte Caspase-7 eine entscheidende Rolle spielen könnte.

Die exemplarische Untersuchung des Anteils an Zellen mit aktivierter Caspase-7 nach *TFF1* KD in der Zelllinie RBL-30 zeigte jedoch nur eine Tendenz zur Steigerung von aktivierter Caspase-7 positiven Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Es konnte auch hier keine statistische Signifikanz festgestellt werden, sodass dieser Ansatz nicht weiterverfolgt wurde. Somit zeichnet sich für die Zelllinie RBL-30 sowohl bezüglich aktivierter Caspase-3 wie auch aktivierter Caspase-7 die Tendenz zu einer Steigerung nach *TFF1* KD ab, welche aber jeweils keine statistische Signifikanz erreicht. Die Kombination beider Aspekte könnte eine Erklärung für die signifikante Apoptose-Reduktion nach Caspase-Inhibition sein, denn hier wurde ein allgemeiner Caspase-Inhibitor verwendet, welcher alle Caspasen hemmt. Zusammengefasst konnte für die Zelllinie RBL-30 nach *TFF1* KD ein Caspase-abhängiger pro-apoptotischer Effekt festgestellt werden, der kombiniert durch aktivierte Caspase-3 und aktivierte Caspase-7 vermittelt werden könnte.

Bei den Auswertungen der Kontrollen nach lentiviraler Transduktion im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass die Apoptose in den Kontrollen im Gegensatz zu dem *TFF1* KD induzierten pro-apoptotischen Effekt nicht Caspase-abhängig ist, denn die Caspase-Inhibition führte hier zu keiner signifikanten Reduktion der Apoptoserate. Es zeichnete sich zwar in beiden Zelllinien ein Trend zur Reduktion der Apoptoserate durch Caspase-Inhibition ab, der aber weder für die Zelllinie WERI-Rb1 noch RBL-30 statistische Signifikanz erreichte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Apoptose in den Kontrollen anteilig über Caspasen vermittelt werden könnte, aber auch andere Wege der Apoptose-Vermittlung eine maßgebliche Rolle spielen könnten.

Für native RBL-30 Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine statistisch signifikante Reduktion der Apoptoserate sowie des Anteils Caspase-3 positiver Zellen nach Behandlung mit Caspase-Inhibitor festgestellt. Somit besteht vermutlich eine Caspase-Abhängigkeit der endogenen Apoptose der Zelllinie RBL-30, bei der aktivierte Caspase-3 involviert ist. Dies steht zunächst scheinbar im Gegensatz zu den Kontrollen des *TFF1* KD, denn hier konnte keine statistisch signifikante Caspase-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Aber auch hier zeichnet sich eine Tendenz zur Reduktion der Apoptoserate nach Behandlung mit Caspase-Inhibitor ab, auch wenn diese keine statistische Signifikanz erreicht. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Caspase-abhängige Apoptosevermittlung vorliegen könnte, aber zusätzlich weitere Faktoren eine Rolle spielen könnten.

Analysen der Caspase-Abhängigkeit im Rahmen der Überexpression von *TFF1* zeigen in den Kontrollen der Zelllinien Y-79 und RB355 ebenfalls eine Tendenz zur Reduktion der Apoptoserate nach Behandlung mit Caspase-Inhibitor ohne statistische Signifikanz (Busch et al., 2017), sodass die Apoptose der Kontrolle hier ebenfalls nicht maßgeblich über

Caspasen vermittelt zu werden scheint. Da Sitorus et al. (2009) bei der Analyse von RB-Tumorgewebe kein einheitliches Schema der Expression von apoptotischen und anti-apoptotischen Proteinen feststellen konnten, vermuten die Autoren auch hier, dass für die Vermittlung der Apoptose in Retinoblastomen wahrscheinlich nicht ein einzelner Signalweg verantwortlich ist (Sitorus et al., 2009).

Die allgemeine Zellviabilität der RB-Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels WST-1 Viabilitätsassay beurteilt. In beiden verwendeten Zelllinien konnte nach *TFF1* KD keine signifikante Veränderung der Zellviabilität festgestellt werden.

Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu der auf dem Verlauf der Wachstumskurven basierenden Hypothese, dass die Viabilität der Zellen nach *TFF1* KD vermindert sein müsste, da das Wachstum der Zellen nach *TFF1* KD signifikant vermindert ist. Auch die Steigerung der Apoptoserate lässt eine Reduktion der Zellviabilität vermuten, denn die Methodik des WST-1 Assay (siehe 2.16.1) basiert auf der Integrität der mitochondrialen Atmungskette von viablen Zellen. Im Laufe des apoptotischen Zelltods kommt es jedoch zur Zerlegung der Zellorganellen, wie z.B. auch den Mitochondrien, und letztlich der gesamten Zelle (Green und Llambi, 2015), sodass die Atmungskette nicht mehr intakt ist. Dennoch konnte im WST-1 Assay nach *TFF1* KD keine signifikante Reduktion der Zellviabilität nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür könnte z.B. in der verwendeten Systematik der Zellaussaat liegen: Hier wurde die Anzahl an vitalen Zellen in der Zellsuspension mittels Trypanblau-Färbung und Neubauer Zählkammer bestimmt und entsprechend ausgesät. Der *TFF1* KD, der Gegenstand der Untersuchung ist, verursacht jedoch Apoptose. Dies bedeutet, dass es bei einer Selektion der vitalen Zellen zu einem Aussortieren von Zellen, in denen der *TFF1* KD besonders gut funktioniert hat, kommen könnte. Da bei diesen Zellen ein schnelleres Absterben zu erwarten ist, sind diese möglicherweise bei Aussaat des WST-1 Assays unterrepräsentiert. Zwar lag zwischen der Aussaat der Zellen und der Messung stets ein Zeitraum von 48h, dennoch könnte dadurch eine Schmälerung des tatsächlichen Effekts zustande gekommen sein.

Tumorzell-Modelle sind generell stets nur eine Annäherung an die untersuchte Tumorentität, die je nach Modell versucht, verschiedene Aspekte der Tumorerkrankung widerzuspiegeln. *In vitro* Modelle spiegeln die Prozesse eines lebenden Systems in seiner Komplexität nicht wider, da sie nur Einzelaspekte z.B. einer Tumorerkrankung abbilden können. Ein großer Vorteil von *in vitro* Modellen ist jedoch, dass viele Variablen gut kontrollierbar sind, und so eben z.B. ein gemeinsamer Ausgangspunkt definiert werden kann, der die Grundlage zwischen dem Vergleich zwischen zwei Gruppen bildet. *In vivo* Modelle können die Komplexität z.B. von metastatischen Prozessen im lebenden System einbeziehen, allerdings macht eben dies die Betrachtung einzelner Aspekte schwierig (Katt

et al., 2016). Ziel ist im Fall des WST-1 Assays, die Zellviabilität möglichst isoliert von anderen Aspekten des Zellverhaltens zu untersuchen. Die Aussaat vitaler Zellen als Ausgangspunkt macht daher durchaus Sinn, um einen gemeinsamen, vergleichbaren Ausgangspunkt zu schaffen.

Die stabile Überexpression von *TFF1* in Y-79 und RB355 RB-Zellen verursachte eine signifikante Reduktion der Zellviabilität (Busch et al., 2017). Nach *TFF1* KD in den RB-Zelllinien WERI-Rb1 und RBL-30 ließ sich im Rahmen dieser Arbeit jedoch kein Unterschied in der mittels WST-1 Viabilitätsassay gemessenen Zellviabilität feststellen. Dies spricht in der Zusammenschau für eine Tumorsuppressorfunktion von *TFF1* in RB-Zelllinien, denn während die Zellviabilität im WST-Assay nach der Überexpression von *TFF1* signifikant vermindert ist (Busch et al., 2017), konnte in *TFF1*-defizienten Zellen keine wesentliche Beeinträchtigung festgestellt werden.

Zur optimalen Vergleichbarkeit der Effekte eines *TFF1* Knockdowns mit denen einer *TFF1* Überexpression wäre es wünschenswert gewesen, den *TFF1* KD in den gleichen RB-Zelllinien durchzuführen, die von Busch et al. (2017) für die Überexpression verwendet wurden. Die für die Überexpression verwendeten RB-Zelllinien weisen eine besonders niedrige *TFF1* Expression im Vergleich zur gesunden humanen Retina auf (Weise und Dünker, 2013; Philippeit et al., 2014), was für die Durchführung einer *TFF1* Überexpression günstig ist. Allerdings sind diese Zelllinien deshalb für die Durchführung des entsprechenden Knockdowns ungeeignet, da die erreichbare Reduktion des Expressionslevels geringer ist, als bei Zelllinien mit hoher endogener *TFF1* Expression. Daher wurde der Knockdown von *TFF1* in anderen RB-Zelllinien durchgeführt, als die Überexpression in der Arbeit von Busch et al. (2017). Dies ist ein Faktor, der unterschiedliche Effekte einer Veränderung der *TFF1* Expression bedingen könnte.

Insbesondere vor dem Hintergrund, dass vermutlich nicht ein einzelner Signalweg Apoptose in Retinoblastomen vermittelt (Sitorus et al., 2009) ist es denkbar, dass Zelllinien mit hoher endogener *TFF1* Expression anders auf eine Reduktion der *TFF1* Expression reagieren könnten, als Zelllinien mit niedriger endogener *TFF1* Expression. Die Beobachtung, dass sowohl die Überexpression wie auch der Knockdown von *TFF1* in RB-Zelllinien eine Steigerung der Apoptose auslösen, könnte daher über die Beeinflussung unterschiedlicher Signalwege auch auf der Verwendung unterschiedlicher Zelllinien beruhen.

4.3 Einfluss des *TFF1* Knockdowns auf das Migrations- und Invasivitäts-Verhalten von Retinoblastomzellen

Die extraokuläre Metastasierung des Retinoblastoms geht mit einer schlechten Prognose einher (Chintagumpala et al., 2007) und hat ohne rechtzeitige und effektive Therapie letale Folgen (Soliman et al., 2017).

Grundlage für das metastatische Potential von Tumorzellen ist unter anderem die Fähigkeit, aus disseminierten (Einzel-) Zellen proliferieren zu können (Hanahan und Weinberg, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fähigkeit der verwendeten RB-Zellen zu Zellkontakt-unabhängigem Wachstum bei Einzelaussaat *in vitro* mittels Soft Agarose Assay untersucht, um den Einfluss von *TFF1* auf diesen Aspekt des Zellverhaltens zu evaluieren. In der Zelllinie RBL-30 zeigte sich nach *TFF1* KD eine Tendenz zur Reduktion der Koloniebildungsrate im Vergleich zu den Kontrollen, allerdings erreichte diese keine statistische Signifikanz. Für die Zelllinie WERI-Rb1 konnte eine signifikante Reduktion der Koloniebildungsrate nach *TFF1* KD festgestellt werden. Bei Berücksichtigung des Einflusses des *TFF1* KD auf die Wachstumskinetik und Apoptoserate (siehe Kapitel 4.2) stellt sich dabei die Frage, ob der Effekt im Soft Agarose Assay überwiegend auf dem pro-apoptotischen Effekt nach *TFF1* KD basiert, denn der Soft Agarose Assay bildet mit einer Inkubationszeit von 3 Wochen einen relativ langen Zeitraum ab. Da bei einer höheren Apoptoserate mehr Zellen sterben, bevor sie erfolgreich Kolonien bilden können, ist hier ein Einfluss des pro-apoptotischen Effekts denkbar. Dies wäre allerdings vor allem für die Zelllinie RBL-30 zu erwarten, da die Zellen hier nach *TFF1* KD in der Wachstumskinetik einen Rückgang des Wachstums zeigen, dennoch ist die Reduktion der Koloniebildungsrate in der Zelllinie RBL-30 statistisch nicht signifikant. Dies spricht gegen eine maßgebliche Beeinflussung der Koloniebildungsrate durch den pro-apoptotischen Effekt, sodass die Apoptose hier nicht der entscheidende Faktor für die Unterschiede in der Koloniebildungsrate zu sein scheint. Busch et al. (2017) haben bei Untersuchung der Zelllinien Y-79 und RB355 im Soft Agarose Assay nach *TFF1* Überexpression ebenfalls keine signifikante Veränderung der Fähigkeit zu Zellkontakt-unabhängigem Wachstum im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt, obwohl auch hier ein ausgeprägter pro-apoptotischer Effekt nach *TFF1* Überexpression vorlag.

TFF1 spielt eine wichtige Rolle bei epithelialen Restitutionsprozessen im Gastrointestinaltrakt (Vgl. Kapitel 1.2), die unter anderem darauf basieren, dass die Epithelzellen über defekte Bereiche der Mukosa migrieren und den dabei entstehenden Verlust der Zellkontakte überstehen (Aamann et al., 2014). Somit bildet die Fähigkeit, den Verlust von Zellkontakten zu überleben, eine der Grundkompetenzen von Zellen für die epitheliale Restitution. Für humane Kolonkarzinomzellen konnte z.B. gezeigt werden, dass

die induzierte Expression von *TFF1* die Fähigkeit zu Zellkontakt-unabhängigem Wachstum steigert (Rodrigues et al., 2006). Bei Berücksichtigung dieser Effekte von *TFF1* im Gastrointestinaltrakt erscheint es naheliegend, dass der Verlust der *TFF1* Expression mit einer Reduktion der Fähigkeit zu Zellkontakt-unabhängigem Wachstum und damit der Koloniebildungsrate im Soft Agarose Assay einhergeht. Allerdings zeigen im Gegensatz dazu Daten bezüglich des Mammakarzinoms eine gesteigerte Menge an Kolonien im Softagar-Assay nach Knockdown von *TFF1* in Hormon-Rezeptor positiven Mammakarzinom-Zellen *in vitro* (Buache et al., 2011). Somit scheint dieser Aspekt der Funktion von *TFF1* Zelltyp-abhängig zu sein, sodass keine Verallgemeinerung möglich ist.

Um die Komplexität der Metastasierungskaskade in einem lebenden Organismus besser abzubilden, wurde das Migrations- und Invasivitätsverhalten der RB-Zellen im Rahmen dieser Arbeit mittels CAM Assay analysiert.

Im CAM Assay sind die einzelnen Schritte der Metastasierungskaskade in einem zusammenhängenden *in vivo* System enthalten, allerdings in einer vergleichsweise sehr kurzen Zeitspanne (Deryugina und Quigley, 2008).

Bei Verwendung der Zelllinie RBL-30 konnten wiederholt keine ausreichenden Zellzahlen für das Spontan-Metastasen-Modell hergestellt werden. Hierfür sind die langsame Wachstumskinetik der Zelllinie RBL-30 sowie die bereits beschriebenen Effekte der lentiviralen Behandlung und des *TFF1* KD als ursächlich zu betrachten. Die Untersuchung der Zelllinie RBL-30 *in ovo* wurde daher auf das Experimentelle-Metastasen-Modell beschränkt (s.u.).

Mit der Zelllinie WERI-Rb1 konnten nach lentiviraler Transduktion ausreichende Zellzahlen generiert werden, um das Spontan-Metastasen-Modell durchführen zu können. Sowohl in den Kontrollen wie auch nach *TFF1* KD zeigte sich die Zelllinie WERI-Rb1 hier zur Tumorbildung *in ovo* auf der oberen CAM in der Lage. Nach *TFF1* KD war die Tumorbildungsrate niedriger als in den Kontrollen, allerdings erreichte diese Tendenz in der statistischen Auswertung keine Signifikanz.

Die exemplarische histologische Aufarbeitung von CAM Tumoren nach Inokulation von WERI-Rb1 Zellen diente der Überprüfung, ob die makroskopisch gesichteten CAM Tumore auch der Tumorbildung aus inokulierten humanen RB-Zellen entsprechen. Zudem ermöglicht die Mikroskopie von Tumorschnitten eine Beurteilung der Lokalisation der RB-Zellen in den Gewebeschichten der CAM. Die Verwendung GFP-markierter RB-Zellen ermöglichte die Visualisierung der RB-Zellen in den Tumorschnitten mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die Durchführung einer *Realtime* RT-PCR zum Nachweis der humanen RB-Zellen ist hier nicht zielführend, da aufgrund der Inokulation der RB-Zellen im Bereich der Tumorbildung ohnehin mit einem positiven Nachweis zu rechnen ist,

unabhängig davon ob die Raumforderung auch einer Tumorbildung aus RB-Zellen entspricht.

Daten von Busch et al. (2017) zeigen, dass sich bei der Inokulation von *TFF1* überexprimierenden RB-Zellen der Zelllinien Y-79 und RB355 im Spontan-Metastasen-Modell des CAM Assays ebenfalls Tumore bilden. In der histologischen Aufarbeitung der Tumore mittels Anfertigung von Kryoschnitten zeigte sich dabei eine Invasion GFP-positiver Zellen zwischen Ektoderm und Mesoderm, sowie tiefer in die mesodermale Schicht der CAM. Dabei waren die RB-Zellen nach *TFF1* Überexpression nicht nur einzeln versprengt, sondern eher im Sinne ausgedehnter Tumor-artiger Formationen zu erkennen (Busch et al., 2017), was einen Unterschied zu den Tumorschnitten nach *TFF1* KD im Rahmen dieser Arbeit darstellt.

Die exemplarische Aufarbeitung von Tumoren aus dem CAM Assay im Rahmen dieser Arbeit zeigte, dass es bei der Inokulation von RB-Zellen der Zelllinie WERI-Rb1 auf der oberen CAM sowohl bei den Kontrollen als auch nach *TFF1* KD zu einem Eindringen der RB-Zellen in die mesodermale Schicht der CAM kommt.

Es besteht kein eindeutiger Effekt des *TFF1* KD auf die Tumorbildung *in ovo*. Es zeichnet sich jedoch ab, dass die Zellen nach *TFF1* KD möglicherweise eine geringere Invasivität aufweisen, da sich die mit RB-Zellen durchsetzten Bereiche des Ektoderms an der Applikationsstelle in den exemplarisch untersuchten Proben weniger dicht präsentieren. Die *in vitro* beobachtete signifikante Reduktion der Wachstumskinetik nach *TFF1* KD im Vergleich zu den Kontrollen lässt ein geringeres lokales Wachstum der Zellen im CAM Assay im Vergleich zu den Kontrollen vermuten, was sich in einem weniger zellichten Bereich, wie es hier zu sehen ist, widerspiegeln kann. Zudem war nach *TFF1* KD eine Tendenz zur Reduktion der Tumorbildungsrate festzustellen, auch wenn keine statistische Signifikanz erreicht wurde.

Die Inokulation von *TFF1* überexprimierenden und Kontrollzellen der RB-Zelllinien Y-79 und RB355 zeigte, dass auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Tumorbildungsrate bestand. Allerdings bildeten die *TFF1* überexprimierenden RB-Zellen hier signifikant kleinere Tumore im CAM Assay aus als die Kontrollen (Busch et al., 2017), somit ist der Effekt der Überexpression als Reduktion der Tumorigenität der RB-Zellen einzuordnen.

Auch hier verursacht der Knockdown von *TFF1* keine gegenteiligen Effekte im Vergleich zur Überexpression. Interessanterweise scheinen die für WERI-Rb1 Zellen *in vitro* beobachteten *TFF1* KD Effekte im Sinne einer Apoptose-Induktion und Reduktion der Koloniebildungsrate keinen maßgeblichen Einfluss auf die Tumorigenität *in vivo* zu haben. Auch in anderen Forschungsarbeiten hat sich bereits gezeigt, dass *in vitro* beobachtete Effekte nicht zwangsläufig mit den Ergebnissen aus *in vivo* Untersuchungen

übereinstimmen: So zeigen sich z.B. bei der Überexpression von *TFF1* in Mammakarzinom-Zelllinien *in vitro* tumorigen einzuordnende Effekte im Sinne einer Steigerung der Migration und Invasion, sowie nach *TFF1* KD *in vitro* eine Reduktion der Migration und Invasivität. Im Maus-Modell verursachte die Überexpression von *TFF1 in vivo* jedoch keine signifikanten Veränderungen in Bezug auf die Ausbildung von Tumoren (Buache et al., 2011).

Bei Verwendung der Zelllinie RBL-30 im Experimentelle-Metastasen-Modell im Rahmen dieser Arbeit konnte in der Begutachtung der Stanzen der unteren CAM mittels Fluoreszenzmikroskopie weder bei den Kontrollen noch nach *TFF1* KD ein GFP-positives Signal visualisiert werden. Da das Detektionslimit der verwendeten Methode zur Quantifizierung der humanen RB-Zellen mittels *hGAPDH* bei mindestens 4 von 6 GFP-positiven CAM-Stanzen liegt (Busch et al., 2015), wurden die CAM-Stanzen der Zelllinie RBL-30 nicht weiter mittels *Realtime* RT-PCR analysiert. Es ist nicht auszuschließen, dass einzelne Zellen in das extravasale Gewebe migriert sind, allerdings liegt das Ausmaß der Migrationsfähigkeit unterhalb der Sensitivität der verwendeten Methodik. Unsere Arbeitsgruppe konnte generell bei Verwendung nativer GFP-markierter RBL-30 Zellen im Experimentelle-Metastasen-Modell mittels Fluoreszenzmikroskopie GFP-positive Zellen in der unteren CAM nachweisen (Busch et al., 2015). Somit scheint die Migrationsfähigkeit der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kontrollzellen und *TFF1* KD Zellen im Vergleich zu den nativen Zellen vermindert zu sein.

Insgesamt lässt sich keine Aussage dazu treffen, ob der Knockdown von *TFF1* die Fähigkeit von RBL-30 Zellen zur Migration in das extravasale Gewebe beeinflusst, da dies sowohl in den Kontrollen als auch nach *TFF1* KD unterhalb unserer Detektionsgrenze liegt.

In CAM-Stanzen der Zelllinie WERI-Rb1 waren mittels Fluoreszenzmikroskopie stets GFP-positive Fluoreszenzsignale als Korrelat von RB-Zellen sowohl in den Kontrollen wie auch nach *TFF1* KD nachweisbar. Die RB-Zelllinie WERI-Rb1 war somit sowohl in den Kontrollen als auch nach *TFF1* KD dazu in der Lage, in das extravasale Gewebe zu migrieren. Bei der quantitativen Auswertung der *hGAPDH*-positiven CAM Stanzen zeichnete sich eine Tendenz zur Reduktion der Migrationsfähigkeit nach *TFF1* KD im Vergleich zu den Kontrollen ab. Dies deutet auf eine mögliche Reduktion der Migrationsfähigkeit nach *TFF1* KD in der Zelllinie WERI-Rb1 hin.

Die Quantifizierung des Gehalts an RB-Zellen zeigte eine statistisch signifikante Reduktion von *hGAPDH* und damit von RB-Zellen in den CAM-Stanzen nach *TFF1* KD im Vergleich zu den Kontrollen. In den im Rahmen dieser Arbeit gewonnen CAM-Stanzen waren durchschnittlich weniger RB-Zellen enthalten, als bei der Verwendung von nativen Zellen (Busch et al., 2015). Dies steht in Einklang mit den Beobachtungen bei Verwendung der Zelllinie RBL-30, da auch hier nach lentiviraler Transduktion in den Kontrollen weniger GFP-

Signal nachweisbar war, als aufgrund der vorherigen Daten von Busch et al. (2015) zu erwarten war. Aufgrund des hohen Potentials für Invasivität und Migration *in ovo* wird die Detektionsgrenze für *hGAPDH* bei der Zelllinie WERI-Rb1 jedoch auch nach lentiviraler Transduktion nicht unterschritten.

Bei isolierter Betrachtung der Daten des *TFF1* KD zeichnet sich somit ein tendenziell pro-migratorischer Effekt von *TFF1* ab, da der Verlust von *TFF1* das Migrationspotential der RB Zelllinie WERI-Rb1 reduziert. Dies passt an sich nicht zu einer Einordnung von *TFF1* als Tumorsuppressor bzgl. des Retinoblastoms. Ein pro-migratorischer Effekt von *TFF1* erscheint allerdings vor dem Hintergrund der Funktionen der TFF Peptide z.B. im Gastrointestinaltrakt einleuchtend: Wie bereits im Rahmen der Ergebnisse des Soft Agarose Assays diskutiert, sind die TFF Peptide in epitheliale Restitutionsprozesse involviert, die unter anderem darauf basieren, dass die Epithelzellen über defekte Bereiche der Mukosa migrieren (Aamann et al., 2014). Schon lange ist bekannt, dass den TFF Peptiden in ihrer biologischen Funktion hierbei eine wichtige Rolle zukommt (Taupin und Podolsky, 2003), und in einer Vielzahl an Modellen konnte für alle drei TFF Peptide ein pro-migratorischer Effekt gezeigt werden (Wright et al., 1997; Göke et al., 2001). Für *TFF1* konnten pro-migratorische Effekte z.B. in pankreatischen Krebszelllinien (Arumugam et al., 2011) und Mammakarzinom-Zelllinien gezeigt werden (Prest et al., 2002).

Nach Überexpression von *TFF1* in RB355 RB-Zellen weist eine signifikante Reduktion der Menge an *hGAPDH* in der unteren CAM im Vergleich zu den Kontrollen auf eine Reduktion der Migrationsfähigkeit durch die Überexpression von *TFF1* hin (Busch et al., 2017). So zeigt sich in Bezug auf *TFF1*, dass sowohl der Knockdown wie auch die Überexpression von *TFF1* eine Reduktion der Migrationsfähigkeit im Vergleich zu den Kontrollen verursachen. Dies lässt vermuten, dass hier die genau passende Expression von *TFF1* eine entscheidende Rolle für das Migrations- und Invasionspotential von RB-Zellen spielen könnte.

4.4 Überprüfung der Hypothese einer Auto- und/oder Kreuzinduktion der TFF Peptide nach *TFF1* Knockdown

Die Analyse der Auswirkungen des *TFF1* KD in RB-Zelllinien zeigte im Vergleich zu den mittlerweile publizierten Daten einer *TFF1* Überexpression nicht grundsätzlich gegenteilige Effekte auf das Verhalten von RB-Zelllinien (Busch et al., 2017). Als möglicher Erklärungsansatz hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit eine potentielle Auto- und/oder Kreuzinduktion verschiedener TFF Peptide in Betracht gezogen.

Im gesunden Gewebe des Gastrointestinaltrakts gibt es zwar eine Aufteilung bzgl. der Lokalisation der Expression der TFF Peptide, allerdings findet z.B. während Reparaturprozessen eine simultane Expression aller drei TFF Peptide im betroffenen Magen- bzw. Darmgewebe statt. Dies weist auf gemeinsame Regulationsprozesse der Expression hin (Ribieras et al., 1998). Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass TFF2 und TFF3 die Expression aller drei TFF Peptide in gastrointestinalen Zelllinien beeinflussen, was ebenfalls eine Auto- und/oder Kreuzinduktion der TFF Peptide nahelegt (Taupin et al., 1999).

Die Überexpression von *TFF3* führt in RB-Zelllinien zu einer Reduktion des Wachstums und einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate, welche Caspase-abhängig vermittelt wird. Für die Zelllinie WERI-Rb1 konnte zudem nach Überexpression von *TFF3* gezeigt werden, dass die Koloniebildungsrate im Soft Agarose Assay signifikant reduziert ist (Grosse-Kreul et al., 2016). Diese Aspekte des Zellverhaltens entsprechen den nach *TFF1* KD beobachteten Effekten, sodass eine kompensatorische Überexpression von *TFF3* als Reaktion auf den *TFF1* KD einen vielversprechenden Erklärungsansatz für die beobachteten Effekte darstellte.

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde die *TFF2* und *TFF3* Expression exemplarisch in RBL-30 Zellen nach *TFF1* KD sowie in den Kontrollen mittels *Realtime* RT-PCR untersucht. Hierbei war *TFF2* nicht und auch *TFF3* nur in sehr geringem Ausmaß nachweisbar. Insbesondere war keine Veränderung der *TFF3* Expression nach *TFF1* KD im Vergleich zu den Kontrollen festzustellen (Daten nicht gezeigt). Somit ist eine kompensatorische Regulierung der anderen TFF Peptide als Ursache der Effekte des *TFF1* KD unwahrscheinlich.

Für die Überexpression von *TFF1* in RB-Zelllinien wurden durch Busch et al. (2017) mittels *Whole Genome Microarray* die Genexpressionsprofile von *TFF1* überexprimierenden Y-79 RB-Zellen und Kontrollzellen analysiert. Dabei wurden insgesamt 16 Gene identifiziert, die nach der *TFF1* Überexpression signifikant hoch- oder herunterreguliert sind. Dabei sind unter anderem signifikant regulierte Gene identifiziert worden, welche Erklärungsansätze für die von der *TFF1* Überexpression verursachten Effekte auf die Wachstumsrate, Proliferation sowie Invasivitäts- und Migrationsverhalten der Zellen bieten (Busch et al., 2017).

Eine entsprechende Analyse auch nach *TFF1* KD durchzuführen und mit den Ergebnissen der oben genannten Studie zu vergleichen, könnte Hinweise geben um die Effekte nach *TFF1* KD zu verstehen. Gerade aufgrund der teilweise gleichen Effekte einer *TFF1* Überexpression und eines *TFF1* KD in RB-Zelllinien wäre eine entsprechende Analyse der regulierten Gene nach *TFF1* KD interessant, um hier den Vermittlungsmechanismen der unterschiedlichen Aspekte des Zellverhaltens auf den Grund zu gehen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Für das Retinoblastom als häufigsten malignen intraokulären Tumor des Kindesalters bedarf es aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen und Langzeitfolgen bei aktuellen Therapieoptionen der Entwicklung neuer Therapieansätze.

In der Literatur wird *Trefoil Factor Family Peptide 1 (TFF1)* sowohl als Tumorsuppressor wie auch als Onkogen diskutiert und in Bezug auf ein therapeutisches Potential für diverse Erkrankungen in Betracht gezogen. Im Hinblick auf das Retinoblastom wiesen Überexpressionsstudien unserer Arbeitsgruppe auf eine Tumorsuppressor-Funktion von *TFF1* hin, da nach *TFF1* Überexpression in humanen Retinoblastomzelllinien eine signifikante Reduktion der Zellviabilität sowie des Wachstums basierend auf einer Reduktion der Proliferationsrate und Induktion von Apoptose festgestellt werden konnten. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Auswirkungen eines *TFF1* Knockdowns in Retinoblastomzelllinien leisten einen Beitrag zur Evaluation der Rolle im Retinoblastom und tragen so zur langfristigen Entwicklung neuer Therapiestrategien für das Retinoblastom bei. Für die beiden untersuchten Retinoblastomzelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 konnten nach *TFF1* Knockdown zwar keine signifikanten Änderungen in der Zellviabilität und Zellproliferation festgestellt werden, die Analyse des Wachstumsverhaltens der beiden Zelllinien nach *TFF1* Knockdown ergab jedoch eine signifikante Reduktion des Wachstums im Vergleich zu Kontrollzellen. Während für den beobachteten signifikanten pro-apoptotischen Effekt eines *TFF1* Knockdowns in der Zelllinie WERI-Rb1 eine Vermittlung über aktivierte Caspase-3 gezeigt werden konnte, zeigte sich in der Zelllinie RBL-30 weder für aktivierte Caspase-3 noch aktivierte Caspase-7 eine maßgebliche Beteiligung. Die Zelllinie WERI-Rb1 wies nach *TFF1* Knockdown zudem eine signifikante Reduktion der Fähigkeit zu Zellkontakt-unabhängigem Wachstum auf. In Chorioallantoismembran-Assays als *in vivo* Modell bildeten inokulierte WERI-Rb1 Zellen nach *TFF1* Knockdown tendenziell seltener Tumore als Kontrollzellen, jedoch erreicht diese Tendenz keine statistische Signifikanz. Dagegen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Migrationsfähigkeit von WERI-Rb1 Zellen nach *TFF1* Knockdown.

In den untersuchten Retinoblastomzelllinien konnten also nach *TFF1* Knockdown nicht grundsätzlich gegenteilige Effekte im Vergleich zu denen einer *TFF1* Überexpression festgestellt werden. Dennoch untermauern die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation, dass *TFF1* eine funktionelle Relevanz im Retinoblastom hat und somit vielversprechend für die langfristige Entwicklung eines neuen diagnostischen oder therapeutischen Ansatzes für das Retinoblastom ist.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aamann, L., Vestergaard, E.M., Grønþæk, H. (2014): Trefoil factors in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 20, 3223-3230.
2. AlAli, A., Kletke, S., Gallie, B., Lam, W.-C. (2018): Retinoblastoma for Pediatric Ophthalmologists. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)* 7, 160-168.
3. Amiry, N., Kong, X., Muniraj, N., Kannan, N., Grandison, P.M., Lin, J., Yang, Y., Vouyovitch, C.M., Borges, S., Perry, J.K., Mertani, H.C., Zhu, T., Liu, D., Lobie, P.E. (2009): Trefoil factor-1 (TFF1) enhances oncogenicity of mammary carcinoma cells. *Endocrinology* 150, 4473-4483.
4. Ancona-Lezama, D., Dalvin, L.A., Shields, C.L. (2020): Modern treatment of retinoblastoma: A 2020 review. *Indian J Ophthalmol* 68, 2356-2365.
5. Arumugam, T., Brandt, W., Ramachandran, V., Moore, T.T., Wang, H., May, F.E., Westley, B.R., Hwang, R.F., Logsdon, C.D. (2011): Trefoil factor 1 stimulates both pancreatic cancer and stellate cells and increases metastasis. *Pancreas* 40, 815-822.
6. Belovari, T., Bijelić, N., Tolušić Levak, M., Baus Lončar, M. (2015): Trefoil factor family peptides TFF1 and TFF3 in the nervous tissues of developing mouse embryo. *Bosn J Basic Med Sci* 15, 33-37.
7. Berry, J.L., Polski, A., Cavenee, W.K., Dryja, T.P., Murphree, A.L., Gallie, B.L. (2019): The RB1 Story: Characterization and Cloning of the First Tumor Suppressor Gene. *Genes (Basel)* 10, 879.
8. Bornfeld, N., Lohmann, D., Bechrakis, N.E., Biewald, E. (2020): Retinoblastom [Retinoblastoma]. *Ophthalmologie* 117, 389-402.
9. Bossenmeyer-Pourié, C., Kannan, R., Ribieras, S., Wendling, C., Stoll, I., Thim, L., Tomasetto, C., Rio, M.-C. (2002): The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *J Cell Biol* 157, 761-770.
10. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P. (1995): A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7297-7301.
11. Braga Emidio, N., Brierley, S.M., Schroeder, C.I., Muttenthaler, M. (2020): Structure, Function, and Therapeutic Potential of the Trefoil Factor Family in the Gastrointestinal Tract. *ACS Pharmacol Transl Sci* 3, 583-597.
12. Buache, E., Etique, N., Alpy, F., Stoll, I., Muckensturm, M., Reina-San-Martin, B., Chenard, M.P., Tomasetto, C., Rio, M.C. (2011): Deficiency in trefoil factor 1 (TFF1) increases tumorigenicity of human breast cancer cells and mammary tumor development in TFF1-knockout mice. *Oncogene* 30, 3261-3273.
13. Busch, M., Große-Kreul, J., Wirtz, J.J., Beier, M., Stephan, H., Royer-Pokora, B., Metz, K., Dünker, N. (2017): Reduction of the tumorigenic potential of human retinoblastoma cell lines by TFF1 overexpression involves p53/caspase signaling and miR-18a regulation. *Int J Cancer* 141, 549-560.
14. Busch, M., Klein, S., Große-Kreul, J., Scheiner, O., Metz, K., Stephan, H., Dünker, N. (2019): p53, miR-34a and EMP1-Newly Identified Targets of TFF3 Signaling in Y79 Retinoblastoma Cells. *Int J Mol Sci* 20, 4129.

15. Busch, M., Metz, K., Beier, M., Biewald, E., Dünker, N. (2018b): Trefoil Factor Family 1 Expression Correlates with Clinical Outcome in Patients with Retinoblastoma. *Retina* 38, 2422-2428.
16. Busch, M., Papior, D., Stephan, H., Dünker, N. (2018a): Characterization of etoposide- and cisplatin-chemoresistant retinoblastoma cell lines. *Oncol Rep* 39, 160-172.
17. Busch, M., Philippeit, C., Weise, A., Dunker, N. (2015): Re-characterization of established human retinoblastoma cell lines. *Histochem Cell Biol* 143, 325-338.
18. Calnan, D.P., Westley, B.R., May, F.E.B., Floyd, D.N., Marchbank, T., Playford, R.J. (1999): The trefoil peptide TFF1 inhibits the growth of the human gastric adenocarcinoma cell line AGS. *J Pathol* 188, 312-317.
19. Chinery, R., Williamson, J., Poulson, R. (1996): The gene encoding human intestinal trefoil factor (TFF3) is located on chromosome 21q22.3 clustered with other members of the trefoil peptide family. *Genomics* 32, 281-284.
20. Chintagumpala, M., Chevez-Barrios, P., Paysse, E.A., Plon, S.E., Hurwitz, R. (2007): Retinoblastoma: review of current management. *Oncologist* 12, 1237-1246.
21. Comings, D.E. (1973): A general theory of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 3324-3328.
22. Corson, T.W., Gallie, B.L. (2007): One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 46, 617-634.
23. Davis, B.J. (1964): Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. *Ann N Y Acad Sci* 121, 404-427.
24. Davis, H.E., Morgan, J.R., Yarmush, M.L. (2002): Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys Chem* 97, 159-172.
25. De Jong, M.C., Kors, W.A., De Graaf, P., Castelijns, J.A., Kivelä, T., Moll, A.C. (2014): Trilateral retinoblastoma: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 15, 1157-1167.
26. Deryugina, E.I., Quigley, J.P. (2008): Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochem Cell Biol* 130, 1119-1130.
27. Dimaras, H., Corson, T.W., Cobrinik, D., White, A., Zhao, J., Munier, F.L., Abramson, D.H., Shields, C.L., Chantada, G.L., Njuguna, F., Gallie, B.L. (2015): Retinoblastoma. *Nat Rev Dis Primers* 1, 15021.
28. Dimaras, H., Khetan, V., Halliday, W., Orlic, M., Prigoda, N.L., Piovesan, B., Marrano, P., Corson, T.W., Eagle, R.C., Squire, J.A., Gallie, B.L. (2008): Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: Increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. *Hum Mol Genet* 17, 1363-1372.
29. DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H., Calos, M.P. (1987): Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7, 379-387.
30. Emami, S., Rodrigues, S., Rodrigue, C.M., Le Floch, N., Rivat, C., Attoub, S., Bruyneel, E., Gespach, C. (2004): Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. *Peptides* 25, 885-898.
31. Fabian, I.D., Onadim, Z., Karaa, E., Duncan, C., Chowdhury, T., Scheimberg, I., Ohnuma, S.-I., Reddy, M.A., Sagoo, M.S. (2018): The management of retinoblastoma. *Oncogene* 37, 1551-1560.

32. Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M., Dryja, T.P. (1986): A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 643-646.
33. Gallie, B.L., Ellsworth, R.M., Abramson, D.H., Phillips, R.A. (1982): Retinoma: spontaneous regression of retinoblastoma or benign manifestation of the mutation? *Br J Cancer* 45, 513-521.
34. Göke, M.N., Cook, J.R., Kunert, K.S., Fini, M.E., Gipson, I.K., Podolsky, D.K. (2001): Trefoil peptides promote restitution of wounded corneal epithelial cells. *Exp Cell Res* 264, 337-344.
35. Green, D.R., Llambi, F. (2015): Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a006080.
36. Griegel, S., Hong, C., Frötschl, R., Hülser, D.F., Greger, V., Horsthemke, B., Rajewsky, M.F. (1990): Newly established human retinoblastoma cell lines exhibit an "immortalized" but not an invasive phenotype in vitro. *Int J Cancer* 46, 125-132.
37. Grosse-Kreul, J., Busch, M., Winter, C., Pikos, S., Stephan, H., Dunker, N. (2016): Forced Trefoil Factor Family Peptide 3 (TFF3) Expression Reduces Growth, Viability, and Tumorigenicity of Human Retinoblastoma Cell Lines. *PLoS One* 11, e0163025.
38. Gudiseva, H.V., Berry, J.L., Polski, A., Tummina, S.J., O'Brien, J.M. (2019): Next-Generation Technologies and Strategies for the Management of Retinoblastoma. *Genes (Basel)* 10, 1032.
39. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
40. Haubold, M., Weise, A., Stephan, H., Dünker, N. (2010): Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) signaling in retinoblastoma cells. *Int J Biol Sci*, 700-715.
41. Henry, J.A., Bennett, M.K., Piggott, N.H., Levett, D.L., May, F.E., Westley, B.R. (1991): Expression of the pNR-2/pS2 protein in diverse human epithelial tumours. *Br J Cancer* 64, 677-682.
42. Hinz, M., Schwegler, H., Chwieralski, C.E., Laube, G., Linke, R., Pohle, W., Hoffmann, W. (2004): Trefoil factor family (TFF) expression in the mouse brain and pituitary: changes in the developing cerebellum. *Peptides* 25, 827-832.
43. Hirota, M., Awatsuji, H., Sugihara, Y., Miyashita, S., Furukawa, Y., Hayashi, K. (1995): Expression of pS2 gene in rat brain. *Biochem Mol Biol Int* 35, 1079-1084.
44. Hoffmann, W. (2020): Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and Their Diverse Molecular Functions in Mucus Barrier Protection and More: Changing the Paradigm. *Int J Mol Sci* 21, 4535.
45. Kaatsch, P. und Spix, C. (2019): Krebs in Deutschland 2015/2016, Kapitel 4: Krebs bei Kindern. Online-Publikation; https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile; Stand 17.08.2020
46. Kaewkhaw, R., Rojanaporn, D. (2020): Retinoblastoma: Etiology, Modeling, and Treatment. *Cancers (Basel)* 12, 2304.
47. Katt, M.E., Placone, A.L., Wong, A.D., Xu, Z.S., Searson, P.C. (2016): In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Front Bioeng Biotechnol* 4, 12.
48. Kjellef, S. (2009): The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities. *Cell Mol Life Sci* 66, 1350-1369.

49. Knudson, A.G., Jr. (1971): Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-823.
50. Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
51. Lefebvre, O., Chenard, M.P., Masson, R., Linares, J., Dierich, A., LeMeur, M., Wendling, C., Tomasetto, C., Chambon, P., Rio, M.C. (1996): Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science* 274, 259-262.
52. Liu, H., Zhang, Y., Zhang, Y.-Y., Li, Y.-P., Hua, Z.-Q., Zhang, C.-J., Wu, K.-C., Yu, F., Zhang, Y., Su, J., Jin, Z.-B. (2020): Human embryonic stem cell-derived organoid retinoblastoma reveals a cancerous origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 33628-33638.
53. Liu, J., Ottaviani, D., Sefta, M., Desbrouesses, C., Chapeaublanc, E., Aschero, R., Sirab, N., Lubieniecki, F., Lamas, G., Tonon, L., Dehainault, C., Hua, C., Fréneaux, P., Reichman, S., Karboul, N., Biton, A., Mirabal-Ortega, L., Larcher, M., Brulard, C., Arrufat, S., Nicolas, A., Elarouci, N., Popova, T., Némati, F., Decaudin, D., Gentien, D., Baulande, S., Mariani, O., Dufour, F., Guibert, S., Vallot, C., Rouic, L.L.-L., Matet, A., Desjardins, L., Pascual-Pasto, G., Suñol, M., Catala-Mora, J., Llano, G.C., Couturier, J., Barillot, E., Schaiquevich, P., Gauthier-Villars, M., Stoppa-Lyonnet, D., Golmard, L., Houdayer, C., Brisse, H., Bernard-Pierrot, I., Letouzé, E., Viari, A., Saule, S., Sastre-Garau, X., Doz, F., Carcaboso, A.M., Cassoux, N., Pouponnot, C., Goureau, O., Chantada, G., Reyniès, A. de, Aerts, I., Radvanyi, F. (2021): A high-risk retinoblastoma subtype with stemness features, dedifferentiated cone states and neuronal/ganglion cell gene expression. *Nat Commun* 12, 5578.
54. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
55. Lottspeich, F., Engels, J.W. (2012): *Bioanalytik*. 3. Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
56. Madsen, J., Nielsen, O., Tornøe, I., Thim, L., Holmskov, U. (2007): Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem* 55, 505-513.
57. Mallipatna, A.C., Gallie, B.L., Chévez-Barrios, P., Lumbroso-Le Rouic, L., Chantada, G.L., Doz, F., Brisse, H.J., Munier, F.L., Albert, D.M., Català-Mora, J., Desjardins, L., Suzuki, S., Carroll, W.L., Coupland, S.E., Finger, P.T. (2017): Retinoblastoma. In: Amin, M.B., Greene, F.L., Edge, S.B. (Eds.): *AJCC cancer staging manual*. 8. Ed.; S. 819-831. Schweiz, Chicago, IL: Springer; AJCC American Joint Committee on Cancer.
58. Masiakowski, P., Breathnach, R., Bloch, J., Gannon, F., Krust, A., Chambon, P. (1982): Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 10, 7895-7903.
59. McFall, R.C., Sery, T.W., Makadon, M. (1977): Characterization of a new continuous cell line derived from a human retinoblastoma. *Cancer Res* 37, 1003-1010.
60. Moisan, J.P., Mattei, M.G., Mandel, J.L. (1988): Chromosome localization and polymorphism of an oestrogen-inducible gene specifically expressed in some breast cancers. *Hum Genet* 79, 168-171.
61. Munier, F.L., Beck-Popovic, M., Chantada, G.L., Cobrinik, D., Kivelä, T.T., Lohmann, D., Maeder, P., Moll, A.C., Carcaboso, A.M., Moulin, A., Schaiquevich, P., Bergin, C., Dyson, P.J., Houghton, S., Puccinelli, F., Vial, Y., Gaillard, M.-C., Stathopoulos,

- C. (2019): Conservative management of retinoblastoma: Challenging orthodoxy without compromising the state of metastatic grace. "Alive, with good vision and no comorbidity". *Prog Retin Eye Res* 73, 100764.
62. Palmer, T.D., Lewis, J., Zijlstra, A. (2011): Quantitative analysis of cancer metastasis using an avian embryo model. *J Vis Exp*,
63. Paulsen, F.P., Woon, C.-W., Varoga, D., Jansen, A., Garreis, F., Jäger, K., Amm, M., Podolsky, D.K., Steven, P., Barker, N.P., Sel, S. (2008): Intestinal trefoil factor/TFF3 promotes re-epithelialization of corneal wounds. *J Biol Chem* 283, 13418-13427.
64. Paunel-Görgülü, A.N., Franke, A.G., Paulsen, F.P., Dünker, N. (2011): Trefoil factor family peptide 2 acts pro-proliferative and pro-apoptotic in the murine retina. *Histochem Cell Biol* 135, 461-473.
65. Perry, J.K., Kannan, N., Grandison, P.M., Mitchell, M.D., Lobie, P.E. (2008): Are trefoil factors oncogenic? *Trends Endocrinol Metab* 19, 74-81.
66. Philippeit, C., Busch, M., Dunker, N. (2014): Epigenetic control of trefoil factor family (TFF) peptide expression in human retinoblastoma cell lines. *Cell Physiol Biochem* 34, 1001-1014.
67. Playford, R.J., Marchbank, T., Goodlad, R.A., Chinery, R.A., Poulson, R., Hanby, A.M. (1996): Transgenic mice that overexpress the human trefoil peptide pS2 have an increased resistance to intestinal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2137-2142.
68. Poulson, R., Hanby, A.M., Lalani, E., Hauser, F., Hoffmann, W., Stamp, G.W.H. (1997): Intestinal trefoil factor (TFF 3) and pS2 (TFF 1), but not spasmolytic polypeptide (TFF 2) mRNAs are co-expressed in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast epithelium. *J Pathol* 183, 30-38.
69. Prest, S.J., May, F.E.B., Westley, B.R. (2002): The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells. *FASEB J* 16, 592-594.
70. Pritchard, E.M., Dyer, M.A., Guy, R.K. (2016): Progress in Small Molecule Therapeutics for the Treatment of Retinoblastoma. *Mini Rev Med Chem* 16, 430-454.
71. Regalo, G., Wright, N.A., Machado, J.C. (2005): Trefoil factors: From ulceration to neoplasia. *Cell Mol Life Sci* 62, 2910-2915.
72. Ribieras, S., Tomasetto, C., Rio, M.-C. (1998): The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1378, F61-F77.
73. Rodrigues, S., Rodrigue, C.M., Attoub, S., Fléjou, J.F., Bruyneel, E., Bracke, M., Emami, S., Gespach, C. (2006): Induction of the adenoma-carcinoma progression and Cdc25A-B phosphatases by the trefoil factor TFF1 in human colon epithelial cells. *Oncogene* 25, 6628-6636.
74. Rushlow, D.E., Mol, B.M., Kennett, J.Y., Yee, S., Pajovic, S., Thériault, B.L., Prigoda-Lee, N.L., Spencer, C., Dimaras, H., Corson, T.W., Pang, R., Massey, C., Godbout, R., Jiang, Z., Zacksenhaus, E., Paton, K., Moll, A.C., Houdayer, C., Raizis, A., Halliday, W., Lam, W.L., Boutros, P.C., Lohmann, D., Dorsman, J.C., Gallie, B.L. (2013): Characterisation of retinoblastomas without RB1 mutations: Genomic, gene expression, and clinical studies. *Lancet Oncol* 14, 327-334.
75. Seib, T., Blin, N., Hilgert, K., Seifert, M., Theisinger, B., Engel, M., Dooley, S., Zang, K.D., Welter, C. (1997): The three human trefoil genes TFF1, TFF2, and TFF3 are located within a region of 55 kb on chromosome 21q22.3. *Genomics* 40, 200-202.
76. Sitorus, R.S., Gumay, S., van der Valk, P. (2009): The apoptotic paradox in retinoblastoma. *Ann N Y Acad Sci* 1171, 77-86.

77. 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. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
78. Soliman, S.E., Racher, H., Zhang, C., MacDonald, H., Gallie, B.L. (2017): Genetics and Molecular Diagnostics in Retinoblastoma—An Update. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)* 6, 197-207.
79. Soutto, M., Peng, D., Katsha, A., Chen, Z., Piazuolo, M.B., Washington, M.K., Belkhiri, A., Correa, P., El-Rifai, W. (2015): Activation of β -catenin signalling by TFF1 loss promotes cell proliferation and gastric tumorigenesis. *Gut* 64, 1028-1039.
80. Spruck, C., Sun, D., Fiegl, H., Marth, C., Mueller-Holzner, E., Goebel, G., Widschwendter, M., Reed, S.I. (2006): Detection of low molecular weight derivatives of cyclin E1 is a function of cyclin E1 protein levels in breast cancer. *Cancer Res* 66, 7355-7360.
81. Stegmeier, F., Hu, G., Rickles, R.J., Hannon, G.J., Elledge, S.J. (2005): A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13212-13217.
82. Taupin, D., Pedersen, J., Familiari, M., Cook, G., Yeomans, N., Giraud, A.S. (2001): Augmented intestinal trefoil factor (TFF3) and loss of pS2 (TFF1) expression precedes metaplastic differentiation of gastric epithelium. *Lab Invest* 81, 397-408.
83. Taupin, D., Podolsky, D.K. (2003): Trefoil factors: Initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 721-732.
84. Taupin, D., Wu, D.C., Jeon, W.K., Devaney, K., Wang, T.C., Podolsky, D.K. (1999): The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor- and MAP kinase-dependent interregulation. *J Clin Invest* 103, R31-R38.
85. Temming, P., Arendt, M., Viehmann, A., Eisele, L., Le Guin, C.H.D., Schündeln, M.M., Biewald, E., Astrahantseff, K., Wieland, R., Bornfeld, N., Sauerwein, W., Eggert, A., Jöckel, K.-H., Lohmann, D.R. (2017): Incidence of second cancers after radiotherapy and systemic chemotherapy in heritable retinoblastoma survivors: A report from the German reference center. *Pediatr Blood Cancer* 64, 71-80.
86. Temming, P., Arendt, M., Viehmann, A., Eisele, L., Le Guin, C.H.D., Schündeln, M.M., Biewald, E., Mäusert, J., Wieland, R., Bornfeld, N., Sauerwein, W., Eggert, A., Lohmann, D.R., Jöckel, K.-H. (2016): How Eye-Preserving Therapy Affects Long-Term Overall Survival in Heritable Retinoblastoma Survivors. *J Clin Oncol* 34, 3183-3188.
87. Thim, L. (1989): A new family of growth factor-like peptides 'Trefoil' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett* 250, 85-90.
88. Tomasetto, C., Masson, R., Linares, J.-L., Wendling, C., Lefebvre, O., Chenard, M.-P., Rio, M.-C. (2000): pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins. *Gastroenterology* 118, 70-80.
89. Tomasetto, C., Rockel, N., Mattei, M.G., Fujita, R., Rio, M.C. (1992): The gene encoding the human spasmolytic protein (SML1hSP) is in 21q 22.3, physically linked to the homologous breast cancer marker gene BCE1pS2. *Genomics* 13, 1328-1330.
90. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.

91. Villegas, V.M., Hess, D.J., Wildner, A., Gold, A.S., Murray, T.G. (2013): Retinoblastoma. *Curr Opin Ophthalmol* 24, 581-588.
92. Weise, A., Dünker, N. (2013): High trefoil factor 1 (TFF1) expression in human retinoblastoma cells correlates with low growth kinetics, increased cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor levels and a selective down-regulation of CDK6. *Histochem Cell Biol* 139, 323-338.
93. Wright, N., Hoffmann, W., Otto, W., Rio, M.-C., Thim, L. (1997): Rolling in the clover: Trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett* 408, 121-123.
94. Xu, X.L., Singh, H.P., Wang, L., Qi, D.-L., Poulos, B.K., Abramson, D.H., Jhanwar, S.C., Cobrinik, D. (2014): Rb suppresses human cone-precursor-derived retinoblastoma tumours. *Nature* 514, 385-388.
95. Yi, J., Ren, L., Li, D., Wu, J., Li, W., Du, G., Wang, J. (2020): Trefoil factor 1 (TFF1) is a potential prognostic biomarker with functional significance in breast cancers. *Biomed Pharmacother* 124, 109827.
96. Yiallourous, M. (2016): Retinoblastom (Kurzinformation). Online-Publikation; https://www.gpoh.de/kinderkrebsinfo/content/erkrankungen/weitere_solide_tumoren/pohretino_patinfo120120611/index_ger.html; Stand 04.04.2016.
97. Yio, X., Diamond, M., Zhang, J.-Y., Weinstein, H., Wang, L.-H., Werther, L., Itzkowitz, S. (2006): Trefoil factor family-1 mutations enhance gastric cancer cell invasion through distinct signaling pathways. *Gastroenterology* 130, 1696-1706.
98. Yusufu, A., Shayimu, P., Tuerdi, R., Fang, C., Wang, F., Wang, H. (2019): TFF3 and TFF1 expression levels are elevated in colorectal cancer and promote the malignant behavior of colon cancer by activating the EMT process. *Int J Oncol* 55, 789-804.
99. Zijlstra, A., Mellor, R., Panzarella, G., Aimes, R.T., Hooper, J.D., Marchenko, N.D., Quigley, J.P. (2002): A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. *Cancer Res* 62, 7083-7092.

7 ANHANG

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Leukokorie	11
Abbildung 2.1: Exemplarische Aufnahme einer BrdU-Färbung	46
Abbildung 2.2: Exemplarische Aufnahme einer DAPI-Färbung	47
Abbildung 2.3: Durchführung des Spontan-Metastasen-Modells	51
Abbildung 2.4: Durchführung des Experimentelle-Metastasen-Modells	53
Abbildung 2.5: Präparation im Rahmen des CAM Assays	53
Abbildung 2.6.: Ermittlung einer Standardkurve zur absoluten Quantifizierung mittels <i>Realtime</i> RT-PCR	54
Abbildung 3.1: Zelllinien RBL-30, WERI-Rb1 und RBL-13	58
Abbildung 3.2: Endogene <i>TFF1</i> Expression von verschiedenen RB-Zelllinien	58
Abbildung 3.3: <i>TFF1</i> Expression nach lentiviralem Knockdown mit verschiedenen sh-Klonen	60
Abbildung 3.4: Nachweis des erfolgreichen <i>TFF1</i> Knockdowns auf RNA-Ebene mittels <i>Realtime</i> RT-PCR	61
Abbildung 3.5: Nachweis des erfolgreichen <i>TFF1</i> Knockdowns auf Protein-Ebene mittels Western Blot	61
Abbildung 3.6: Einfluss von <i>TFF1</i> KD auf die Zellviabilität in den Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1	62
Abbildung 3.7: Wachstumskurven der Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 nach lentiviraler Transduktion	63
Abbildung 3.8: Einfluss von <i>TFF1</i> KD auf die Proliferationsrate der Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1	64
Abbildung 3.9: Untersuchung des Einflusses von <i>TFF1</i> KD auf die Apoptose in den Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 mittels DAPI Assay und Caspase-Inhibition	65
Abbildung 3.10: Einfluss von <i>TFF1</i> KD auf aktivierte Caspase-3 in den Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 sowie aktivierte Caspase-7 in der Zelllinie RBL-30	66
Abbildung 3.11: Untersuchung der Caspase-Abhängigkeit der endogenen Apoptose in der Zelllinie RBL-30	67
Abbildung 3.12: Fotodokumentation des Einflusses von <i>TFF1</i> KD auf Zellkontakt-unabhängiges Wachstum in den Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 mittels Soft Agarose Assay	68
Abbildung 3.13: Einfluss von <i>TFF1</i> KD auf die Koloniebildungsrate der Zelllinien RBL-30 und WERI-Rb1 im Soft Agarose Assay	68

Abbildung 3.14: Einfluss von <i>TFF1</i> KD auf die Tumorbildung <i>in ovo</i> und die Tumorbildungsrate der Zelllinie WERI-Rb1 im CAM Assay	69
Abbildung 3.15: HE- und DAPI-Färbung von Kryoschnitten von CAM Kontroll-Tumoren der Zelllinie WERI-Rb1	71
Abbildung 3.16: HE- und DAPI-Färbung von Kryoschnitten von CAM Tumoren nach Inokulation von WERI-Rb1 <i>TFF1</i> Knockdown Zellen.....	72
Abbildung 3.17: Untersuchung des Einflusses von <i>TFF1</i> KD auf die Zellmigration von WERI-Rb1 Zellen im CAM Assay.....	74
Abbildung 3.18: Analyse des Gehalts an humanen RB-Zellen in CAM-Stanzen der Zelllinie WERI-Rb1 mittels <i>Realtime</i> RT-PCR gegen humanes <i>GAPDH</i> (<i>hGAPDH</i>)	74

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien	22
Tabelle 2: Zellkulturmedien	22
Tabelle 3: Bakterienkulturmedien.....	23
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien.....	23
Tabelle 5: Basispuffer	26
Tabelle 6: Antikörper.....	26
Tabelle 7: Kommerzielle Kits.....	27
Tabelle 8: TaqMan® Gene Expression Assays	27
Tabelle 9: Plasmid-Vektoren	27
Tabelle 10: shRNA Plasmide für den lentiviralen <i>TFF1</i> Knockdown.....	28
Tabelle 11: Geräte	28
Tabelle 12: Software	30
Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien.....	30
Tabelle 14: Temperaturprogramm des <i>Realtime</i> PCR-Systems 7300, Zyklusanzahl 40 für Denaturierung und Hybridisierung.....	34
Tabelle 15: Zusammensetzung des RIPA-Puffers.....	36
Tabelle 16: Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel.....	38
Tabelle 17: Zusammensetzung der Puffer für die Gelelektrophorese.....	38
Tabelle 18: Zusammensetzung der Puffer für Western Blot	39
Tabelle 19: Zellkulturmedien Soft Agarose.....	49

7.3 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CAM	Chorioallantoismembran
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
C _T	<i>Threshold cycle</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt-destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>Et alteri</i>
FBS	Fetales bovines Serum
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitation
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEK-Zellen	<i>Human embryonic kidney-Zellen</i>
hGAPDH	Humane Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
ITF	<i>Intestinal trefoil factor</i> = TFF3
i.v.	intravenös
K	Kontrolle
KD	Knockdown
kDa	Kilodalton
LB	<i>Lysogeny broth</i>

mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
miRNA	Mikro RNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
ng	Nanogramm
NGS	<i>Normal goat serum</i>
nm	Nanometer
ns	Nicht signifikant
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRB	Retinoblastom-Protein
pSP	<i>Pancreatic spasmolytic polypeptide</i> = TFF2
pS2	<i>Breast cancer associated peptide</i> = TFF1
RB	Retinoblastom
<i>RB1</i>	Retinoblastom-Gen
RE	Relative Expression
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
rTFF1	Rekombinantes TFF1
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunde
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFF / <i>TFF</i>	<i>Trefoil factor family-Protein/ -Gen</i>
V	Volt
Vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
WST-1	<i>Water soluble tetrazolium-1</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
*	p < 0,05
**	p < 0,01
***	p < 0,001

8 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Nicole Dünker für die Möglichkeit danken, in Ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren und daran sowohl fachlich wie auch persönlich zu wachsen. Vielen Dank für das spannende Thema und die anhaltende Unterstützung auf allen Ebenen: Engagierte Betreuung, konstruktive Kritik und auch Verständnis für die Herausforderungen, die sich aus der Kombination des Medizinstudiums mit der Forschungsarbeit ergeben.

Außerdem möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen unserer Arbeitsgruppe für die schöne gemeinsame Zeit herzlich bedanken.

Hier möchte ich Frau PD Dr. Maike Busch besonders hervorheben: Danke für Deine große Hilfsbereitschaft, die Einarbeitung in die Labortätigkeiten, das geduldige Beantworten aller Fragen, sowie Deine stets konstruktive Kritik und ermutigenden Worte.

Ein großes Danke möchte ich außerdem Dr. med. Jan Große-Kreul aussprechen: Geteiltes Leid ist halbes Leid – das lässt sich auch auf viele lange Tage im Labor beziehen! Danke für die gemeinsame Zeit und die gegenseitige Unterstützung bei der Laborarbeit.

Zudem gilt mein Dank Dagmar Gioé für die Unterstützung bei der Auswertung der zahlreichen Immunfluoreszenz-Färbungen sowie bei allen organisatorischen Fallstricken, wie auch Ursula Gerster und Ulrike Laub für die Unterstützung im Laboralltag.

Herrn Dr. Stephan aus der Kinderklinik des Universitätsklinikums Essen möchte ich für die Bereitstellung der Retinoblastomzelllinien danken, sowie Herrn Prof. Dr. med. Fandrey für die Möglichkeit der Nutzung der Fluoreszenzmikroskope.

Für die finanzielle Unterstützung im Sinne einer Anstellung als Studentische Hilfskraft im Institut für Anatomie II (Neuroanatomie) danke ich dem Habilitandinnen-Programm der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt haben, zuerst das Medizinstudium zu meistern und darüber hinaus diese Dissertation abzuschließen. Ein besonders großes DANKE geht dabei an meinen Mann Denis, der mich immer uneingeschränkt unterstützt und mir stets den Rücken freigehalten hat. Dank Dir habe ich die arbeitsreichen Phasen der letzten Jahre erfolgreich durchgestanden und ich freue mich darauf, auch alle zukünftigen Herausforderungen gemeinsam mit Dir zu meistern.

9 LEBENSLAUF

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