

## 5 Diskussion

TFF („*trefoil factor*“)-Peptide repräsentieren eine Familie von kleinen, sekretorischen Polypeptiden. Die verschiedenen Mitglieder dieser Polypeptid-Familie werden vor allem im Gastrointestinaltrakt exprimiert und apikal sezerniert, wo sie eine protektive und kurative Wirkung ausüben (Taupin and Podolsky, 2003). Im Rahmen ihrer protektiven Funktion stabilisieren TFF-Peptide in mucinösen Epithelien die apikale Mucinschicht (Kindon et al., 1995). So weiß man beispielsweise, dass die Überexpression von TFF3 die Mucosa vor dem Einfluß von schädlichen Substanzen bewahrt (Wong et al., 1999). In *in vivo* und *in vitro* Studien wurde gezeigt, dass alle drei humanen TFF-Peptide Zellwanderungsprozesse während der epithelialen Restitution stimulieren und damit die Wundheilung beschleunigen (Wong et al., 1999). Neben ihrer motogenen Eigenschaften wirken TFF-Peptide zudem antiapoptotisch und modulieren entzündliche Prozesse. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass TFF-Peptide zu einer Erhöhung des transepithelialen Widerstands beitragen (Marchbank et al., 2001). Der transepitheliale Widerstand kann als Maß für die Dichtigkeit der Barriere gegen das Eindringen potentiell schädlicher luminaler Substanzen angesehen werden. Insofern könnte die durch TFF-Peptide hervorgerufene Erhöhung des transepithelialen Widerstandes deren epitheliale Schutzwirkung teilweise erklären. Generell sind TFF-Peptide somit auf mehrfache Weise an der Aufrechterhaltung der Oberflächenintegrität mucöser Epithelien beteiligt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist noch weitgehend ungeklärt, über welche Mechanismen die TFF-Peptide einerseits in gesunden Epithelien eine stabilisierende und schützende Wirkung auf mucinöse Epithelien ausüben und andererseits in verletzten, entzündeten sowie in tumorösen Geweben Wanderungsprozesse epithelialer Zellen beschleunigen (Taupin and Podolsky, 2003).

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß von hTFF3 auf epitheliale Zell-Zellkontakte untersucht werden. In einem ersten Schritt wurden durch stabile Transfektion von HT29/B6 Zellen und MDCK Zellen mit FLAG-getagtem hTFF3 zwei Zellsysteme etabliert, die nach eingehender Charakterisierung die typischen Merkmale von TFF3-behandelten Zellen aufweisen: i) FLAG-hTFF3-transfizierte Zellen zeigten ein verstärktes Migrationsverhalten. Der hierfür etablierte *Gap-filling* Assay zeigte, dass die stabilen FLAG-hTFF3 Klone um ein Vielfaches schneller in die zellfreien Bereiche einwandern als die mit dem Leerplasmid transfizierten Kontrollzellen. Auch zeigte sich hierbei, dass die Zellen im Bereich der Wanderungsfront morphologische Veränderungen aufwiesen: Während FLAG-hTFF3-transfizierte Zellen vermehrt getrennt voneinander wanderten, bewegten sich die mit Leerplasmid-transfizierten HT29/B6 Zellen als einheitliche Zellfront. Dabei konnte man bei den FLAG-hTFF3-

transfizierten HT29/B6 Klonen beobachten, wie sich deren Morphologie von einem epithelialen hin zu einem mehr spindelförmigen, mesenchymalen Phänotyp veränderte. Diese Veränderungen traten besonders bei dem schneller migrierenden FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Klon 17 auf. ii) In Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Befunden (Taupin and Podolsky, 2003) konnte keine Veränderung in der Zellproliferation festgestellt werden. Einhergehend mit der erhöhten Motilität zeigten die FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen deutliche Unterschiede in der Struktur ihres Aktincytoskeletts. So konnte Aktin im Bereich der *Adherens Junctions* von FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 und MDCK Zellen vermindert nachgewiesen werden. Zudem wurde bei den FLAG-hTFF3-transfizierten MDCK Klonen eine vermehrte Bildung von Aktin-Streßfasern beobachtet.

Sowohl bei den HT29/B6 als auch bei den MDCK Zellen zeigte sich, dass der Gehalt an E-Cadherin und an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin in den hTFF3-transfizierten Zellen reduziert ist. Der teilweise Verlust des E-Cadherin/Catenin-Komplexes bestätigte sich auch in immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen.

In dieser Arbeit wurden spezielles Augenmerk auf zwei Regulationsmechanismen gelegt, die zum Verlust der E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion führen können: i) Die Verringerung der E-Cadherin Gentranskription und ii) der Verlust von funktionellem E-Cadherin Protein an Zell-Zellkontakten.

Multiplex- und *Real-Time*-RT-PCR Analysen zeigten, dass in FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen um 30 % verringerte E-Cadherin mRNA-Mengen vorliegen. Verschiedene Mechanismen können zur transkriptionellen Repression des *E-Cadherin* Gens beitragen. In einer Vielzahl von Tumoren oder Tumor abgeleiteten Zelllinien wurde eine Methylierung des E-Cadherin Promotors nachgewiesen, die zur Repression der Transkription des E-Cadherin Gens führt (Wheeler et al., 2001). Die Analyse mittels methylierungsspezifischer PCR für zwei im E-Cadherin Promotor bekannte Methylierungssequenzen (Herman et al., 1996; Kato et al., 2002) zeigte keine Veränderungen im Methylierungsmuster zwischen Leervektor- und FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen. Daraus ist zu schließen, dass eine Promotormethylierung offensichtlich nicht an der TFF3-induzierten Repression der E-Cadherin Transkription beteiligt ist. Somit deuten diese Ergebnisse eher darauf hin, dass die Reduktion der *E-Cadherin* Expression durch Transkriptionsfaktoren verursacht wird, die reprimierend auf den E-Cadherin Promotor wirken. Um zu untersuchen, ob die durch TFF3 induzierte transkriptionelle Inaktivierung des *E-Cadherin* Promotors durch Transkriptionsfaktoren reguliert wird, wurde die Expression der *E-Cadherin* Repressoren Snail-1, Slug, SIP1 und E12/E47 mittels RT-PCR analysiert. Hieraus ergaben sich jedoch keine

signifikanten Unterschiede in den mRNA-Gehalten dieser untersuchten Transkriptionsrepressoren. Es muß daher in zukünftigen Untersuchungen geprüft werden, ob die Stabilität und/oder die Aktivität dieser Repressoren ihrerseits durch posttranskriptionale oder posttranslationale Mechanismen reguliert werden oder ob TFF3-Peptide über weitere, noch unbekannte Mechanismen verfügen, welche die transkriptionale Repression von *E-Cadherin* herbeiführen können. Zur Zeit ist die sehr komplexe Regulation der *E-Cadherin* Expression noch nicht vollständig verstanden. Dies zeigt beispielsweise auch der erst kürzlich erhobene Befund, dass der  $\beta$ -Catenin/Lef-1 Transkriptionskomplex die transkriptionale Reduktion von *E-Cadherin* verursachen kann (Jamora et al., 2003).

In Brusttumorzellen zeigte sich, dass ein Estrogenrezeptor (ER)-abhängiger Signalweg zur Aktivierung von MTA3 führen kann. MTA3 ist eine Komponente des Mi-2NuRD Chromatinremodelling-Komplexes, die an der transkriptionalen Repression von *Snail* involviert ist. Einerseits führt der Funktionsverlust dieses Signalweges in ER-negativen Brusttumoren zu einer transkriptionalen Aktivierung von *Snail* und folglich zu einer Herabregulation von *E-Cadherin* (Fujita et al., 2003). Andererseits konnte man in Estrogenrezeptor-positiven Brustzellen die Expression von TFF-Peptiden nachweisen und zudem zeigen, dass die Expressionregulation der TFF-Peptide in einer Estrogen-abhängigen Weise erfolgt (Campbell-Thompson, 1997; Prest et al., 2002; Rio et al., 1988; Theisinger et al., 1996). Entsprechend der in meiner Arbeit gemachten Beobachtungen konnte eine Estrogen-induzierte TFF-Expression in analoger Weise zu einer Herabregulation von E-Cadherin führen. Solange ungeklärt ist, ob eine Wechselwirkung zwischen TFF-induzierten Signalwegen und dem ER-MTA Signalweg vorliegt, bleibt der Mechanismus dieser offensichtlich widersprüchlichen Beobachtungen unverstanden.

Neben der transkriptionalen Regulation musste angenommen werden, dass der E-Cadherin Gehalt durch posttranskriptionale Mechanismen moduliert wird. Ein regulierter Verlust von funktionellem E-Cadherin im Bereich der Zell-Zellkontakte ermöglicht es Zellen, spezifisch und unmittelbar auf Veränderungen ihrer zellulären Umgebung zu reagieren. Dies kann man beispielsweise nach Gewebeverletzungen beobachten, wenn Zellen an den Rändern von den verwundeten Bereichen ihre Zellkontakte vermindern, um den Gewebedefekt zu schließen. Die proteolytische Inaktivierung oder Zerstörung des E-Cadherin/Catenin-Komplexes mag einer der ersten Schritte bei diesem vielschichtigen Prozeß sein. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Pulse-Chase-Experimente zeigen, dass in den FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen die Halbwertszeit von E-Cadherin deutlich reduziert und folglich der proteolytische Abbau erhöht sein

muß. Ursache der gesteigerten Degradation könnte eine erhöhte Endozytose oder eine Abspaltung der extrazellulären Domäne von E-Cadherin sein mit der Folge der Verminderung von E-Cadherin an der Zelloberfläche.

Wenig ist über die Signalwege bekannt, die die Destabilisierung von E-Cadherin vermitteln. Es gibt Hinweise, dass die Tyrosinphosphorylierung von Komponenten des E-Cadherin/Catenin-Adhäsionskomplexes hieran beteiligt ist. Die Assoziation des Cadherin/Catenin-Komplexes mit Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Hoschuetzky et al., 1994; Ochiai et al., 1994) und Rezeptor-Tyrosin-Phosphatasen (Brady-Kalnay and Tonks, 1995; Fuchs et al., 1996; Muller et al., 1999) sprechen für ein solches Regulationsmodell. Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Tyrosin-Phosphorylierung von E-Cadherin zu einer Ubiquitinierung, zur vermehrten Endozytose und zu einer reduzierten E-Cadherin-Halbwertszeit führen kann (Fujita et al., 2002). Die Tyrosin-Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin unter dem Einfluß von EGF, HGF oder TGF $\alpha$  führt zu einer Destabilisierung des Cadherin/Catenin-Komplexes und zur Unterbrechung der Assoziation des Cadherin/Catenin-Komplexes mit dem Aktcytoskelett. In ähnlicher Weise mag eine Phosphorylierung von E-Cadherin unter dem Einfluß von TFF3 (Liu et al., 1997) zu einer gestörten E-Cadherin-Funktion beitragen. In diesem Zusammenhang wurde berichtet, dass eine Tyrosin-Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin nach TFF3-Behandlung die Assoziation von  $\beta$ -Catenin mit dem EGF-Rezeptor verstärkt (Liu et al., 1997). Kürzlich erschienene Berichte zeigen jedoch, dass die TFF3-induzierten proinvasiven Signalwege EGFR-unabhängig sind (Rodrigues et al., 2003a). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Inaktivierung der adhäsiven Funktion von E-Cadherin durch proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne bei der Herabregulierung von E-Cadherin beteiligt ist. In Zellkultur-Überständen von FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen konnte mittels Immunpräzipitation jedoch keine extrazellulären E-Cadherin-Fragmente nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Neben ihrer reparativen Wirkung schützen TFF-Peptide mucinöse Epithelien auch vor Schädigungen durch exogene Noxen. So waren TFF-Peptide in experimentellen Modellen in der Lage, Gewebeschädigungen durch Salzsäure, Essigsäure oder Indomethacin zu vermeiden bzw. das Ausmaß von Läsionen zu vermindern. Der Mechanismus, über den TFF-Peptide diese protektiven Effekte vermitteln, ist noch weitgehend unbekannt. Neben einer vermuteten Vernetzung der Mucine mit TFF-Peptiden ist bekannt, dass zumindest TFF3 auf polarisierte, epitheliale Zellverbände vorwiegend bei basaler, nicht jedoch bei apikaler Applikation wirken (Playford et al., 1995), was für einen indirekt über Rezeptoren vermittelten Weg spricht. Zudem korreliert der erhöhte Gewebeschutz vor schädlichen Substanzen mit einem erhöhten

elektrischen Widerstand (Marchbank et al., 2001). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig untersucht, ob die Funktionalität der *Tight Junctions* durch die Wirkung von TFF3 moduliert wird. Es wurde der zelluläre Gehalt verschiedener *Tight Junctions* Proteine in den FLAG-hTFF3- und Leerplasmid-transfizierten HT29/B6 und MDCK Zellen bestimmt und miteinander verglichen. Es zeigte sich in Western Blot-Analysen, dass sich die Mengen an Claudin-1, Occludin sowie von ZO-1 und ZO-2 in FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen im Vergleich zu dem Gehalt in entsprechenden Kontrollzellen nicht signifikant unterscheiden. Im Gegensatz dazu wurde eine deutliche Reduktion des Claudin-2 Gehalts in den FLAG-hTFF3-transfizierten Klonen beobachtet. Anschließende Immunfluoreszenz-Untersuchungen bestätigten diese Befunde. Dieses Ergebnis ist von besonderem Interesse, da beobachtet wurde, dass eine verminderte *Claudin-2* Expression in MDCK Zellen oftmals mit der Ausbildung eines erhöhten transepithelialen Widerstands (TER) einhergeht (Amasheh et al., 2002; Furuse et al., 2001). Es wird vermutet, dass Claudin-2 an der Bildung von parazellulären Kanälen („Poren“) beteiligt ist (Tsukita and Furuse, 2000). Somit könnte die durch hTFF3 bewirkte Erhöhung des transepithelialen Widerstands eine Folge der reduzierten Claudin-2 Expression darstellen. Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass eine EGF-induzierte Aktivierung des EGFR zu einer Erhöhung des transepithelialen Widerstands führt (Singh and Harris, 2003). In dieser Arbeit zeigte sich erneut, dass der erhöhte transepitheliale Widerstand mit der Reduktion der Claudin-2 Expression korreliert. In weitergehenden Untersuchungen muß daher analysiert werden, ob die in der Literatur beschriebene durch TFF3 induzierte Aktivierung des EGFR neben der Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin auch die Claudin-2 Expression beeinflusst.

RT-PCR Analysen zeigten, dass die reduzierte Expression von Claudin-2 zumindest zum Teil auf einer verringerten Transkription von *Claudin-2* beruht. Interessanterweise konnte man bei den FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Klonen eine unterschiedlich starke Claudin-2 Reduktion beobachten. Wie schon in den vorherigen *Gap-Filling*-Assays sowie bei den Analysen des Cadherin/Catenin-Komplexes zeigte sich bei dem Klon 17 eine deutliche Verminderung des zellulären Claudin-2-Gehalts, während sie im Klon 3 nur moderat ausgeprägt war.

Letztlich könnte die durch hTFF3 hervorgerufene Transaktivierung des EGFR somit einerseits motogen Effekte über die Modulation des Cadherin/Catenin-Komplexes herbeiführen und andererseits über die Modulation der *Tight Junctions* deren Integrität und Funktion beeinflussen.