

7 Zusammenfassung

TFF-Peptide (TFF1-3) repräsentieren eine Familie von kleinen Polypeptiden, die eine charakteristische kleeblattähnliche Sekundärstruktur aufweisen. Diese konstitutiv in mucösen Epithelien exprimierten Peptide stabilisieren und schützen einerseits die extrazelluläre Mucusschicht. Andererseits wirken sie während epithelialer Restitutionsprozesse nach einer Verwundung oder während Endzündungsprozessen als motogene Faktoren. Im Gegensatz zu diesen vorteilhaften Wirkungen wurde auch eine pathogene Wirkung der TFF-Peptide beschrieben, die in Tumoren zu fehlgesteuerten Wanderungen von Zellen führen können. Während all dieser Prozesse erfolgt die Modulation von Zell-Zellkontakten. Das spezielle Interesse dieser Arbeit lag auf der Untersuchung epithelialer Zell-Zellkontakte unter dem Einfluß von hTFF3. Es wurde der E-Cadherin/Catenin-Adhäsionskomplex sowie der Gehalt von *Tight Junctions*-Komponenten in FLAG-hTFF3-transfizierten und entsprechenden Leerplasmid-transfizierten Epithelzellen analysiert.

- Dazu wurden zwei polare, epitheliale Zelllinien (HT29/B6 und MDCK) stabil mit FLAG-getagtem hTFF3 transfiziert.
- Um zu überprüfen, ob das FLAG-getagte hTFF3 funktionell aktiv ist, wurde zunächst das Migrationsverhalten der stabil transfizierten HT29/B6 Klone analysiert. In Migrationsassays zeigte sich, dass die FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Klone schneller wandern als die entsprechenden Kontrollzellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Zellmotilität nicht mit einer erhöhten Zellproliferation einhergeht.
- Western Blot Analysen ergaben, dass der zelluläre Gehalt an E-Cadherin sowie an α - und β -Catenin in den FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen vermindert ist. Diese Beobachtung konnte anhand von Immunfluoreszenz-Untersuchungen bestätigt werden. Desweiteren traten in den FLAG-hTFF3-transfizierten Zellklonen vermehrt Umlagerungen im Aktincytoskelett auf.
- Die Reduktion des E-Cadherin Gehalts beruht teilweise auch auf einer verminderten transkriptionellen Expressionsrate von E-Cadherin. So zeigten sich bei Multiplex RT-PCR- und *Real-Time* RT-PCR-Analysen, dass der E-Cadherin mRNA-Gehalt in FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen deutlich reduziert ist. Methylierungsspezifische PCRs gaben keine Hinweise auf ein verändertes Methylierungsmuster im Bereich des E-Cadherin Promotors. Auch bei der RT-PCR-Analyse von Snail-1, Slug, SIP-1 und E12/E47 konnte nicht festgestellt

werden, dass unter dem Einfluß von hTFF3 die Expression dieser als *E-Cadherin* Repressoren wirkenden Transkriptionsfaktoren verändert ist.

- Desweiteren wurde eine mögliche posttranskriptionale Ursache des verminderten E-Cadherin-Gehalts untersucht. Aus *Pulse-Chase* Experimenten ergab sich zudem, dass in den FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen die Halbwertszeit von E-Cadherin von 7,9 h auf 3,7 h verringert wird, als Zeichen einer gesteigerten proteolytischen Degradation.
- Bei Western Blot und Immunfluoreszenz-Analysen von *Tight Junction* Proteinen wurde in den FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen ein vermindertes Gehalt an Claudin-2 nachgewiesen. RT-PCR-Untersuchungen zeigten, dass die Reduktion des zellulären Claudin-2 Gehalts mit einer verminderten Claudin-2 Transkription einhergeht.

Somit konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass in Epithelzellen die Wirkung von TFF3 auf den E-Cadherin/Catenin-Komplex sowohl über transkriptionelle als auch über posttranskriptionelle Regulationsmechanismen erfolgt. Zudem konnte mit der transkriptionellen Herabregulation von *Claudin-2* erstmalig gezeigt werden, dass TFF3 auch einen Einfluß auf die *Tight Junctions* ausübt. Diese koordinierte Modulation der *Adherens Junctions* und der *Tight Junctions* spiegelt die wichtige Bedeutung von TFF3 für die Gewebeprotektion, die Wundheilung und die epithelialen Restitution sowie die Induktion des invasiven Zellwachstums von Tumorzellen wider.