

1 Einleitung

1.1 Epithelien

Epithelien (inklusive Endothelien) sind Gewebe, die innere und äußere Oberflächen des Organismus auskleiden. Der Name Epithel leitet sich aus dem griechischen *epi* (über) und *thele* (Brustwarze) ab. Das Epithel ist neben Muskel-, Nerven- und Bindegewebe eine der vier Grundgewebetypen.

Zu den Eigenschaften von Epithelien zählt, dass die Zellen meist dicht beieinander liegen und reich an Zell-Zell-Kontakten sind. Demzufolge besitzen epitheliale Gewebe nur kleine Interzellularräume. Epithelien sind klar vom Bindegewebe getrennt und besitzen keine Blutgefäße. Eine weitere, allen Epithelzellen gemeinsame Eigenschaft ist ihre Polarität. Sie besitzen eine – funktionell betrachtet – apikale Seite, die der Umwelt (z.B. bei der Haut) oder dem Lumen (z.B. beim Darm) zugewandt ist, und eine basolaterale Seite, die über eine Basallamina mit dem darunterliegenden Gewebe verbunden ist. Die Notwendigkeit dieser Polarität ist in den diversen strukturellen und funktionellen Anforderungen begründet, welche die Epithelien erfüllen müssen. Das Epithel bildet eine Barriere, die vor mechanischer Schädigung schützt. Es verhindert das Eindringen von Mikroorganismen, grenzt die verschiedenen inneren Flüssigkeitsräume voneinander ab und sein polarer Aufbau ermöglicht die spezifische Resorption bzw. Sekretion von Wasser und Soluten. Der Transport durch Epithelien hindurch von der funktionellen Außenseite ins Interstitium wird als Resorption und in umgekehrter Richtung als Sekretion bezeichnet. Die hierfür am transmembranalen Transport beteiligten Proteine sind asymmetrisch in der apikalen und basolateralen Zellmembran verteilt. Im Hinblick auf ihre Funktionsweise lassen sich die Transportproteine in Kanäle und Carrier (inklusive ATPasen) unterteilen. Kanäle und Carrier sind integrale Membran-Proteine, die zumeist eine hohe Spezifität für den Transport einzelner Substanzen oder Gruppen ähnlicher Substanzen besitzen. Während Kanäle im geöffneten Zustand ohne weitere Konformationsänderung Solute bzw. Wasser mit hoher Geschwindigkeit passieren lassen, durchlaufen Carrier eine Änderung ihrer Konformation bei jeder Aufnahme und Abgabe der transportierten Teilchen. Der transepitheliale Transport erfolgt auf zwei möglichen Wegen. Der transzelluläre Weg führt hierbei durch die apikale und basolaterale Membran der

Epithelzellen, der parazelluläre Weg führt durch die Tight junction und die gesamte Länge des Interzellularspalts.

Die lateralen Membranen benachbarter Zellen begrenzen den Interzellularspalt und sind durch insgesamt vier Gruppen von Zellverbindungen miteinander verknüpft: die Tight junction, die Adherens junction, die Desmosomen und die Gap junction. Die Tight junction und die Adherens junction werden häufig unter dem Begriff des Junctional complex oder Schlussleistenkomplex zusammengefasst.

1.2 Zell-Zell-Kontakte

Die Einteilung der Zellverbindungen in vier Gruppen erfolgt aufgrund ihrer speziellen Funktionen, auf die nun näher eingegangen werden soll.

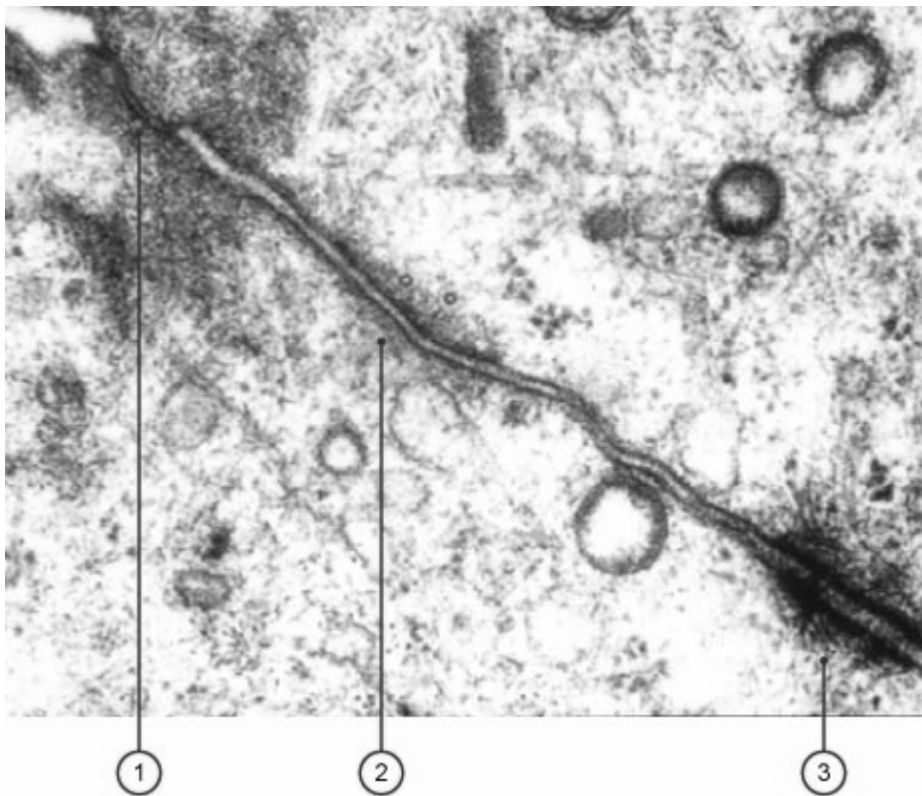


Abbildung 1 Zell-Zell-Kontakte

Elektronenmikroskopische Aufnahme des Interzellularen Spaltes, sowie der Zell-Zell-Kontakte zwischen zwei Epithelzellen. **1** Tight junction, **2** Adherens junction, **3** Desmosom (Macula adhaerens)

Adherens junction (Zonula adhaerens) und Desmosomen (Macula adhaerens)

Haftverbindungen sind in den Geweben der Tiere weit verbreitet. Besonders häufig kommen sie in Geweben vor, die starker mechanischer Beanspruchung ausgesetzt sind, wie z.B. im Herzmuskel und im Hautepithel. Zur Gruppe der Haftverbindungen gehören die Adherens junction (*Zonula adhaerens*), die Desmosomen (*Macula adhaerens*) und die Hemidesmosomen. Die Adherens junction bildet in Epithelzellen einen durchgehenden Adhäsionsgürtel rund um die interagierenden Zellen des Epithels. Diese Zone befindet sich in der Nähe der apikalen Zellgrenze, unmittelbar unter der Tight junction (**Abb. 1**). Die *Zonula occludens* und die *Zonula adhaerens* werden häufig unter dem Begriff des Junctional complex (Schlussleistenkomplex, epitheliales Schlussleistennetz) zusammengefasst. Die Adhäsion zwischen benachbarten Epithelzellen erfolgt durch homophile Interaktion Ca^{2+} -abhängiger transmembranärer Verbindungsproteine, die man als Cadherine bezeichnet. Dimere dieser Cadherine interagieren mit Cadherin-Dimeren der Nachbarzelle und vermitteln so die Zell-Zell-Adhäsion. Die cytoplasmatischen Domänen der Cadherine binden an die submembranären Plaque-Proteine β -Catenin oder Plakoglobin (γ -Catenin), welche wiederum über α -Catenin mit dem Aktin-Cytoskelett verbunden sind (**Abb. 6**; Ben-Ze'ev und Geiger, 1998; Nagafuchi, 2001). Desmosomen sind knopfartige Zell/Zell-Kontaktpunkte, welche Zellen zusammenhalten. Ausserdem dienen sie im Zellinnern als Verankerungspunkte für Intermediärfilamente, die im Cytoplasma ein Strukturgerüst bilden und ihm Zugfestigkeit verleihen. Die Intermediärfilamente benachbarter Zellen sind also über die Desmosomen indirekt miteinander verbunden und bilden in dem gesamten Gewebe ein durchgehendes Geflecht. Welche Art von Intermediärfilamenten an die Desmosomen angeheftet ist, hängt vom Zelltyp ab: In den meisten Epithelzellen sind es Keratin-Filamente; in den Herzmuskelzellen Desmin-Filamente. Die Transmembran-Verbindungsproteine der Desmosomen gehören wie bei der Adherens junction zur Familie der Cadherine. Hemidesmosomen ähneln morphologisch den Desmosomen. Sie verbinden die Intermediärfilamente mit der Basalmembran. Die Transmembran-Verbindungsproteine der Hemidesmosomen gehören zu den extrazellulären Matrixrezeptoren der Integrin-Familie.

Gap junction (Nexus, Konnexon)

Bei der Gap junction handelt es sich um Poren durch die Zellmembran, welche aus jeweils sechs Konnexinen bestehen und das Cytoplasma benachbarter Zellen miteinander verbinden. Die Konnexine sind Transmembran-Proteine mit jeweils vier α -helikalen Transmembrandomänen. Den von jeweils sechs dieser Konnexine gebildeten Komplex bezeichnet man als Konnexon, welches mit einem Konnexon der Nachbarzelle interagiert, um eine membrandurchspannende Pore zu bilden. Durch diese Pore können anorganische Ionen und andere kleine Moleküle bis zur Größe von einem Kilodalton vom Cytoplasma einer Zelle zu dem der Nachbarzelle überwechseln. Auf diese Weise sind die Zellen sowohl chemisch als auch elektrisch miteinander verbunden.

Tight junction, Zonula occludens

Während Adherens junction, Desmosomen und Gap junction auch in anderen Zellarten vorkommen, ist die Tight junction (*Zonula occludens*) charakteristisch für Epithelien und Endothelien und deren Barrierefunktion.

Die Tight junction stellt sich in der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie als ein verzweigtes Netz untereinander verbundener Stränge dar (**Abb. 2**), das den apikalen Bereich der Epithelzelle vollständig umspannt. Dieses die Zelle umspannende Netzwerk der Tight junction wird auch *Zonula occludens* genannt. Bei der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion fallen der Tight junction zwei Hauptfunktionen zu (Diamond, 1977; **Abb. 2C**).

1. Die Verhinderung der freien Diffusion durch den parazellulären Spalt (Barriere): Wie oben erwähnt, zeichnen sich Epithelien durch selektiven Transport durch die epitheliale Zellschicht aus. Ohne eine Abdichtung des parazellulären Spaltes käme es jedoch sofort zu einem Ausgleich der durch den gerichteten Transport erzeugten transepithelialen Gradienten. Diese Abdichtung erfolgt durch die Tight junction, wobei das Maß der abdichtenden Funktion zwischen unterschiedlichen Epithelien stark variieren kann. Ferner ist die Abdichtung regulierbar und kann bei Erkrankungen stark verändert sein (Fromm et al., 1994).
2. Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zell-Polarität (Schranke): Eine Grundvoraussetzung des gerichteten transepithelialen Transports ist eine asymmetrische Verteilung der membranären Kanäle und Rezeptoren. So zeigen

differenzierte Epithelien einen sehr unterschiedlichen Besatz mit Rezeptoren und Kanälen im apikalen und im basolateralen Bereich ihrer Membran. Der Tight junction, welche die Grenze zwischen diesen beiden Membranbereichen darstellt, kommt die Aufgabe zu, die spezifische Lokalisation dieser Membran-Proteine zu gewährleisten, indem sie die freie Diffusion innerhalb der Zellmembran unterbindet.

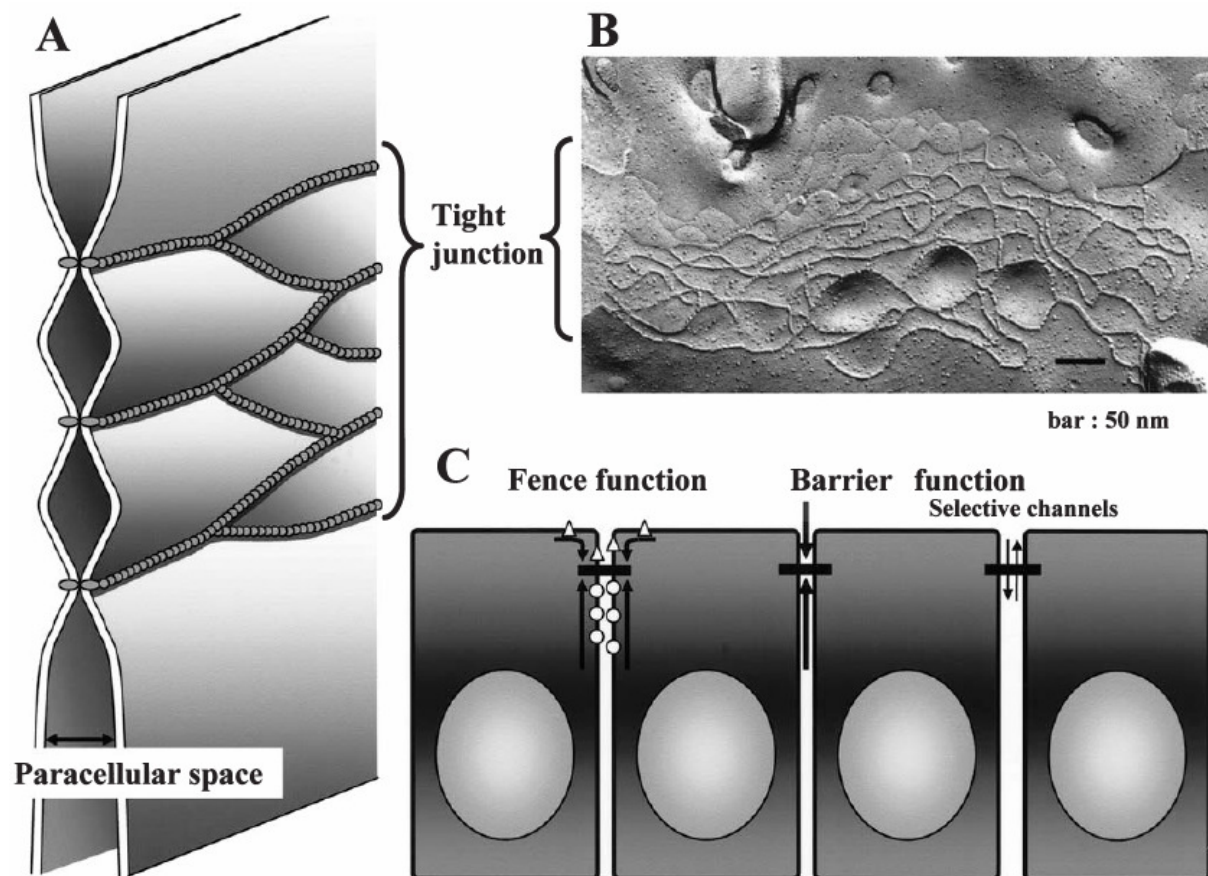


Abbildung 2 Tight junction, Aussehen und Funktion

Schematische Darstellung der Abdichtung des parazellulären Spaltes durch ein Netzwerk von Tight junction Strängen (A). Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie von Tight junction Strängen (B). Schematische Darstellung der Schranken-Funktion (Fence) und der Barrierefunktion (Barrier) der Tight junction (C) (Aus: Sawada et al., 2003).

1.3 Proteine der Tight junction

Die integralen transmembranären Bestandteile der Tight junction umfassen drei Gruppen von Proteinen; 1. Occludin und seine Spleißvarianten, 2. die Familie der Claudine und 3. die Junctional Adhesion Molecules (JAM; **Abb. 3**).

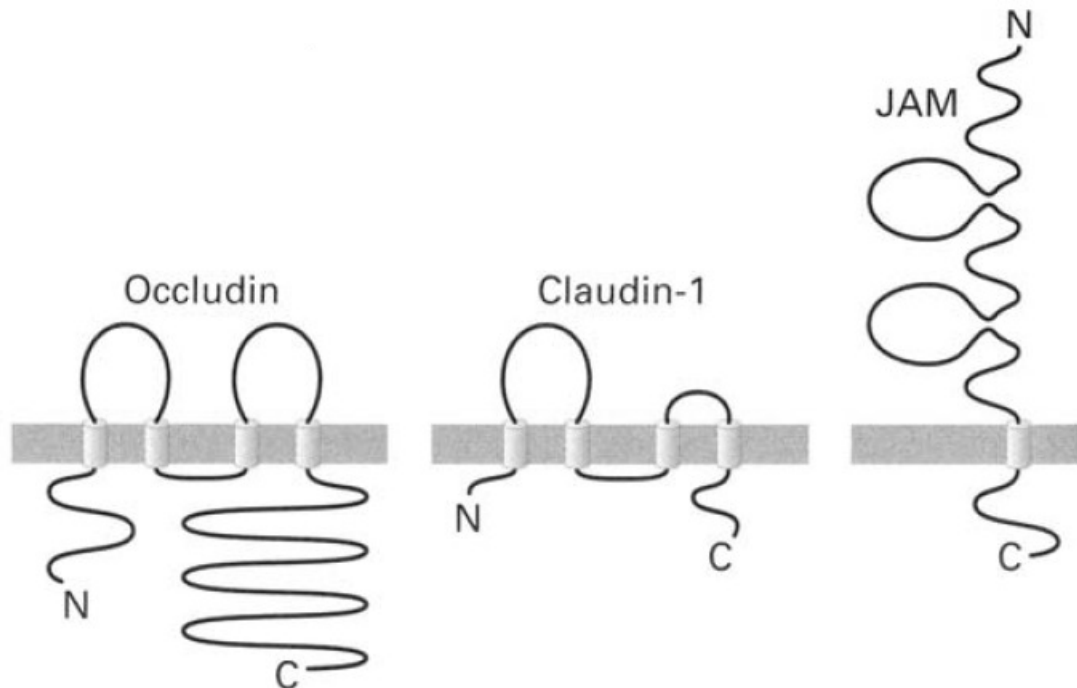


Abbildung 3 Transmembran-Proteine der Tight junction

Schematische Darstellung der drei Gruppen von Transmembran-Proteinen, welche die Zell-Zell-Interaktion der Tight junction vermitteln (Aus: Lodish et al., 2004).

Occludin

Occludin war das erste integrale Tight junction-Protein, das vor gut einem Jahrzehnt identifiziert werden konnte (Furuse et al., 1993). Sein Name leitet sich aus dem lateinischen „occludere“ (verschließen) ab. Occludin wird in Epithelien und Endothelien exprimiert. Es handelt sich um ein Transmembran-Protein mit vier Transmembrandomänen, die zwei extrazelluläre Schleifen bilden, sowie einen intrazellulären C- und N-Terminus. Das Molekulargewicht beträgt ca. 60 Kilodalton (kDa) und das Protein hat eine Länge von 522 Aminosäuren. Es konnten mehrere Formen von Occludin-mRNA nachgewiesen werden, welche durch alternatives Spleißen und die Nutzung eines alternativen Promotors entstehen (Ghassemifar et al., 2002; Mankertz et al., 2002). Die Transfektion von Occludin in Zellen, die kein endogenes Occludin exprimieren (L-Fibroblasten), führt zur Ausbildung von Tight junction-förmigen Strukturen (Furuse et al., 1998). Mittels Gefrierbruch-Immunoreplika-Elektronenmikroskopie konnte die Anwesenheit von Occludin in den Tight junction-Strängen nachgewiesen werden (Fujimoto, 1995).

Die genaue Funktion von Occludin konnte bis zum heutigen Tage nicht hinreichend geklärt werden. So sind Occludin-defiziente embryonale Stammzellen weiterhin in der Lage, sich zu polarisierten epithelialen Zellen zu entwickeln und funktionelle Tight junction-Stränge auszubilden (Saitou et al., 1998). Untersuchungen an Occludin-knock-out-Mäusen zeigten ferner keine drastischen Veränderungen in der Barrierefunktion und der Morphologie der Tight junction-Stränge (Saitou et al., 2000; Schulzke et al., 2005). Es gibt jedoch zahlreiche Befunde, die darauf hinweisen, dass Occludin eine wichtige Rolle innerhalb der Tight junction spielt. So führt die Überexpression mutierter Occludin-Formen zur Veränderung der Barriere- und der Fencenfunktion der Tight junction (Balda et al., 1996; McCarthy et al., 1996; Bamforth et al., 1999). Ferner führt die Zugabe von synthetischen Peptiden, die in ihrer Aminosäuresequenz den extrazellulären Schleifen von Occludin entsprechen, in epithelialen Zellen zum Verschwinden der Tight junction, zur Inhibition der Zelladhäsion und zur Hochregulation von β -Catenin und dem β -Catenin/TCF-Zielgen c-myc (Van Itallie und Anderson, 1997; Wong und Gumbiner, 1997; Lacaz-Vieira et al., 1999; Medina et al., 2000; Vietor et al., 2001). Occludin wird an mehreren Serinen und Threoninen (Sakakibara et al., 1997; Wong, 1997; Wong und Gumbiner, 1997), sowie Tyrosinen (Tsukamoto und Nigam, 1999) phosphoryliert. Die Auswirkung dieser Phosphorylierung auf die Lokalisation von Occludin variiert jedoch zwischen unterschiedlichen Geweben und Spezies. So ist in epithelialen Zelllinien eine Lokalisation von stark phosphoryliertem Occludin in der Tight junction zu beobachten, mit einer Verschiebung der Lokalisation hin zum Cytoplasma mit sinkendem Grad der Phosphorylierung (Sakakibara et al., 1997; Tsukamoto und Nigam, 1999; Andreeva et al., 2001). In Endothelien hingegen führt mechanischer Stress zu einer deutlichen Abnahme der Occludin-Menge in der Tight junction, der Grad der Tyrosin-Phosphorylierung des verbleibenden Occludins steigt jedoch an (DeMaio et al., 2001). Das intrazelluläre carboxyterminale Ende (C-Terminus) von Occludin scheint in der Lage zu sein direkt mit dem F-Aktin des zellulären Cytoskeletts zu interagieren (Wittchen et al., 1999). Ferner interagiert der C-Terminus mit den Proteinen der membranassoziierten Guanylat-Kinase Homologe (MAGUK). Die für die Tight junction entscheidenden Mitglieder der MAGUK-Familie sind die Zonula occludens (ZO) Proteine, auf die später noch näher eingegangen wird.

Claudine

Die Familie der Claudine stellt die zentralen strukturellen Bestandteile der Tight junction dar. Der Name leitet sich von dem lateinischen „claudere“ (schließen) ab. Die Familie umfasst bisher vierundzwanzig beschriebene Mitglieder. Claudine sind Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 27 kDa, die vier Transmembrandomänen besitzen (**Abb. 3**). Das C-terminale Ende der Claudine enthält ein PDZ-Bindungsmotiv, über das Interaktionen mit dem Cytoskelett erfolgen. Bei der Ausbildung von Tight junction-Strängen interagieren Claudine gegenüberliegender Zellmembranen nicht nur auf homophile Weise (Claudin-1/Claudin-1), sondern bilden auch heterophile Verbindungen aus (Claudin-1/Claudin-3) (Furuse et al., 1999). Aufgrund der Tatsache, dass das Expressionsmuster der Claudine sehr gewebespezifisch ist, werden sie derzeit als die zentralen Komponenten der Tight junction angesehen, welche für die Dichtigkeit und die spezifischen Ionenselektivitäten der unterschiedlichen Epithelien und Endothelien verantwortlich sind.

Claudin-1 ist entscheidend an der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion beteiligt. Knockout-Mäuse für Claudin-1 zeigen eine schwerwiegende Schädigung der epidermalen Barriere, die sich in einer starken Dehydrierung bemerkbar macht. Neugeborene Mäuse versterben innerhalb weniger Stunden nach der Geburt aufgrund eines massiven Wasserverlustes über die Haut (Furuse et al., 2002).

Die Expression von Claudin-2 in Hundenieren-Zellen mit hohem transepithelialelem Widerstand (MDCK I) führt zu einer Erhöhung der Durchlässigkeit der Tight junction, und die Zellen erscheinen funktionell und morphologisch wie Zellen mit niedrigem transepithelialelem Widerstand (Furuse et al., 2001). Es wurde weiter spezifiziert, dass die von Claudin-2 gebildeten parazellulären Poren bzw. Kanäle selektiv für kleine Kationen sind (Amasheh et al., 2002).

Für Claudin-4 konnte gezeigt werden, dass in MDCK-Zellen, welche Claudin-1 und -4 exprimieren, die Zugabe von *Clostridium perfringens*-Enterotoxin (CPE), einem Claudin-4 bindenden Protein, zu einer selektiven Entfernung von Claudin-4 aus der Tight junction führt. Dies geht mit einer erheblichen Verminderung des transepithelialen Widerstandes einher (Sonoda et al., 1999). Claudin-4 besitzt überdies eine Ionenselektivität. Die Expression von Claudin-4 in epithelialen Zellen führt zu einer selektiven Verminderung der parazellulären Na⁺-Permeabilität, nicht jedoch der Cl⁻ Permeabilität (Van Itallie et al., 2001).

Claudin-11 ist eine entscheidende Komponente der Tight junction in den Myelinscheiden des zentralen Nervensystems (CNS) und in Sertoli-Zellen der Hoden. Claudin-11 wird nur in Oligodendrozyten des CNS und Sertoli-Zellen exprimiert. Ein Verlust der Claudin-11-Expression resultiert im Fehlen der Tight junction in diesen Geweben (Gow et al., 1999).

Claudin-16 bildet Mg^{2+} - und wahrscheinlich auch Ca^{2+} -selektive Poren im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife der Niere (Wong und Goodenough, 1999). Eine Mutation im *Claudin-16* Gen führt zu einer selektiven Störung der renalen Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Resorption (Blanchard et al., 2001).

Die Expression einzelner Claudine erfolgt bereits innerhalb sehr früher Entwicklungsstadien. So findet sich z.B. Claudin-6 in embryonalen Epithelien (Turksen und Troy, 2001), und seine Überexpression in transgenen Mäusen führt zu einer epithelialen Barriestörung. Es wird spekuliert, dass die mangelnde Temperaturregulation und die Dehydrierung, die gelegentlich bei Neugeborenen zu beobachten ist, auf eine gestörte Claudin-Expression in der Epidermis zurückzuführen ist (Turksen und Troy, 2002).

Auch im Rahmen der Onkogenese könnten die Claudine eine Rolle spielen. So zeigt sich z.B. eine Überexpression von Claudin-4 in Bauchspeicheldrüsen-, sowie bei einigen gastrointestinalen Tumoren. Die Behandlung der Tumorzellen mit dem Claudin-4-bindenden Protein *Clostridium perfringens*-Enterotoxin (CPE) führt zu einem verminderten Tumorwachstum (Michl et al., 2001). Für Claudin-1, -2, -3 und -5 konnte eine Rekrutierung und Aktivierung des Precursor-Proteins der Matrix-Metalloproteinase MMP-2 (pro-MMP-2) nachgewiesen werden (Miyamori et al., 2001; Ichiyasu et al., 2004). Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass Proteine, die an der Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte beteiligt sind, auch einen Einfluss auf die Vorgänge zellulärer Invasion und Migration haben. Unterstützt wird diese These von neuesten Befunden, nach denen Claudin-1 eine entscheidende Rolle für Metastasierung und Invasion bei Colonkarzinomen spielt (Dhawan et al., 2005). Die Regulation der Claudine in onkogen transformierten Zellen ist jedoch nicht einheitlich. So ist für Claudin-1 ein vollständiger Expressionsverlust in den meisten Brustkrebsfällen zu beobachten, ohne dass Veränderungen im Promotor oder der kodierenden Sequenz auftreten (Kramer et al., 2000; Hoevel et al., 2002). Ebenso wurde eine Verminderung des Claudin-7 in duktalem Karzinomen der Brust gezeigt (Kominsky et al., 2003).

Dem gegenüber zeigt sich jedoch häufig eine Erhöhung von Claudin-3 und Claudin-4 in verschiedenen Karzinomen, wie z.B. Pankreas- und Ovarialkarzinomen (Michl et al., 2003; Rangel et al., 2003).

Junctional Adhesion Molecules

Die Junctional Adhesion Molecules (JAM) sind glykosylierte Proteine mit einem Molekulargewicht von 43 kDa. Sie besitzen einen intrazellulären C-Terminus, eine Transmembrandomäne und einen extrazellulären Teil mit zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen und dem N-Terminus. Sie werden in drei Unterformen eingeteilt, JAM-A, JAM-B und JAM-C (Muller, 2003). JAM wird zu den Tight junction-Proteinen gezählt, da es unmittelbar basal der anderen Tight junction-Proteine Occludin und Claudin angeordnet ist (Itoh et al., 2001).

JAM ist nicht an der eigentlichen Barrierefunktion der Tight junction beteiligt. Seine Aufgabe liegt vielmehr im Bereich der Initiation bzw. der Restitution der Ausbildung der Tight junction (Liu et al., 2000; Takai und Nakanishi, 2003). An Endothelien konnte gezeigt werden, dass JAM am Gefäßaustritt von Monozyten und anderen immunkompetenten Zellen beteiligt ist (Bazzoni, 2003; Muller, 2003). Neueste Untersuchungen zeigen außerdem, dass JAM bei der Regulation der Zellmotilität involviert ist (Bazzoni et al., 2005).

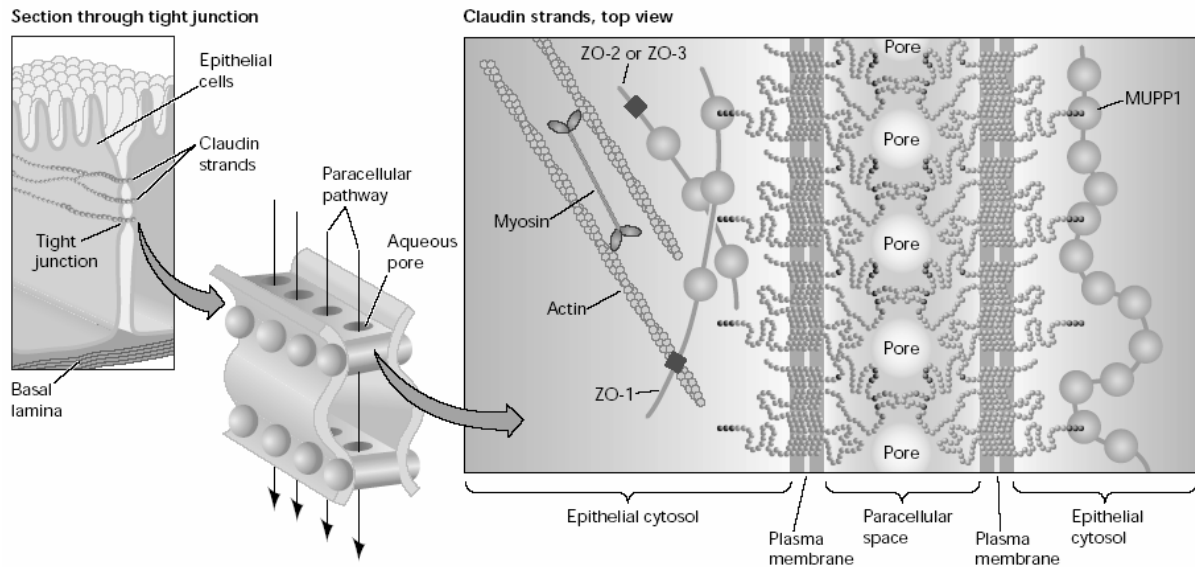


Abbildung 4 Molekulare Zusammensetzung der Tight junction

Spekulatives Modell der Ausbildung von Poren in der Tight junction, sowie Interaktion der Claudine mit Tight junction-assoziierten Proteinen und Komponenten des zellulären Cytoskeletts (Aus: Van Itallie und Anderson, 2004).

Die Tight junction-Proteine Occludin, Claudin und JAM interagieren mit einer Vielzahl von assoziierten Proteinen (**Abb. 4**), von denen an dieser Stelle jedoch lediglich die Gruppe der *Zonula occludens*-Proteine (ZO) hervorgehoben werden soll.

Zonula occludens-Proteine

Das *Zonula occludens* (ZO)-Protein 1 (ZO-1) war das erste Protein des Tight junction-Komplexes, das identifiziert werden konnte (Stevenson et al., 1986). Die ZO-Proteine besitzen strukturell konservierte PDZ-, SH3- und Guanylat-Kinase (GUK)-Domänen (**Abb. 5**). Aufgrund dieser GUK-Domänen werden *Zonula occludens*-Proteine der Familie der Membran-assoziierten Guanylat-Kinasen (MAGUK) zugeordnet.

SH3-Domänen sind nicht-enzymatische Proteindomänen mit einer Länge von 50-70 Aminosäuren, die in der Lage sind, prolinreiche Sequenzen zu binden. Die GUK-Domänen der MAGUKs sind homolog zu dem Enzym Guanylat-Kinase, welches die Umwandlung von Guanidiniummonophosphat (GMP) zu Guanidiniumdiphosphat (GDP) unter ATP-Verbrauch durchführt. Da Untersuchungen der Sequenz von ZO-Proteinen jedoch keinerlei Hinweise auf die Anwesenheit von GMP oder ATP-Bindungs-Domänen geliefert haben, geht man davon aus, dass die GUK-Domänen

der MAGUKs enzymatisch inaktiv sind, und vielmehr der Protein-Bindung dienen (Kim et al., 1997). Jedoch gibt es auch Spekulationen, dass die GUK-Domänen zur Aktivierung G-Protein-gekoppelter Signalwege dienen könnten. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass der Zusammenbau der Tight junction durch G-Proteine reguliert wird (Balda et al., 1991; Saha et al., 2001).

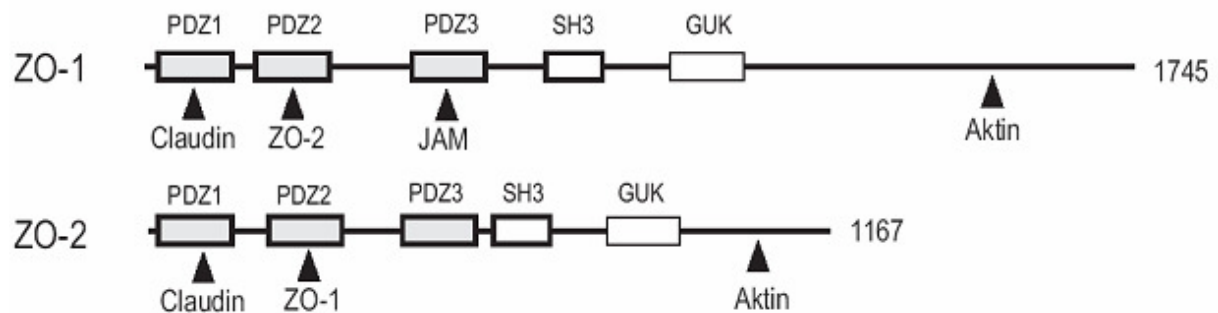


Abbildung 5 Aufbau der Zonula occludens-Proteine ZO-1 und ZO-2

Anordnung der PDZ, SH3 und GUK-Domänen im ZO-1 und ZO-2 Protein. Durch schwarze Dreiecke sind die jeweiligen Interaktionspartner der Domänen angegeben.

Die zahlreichen Proteinbindungs-Domänen der MAGUKs repräsentieren auch ihre zentrale Funktion. Die ZO-Proteine sind die primären Adaptoren, welche Occludin, die Claudine und JAM mit dem Aktin-Cytoskelett und anderen Tight junction assoziierten Proteinen verbinden. Hierbei ist ZO-1 das wichtigste der drei ZO-Proteine. ZO-1 ist in der Lage an Claudine, sowie an JAM über seine PDZ-Domänen zu binden (Itoh et al., 1999; Ebnet et al., 2000). Mittels seiner GUK-Domäne erfolgt eine Bindung an Occludin (Fanning et al., 1998; Schmidt et al., 2001). Über sein C-terminales Ende interagiert ZO-1 mit dem Aktin-Cytoskelett (Itoh et al., 1997; Fanning et al., 1998; Wittchen et al., 1999). ZO-1 ist jedoch nicht ausschließlich mit der Tight junction assoziiert. So findet man eine Assoziation zwischen ZO-1 und α -Catenin, einem Protein der Adherens junction (Itoh et al., 1997). ZO-1 scheint außerdem eine Rolle im Rahmen der Zellzyklusregulation zu spielen. In Monolayern kann beispielsweise nach mechanischer Verletzung des Layers eine Verschiebung der ZO-1-Lokalisation in den Zellkern beobachtet werden (Gottardi et al., 1996). ZO-1 interagiert über seine SH3-Domäne mit dem Transkriptionsfaktor ZONAB (Zonula occludens binding Protein), der an die Promotoren von Proteinen der Zellzyklus-Regulation bindet. Diese Interaktion beeinflusst die parazelluläre Permeabilität, sowie die Genexpression der Rezeptor-Tyrosin-Kinase ErbB-2 (Balda und Matter, 2000). Dies lässt vermuten, dass ZO-1 an einem Crosstalk zwischen dem Zellkern und der

Tight junction beteiligt ist, der auf die epitheliale Differenzierung und Zellteilung Einfluss nimmt.

1.4 Der Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist zentral an Differenzierungs- und Morphogenese Prozessen in der Embryonalentwicklung beteiligt, und ist evolutionär hoch konserviert. Der Name Wnt leitet sich aus dem Zusammenschluss der Begriffe *wingless* (Segmentpolaritätsgen in *Drosophila*) und *INT-1* (Proto-Onkogen der Maus) ab.

Erstmals wurde der *Wingless*-Signalweg in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben (Sharma und Chopra, 1976). In den folgenden Jahren konnte *INT-1* als *wingless*-homologes Gen in der Maus identifiziert werden (Rijsewijk et al., 1987).

Der Wnt-Signalweg ist an der Regulation der Differenzierung, Segmentierung, Proliferation, Motilität und Apoptose beteiligt (Wodarz und Nusse, 1998). Darüber hinaus ist der Wnt-Signalweg von großer Bedeutung bei der Onkogenese. Es konnten Fehlregulationen des Wnt/ β -Catenin-Wegs in Colonkarzinomen, hepatozellulären Karzinomen, Prostatakarzinomen und Melanomen nachgewiesen werden. Besonders hervorzuheben sind hierbei die Colonkarzinome, bei denen in ca. 90% aller Fälle eine Mutation vorliegt, welche zu einer permanenten Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt (Morin, 1999; Bienz und Clevers, 2000; Polakis, 2000; Giles et al., 2003). Im Rahmen der Untersuchung von Colonkarzinomen wurden auch die ersten Hinweise dafür gefunden, dass ein regulatorischer Einfluss des Wnt-Signalwegs auf Proteine der Tight junction existieren könnte. So konnte gezeigt werden, dass der Promotor des *Claudin-1*-Gens mit nukleären Effektoren des Wnt-Signalwegs interagiert, und dass diese Interaktion im Reporteragen-Assay eine transaktivierende Funktion auf den *Claudin-1*-Promotor ausübt (Miwa et al., 2000).

Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass es sich beim Wnt-Signalweg um eine lineare Signaltransduktionskaskade handelt (Riggelman et al., 1990; Siegfried et al., 1994), stellte sich in den letzten Jahren heraus, dass der Wnt-Signalweg komplexer aufgebaut ist. Neben dem klassischen über β -Catenin verlaufenden Signalweg (kanonischer Wnt/ β -Catenin-Weg) gibt es noch drei weitere Wege. So existieren neben dem kanonischen Signalweg der Wnt/ Ca^{2+} -Weg, der planare Zellpolaritätsweg

und ein Signalweg, der im Rahmen der asymmetrischen Zellteilung von regulatorischer Bedeutung ist (Huelsenken und Birchmeier, 2001). Beim Wnt/ Ca^{2+} -Weg erfolgt durch Aktivierung der Phospholipase C eine intrazelluläre Ausschüttung von Ca^{2+} -Ionen, welche zur Aktivierung des Wnt/ Ca^{2+} -Signalwegs führen. Diese Calcium-Ausschüttung führt zu einer Aktivierung calcium-sensitiver Enzyme, wie der Proteinkinase C (PKC) und der calmodulin-abhängigen Protein-Kinase II (CamKII) (Kuhl et al., 2000). Der planare Zellpolaritätsweg dient der Regulation der asymmetrischen Organisation des Cytoskeletts. Diese Regulation erfolgt über die Aktivierung der Jun-N-terminalen Kinase (JNK) (Djiane et al., 2000; Heisenberg et al., 2000; Mlodzik, 2000). Die Regulation der asymmetrischen Zellteilung ist bisher kaum verstanden. Es ist jedoch bekannt, dass das Mikrotubuli-bindende Protein EB1, die Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) sowie das Tumorsuppressor-Protein Adenomatous Polyposis Coli-Protein (APC) an diesen Prozessen beteiligt sind (Liu et al., 1999; Bienz, 2001).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen beschäftigen sich ausschließlich mit dem klassischen (kanonischen) Wnt-Signalweg. Daher soll im Folgenden auch nur näher auf diesen Aspekt der Signaltransduktionskaskade eingegangen werden.

Im Mittelpunkt des kanonischen Wnt-Signalwegs steht β -Catenin, welches das zentrale Molekül der Signalübermittlung darstellt. Ist der Wnt-Signalweg inaktiv, so wird freies, cytosolisches β -Catenin, welches nicht mit den Komplexen der Adhärenz junction assoziiert ist, durch einen Multiprotein-Komplex bestehend aus der Serin/Threonin Kinase Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β), dem Gerüstprotein Axin und dem Tumorsuppressor Adenomatous Polyposis Coli-Protein (APC), mehrfach phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung wird β -Catenin von β -TRCP erkannt, bei dem es sich um eine Komponente des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes handelt. Auf diese Weise wird β -Catenin dem Ubiquitin-Proteasom-Weg zugeführt und abgebaut (**Abb. 6**; Liu et al., 1999).

Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs erfolgt durch Wnt-Proteine, welche an membranständige Rezeptoren binden. Wnt-Proteine gehören zu einer Familie sekretorischer Glykoproteine, für die bisher 23 Mitglieder beschrieben wurden. Wnt-Proteine sind palmitoyliert, was ihnen eine hohe Hydrophobizität verleiht. Die Palmitoylierung ist ferner essentiell für die biologische Aktivität der Wnt-Proteine (Willert et

al., 2003). Bei den Rezeptoren der Wnt-Proteine handelt es sich um Komplexe aus 7-Transmembran-Domänen-Rezeptoren der *Frizzled*-Familie (Frz) und LDL-Rezeptor ähnlichen Proteinen (LRP5, LRP6) (Pinson et al., 2000; Tamai et al., 2000; Wehrli et al., 2000). Die Bindung von Wnt an den Rezeptorkomplex führt zu einer Phosphorylierung des Dishevelled-Proteins (Dsh), und einer anschließenden Inaktivierung der GSK3 β . Die genauen molekularen Abläufe dieser Vorgänge sind jedoch bisher nicht genau verstanden.

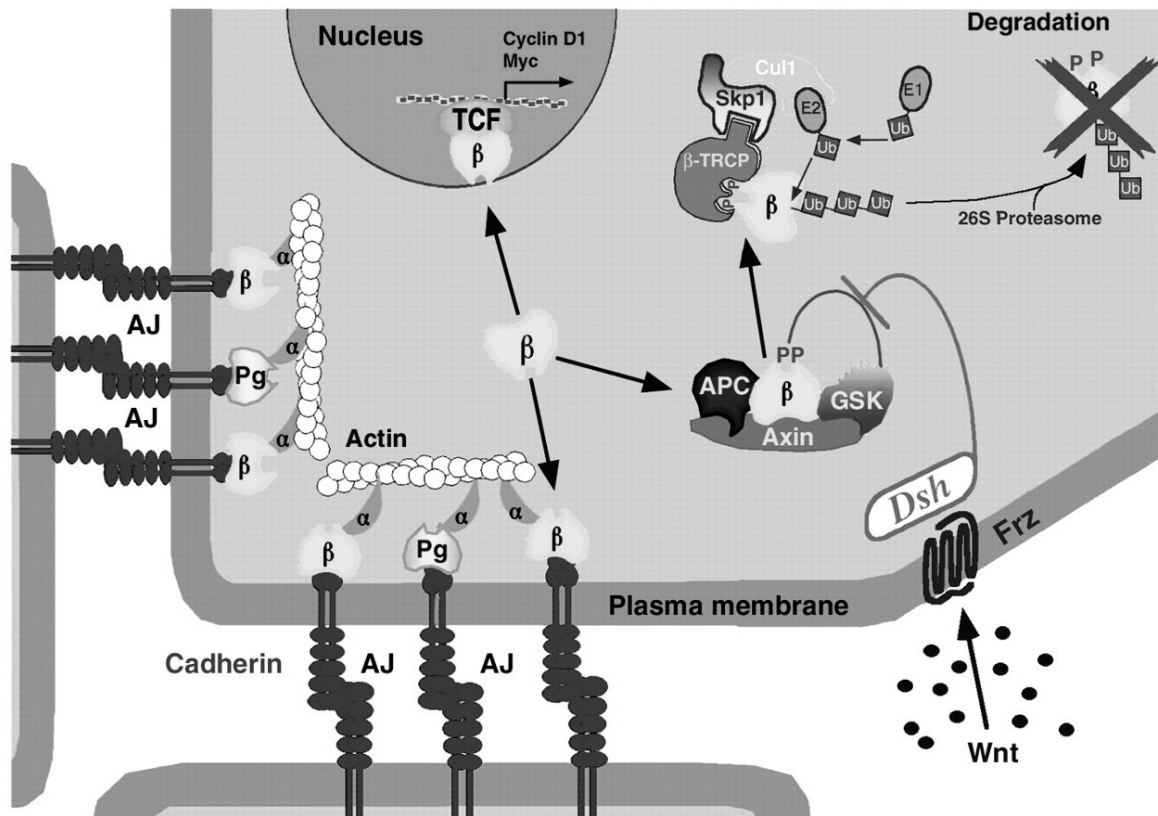


Abbildung 6 Der Wnt-Signalweg

Darstellung der dualen Rolle von β -Catenin bei der Zell-Zell-Adhäsion und im Rahmen des Wnt-Signalwegs. β -Catenin (β) und Plakoglobin (Pg) binden an Cadherin Adhäsionsrezeptoren, und sind über α -Catenin (α) mit dem Aktin-Cytoskelett verbunden, wodurch Adhärenz junction-Komplexe entstehen (links). Darstellung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Weges (rechts; Erklärung siehe Text) (Aus: Conacci-Sorrell et al., 2002).

Durch die Inaktivierung der GSK3 β kommt es zu einer Stabilisierung und daraus resultierenden Akkumulation von β -Catenin im Cytosol. Die Akkumulation von β -Catenin führt zu einer Translokation in den Zellkern. Dort interagiert β -Catenin mit Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie (Lymphoid enhancer factor/T-cell factor) (Behrens et al., 1996; Huber et al., 1996; Molenaar et al., 1996). In der Abwesenheit von β -Catenin fungieren die DNA-Bindungsproteine der LEF/TCF-Familie als Repressoren für Wnt-Zielgene, da sie mit dem Korepressor-Protein Groucho assoziiert

sind (Cavallo et al., 1998). Bei Anwesenheit von β -Catenin im Nukleus konvertiert dieses den Repressor-Komplex zu einem Transkriptions-Aktivator-Komplex.

Die durch den Wnt-Signalweg regulierten Zielgene sind zahlreich. Es zählen Proteine der Embryogenese, wie *Siamois* oder *Brachyury* (Brannon et al., 1997; Arnold et al., 2000) genauso dazu wie Regulatoren des Zellzyklus; beispielsweise *c-myc* oder *CyclinD1* (He et al., 1998; Shtutman et al., 1999; Tetsu und McCormick, 1999). Den Zellzyklus-Regulatoren gilt ferner besonderes Augenmerk im Rahmen der Bedeutung des Wnt-Signalwegs für die Tumorentstehung.

Erste Hinweise auf die Bedeutung des Wnt-Signalwegs für die Regulation von Proteinen der Tight junction lieferte die Identifizierung von Claudin-1 als mögliches Zielgen der β -Catenin/TCF-vermittelten Signaltransduktion (Miwa et al., 2000). Neueste Untersuchungen untermauern die Verknüpfung des Wnt-Signalwegs, der Claudine und der Metastasierung von Geweben. So konnte gezeigt werden, dass Claudin-1 wichtig für die Tumorgenese und die invasiven Eigenschaften von Colon-Epithelzellen ist, und dass die Inhibition der Claudin-1 Expression zu einer Verminderung der β -Catenin/LEF/TCF-Signaltransduktion führt (Dhawan et al., 2005). Ein weiteres Wnt-Zielgen ist *Cdx1* (Lickert et al., 2000).

1.5 *Cdx*-Gene

Caudal Related Homeobox Gene (*Cdx*), kodieren für eine Familie von Transkriptionsfaktoren, welche an der Embryonalentwicklung von Vertebraten beteiligt sind. Ihr Name leitet sich vom *caudal*-Gen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ab, bei dem es sich um einen Transkriptionsfaktor handelt, der bei der embryonalen Segmentierung der Fliege eine wichtige Rolle spielt (Macdonald und Struhl, 1986). In Vertebraten spielen *Cdx*-Gene eine essentielle Rolle bei der anterior-posterior Segmentierung des Embryos (Charite et al., 1998). Sie sind unter anderem bei der Ausbildung der Struktur des Magens in der embryonalen Entwicklung beteiligt, und sie könnten zur Aufrechterhaltung der Balance zwischen zellulärer Differenzierung und Erneuerung im adulten Darm beitragen (Beck, 2004). Als Transkriptionsfaktoren vermitteln die *Cdx*-Proteine ihre Wirkung, indem sie an sogenannte *Cdx* Response Elements (CDRE) binden, welche sich in den Promotorbereichen ihrer Zielgene finden. Nach Bindung der *Cdx*-Proteine an diese CDRE Motive erfolgt eine Regulati-

on der Expression der down-stream befindlichen Zielgene (Subramanian et al., 1995; Charite et al., 1998). Zu den wichtigsten dieser Zielgene zählen die *Hox*-Gene. Dabei handelt es sich um für die Segmentierung und Entwicklung während der Embryogenese essentielle Gene, die in 4 Genclustern im Genom angeordnet sind (*Hoxa-Hoxd*).

Die Transkriptionsfaktoren der Cdx-Familie spielen eine entscheidende Rolle bei der spezifischen Signaltransduktion (Suh et al., 1994; Lambert et al., 1996; Troelsen et al., 1997; Fang et al., 2000; Mitchelmore et al., 2000), der intestinalen Differenzierung (Suh und Traber, 1996; Soubeyran et al., 1999) und Proliferation (Suh und Traber, 1996; Lynch et al., 2000). Für den Dünndarm konnte gezeigt werden, dass die Expression von Cdx1 durch den Wnt-Signalweg reguliert wird (Lickert et al., 2000). Die Beeinflussung von Proteinen der Tight junction durch Mitglieder der Cdx-Familie konnte am Beispiel des Claudin-2 gezeigt werden, für welches das Vorhandensein sowie die funktionelle Bedeutung von Cdx-Bindungsstellen gezeigt werden konnte (Sakaguchi et al., 2002).