

# 1 Einleitung

## 1.1 Epitheliale Zell-Zellkontakte

Epitheliale Zellverbände grenzen eine Vielzahl von Organen und Geweben gegen die äußere Umgebung ab. Im Intestinaltrakt und anderen mit Schleimhäuten ausgekleideten Organen trägt das Oberflächenepithel eine Mucinschicht, die eine wichtige Schutzfunktion gegenüber Noxen, Allergenen und Erregern wie Bakterien, Viren und Parasiten übernimmt.

Der Aufbau und die Funktion epithelialer Zell-Zellkontaktstrukturen ist in den letzten Jahren zunehmend auf molekularer Ebene untersucht worden. Dabei zeigte sich, dass diese epithelialen Adhäsionsstrukturen hochmolekulare Multiproteinkomplexe darstellen. Hierzu gehören u.a. die *Tight Junctions* (Matter and Balda, 2003), die *Adherens Junctions* (Perez-Moreno et al., 2003), die Desmosomen (Huber, 2003) sowie die *Gap Junctions* (Evans and Martin, 2002) (Abb. 1-1).

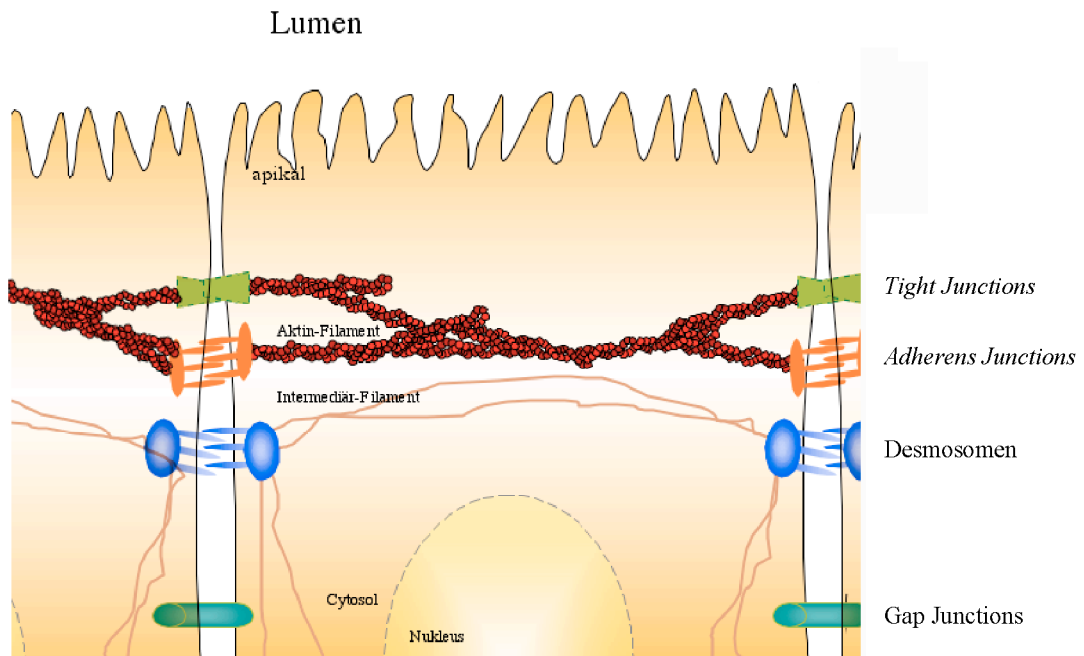


Abb. 1-1: Epitheliale Zell-Zellkontakte.

Die *Adherens Junctions* stellen eine enge Verbindung zwischen benachbarten Zellen her. Diese Zell-Zellkontakte werden durch Adhäsionsmoleküle aus der Cadherin-Familie vermittelt, die ihrerseits über Catenine intrazellulär an das Cytoskelett verankert sind (Nagafuchi, 2001). Die *Tight Junctions* dichten die apikalen Bereiche epithelialer Zellen ab, so dass durch die Zellzwischenräume selbst Ionen nicht frei diffundieren können. Neben dieser Barrierefunktion trennen *Tight Junctions* apikale und basolaterale Bereiche von Zellmembranen (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). Diese Trennung stellt eine Grundvoraussetzung für die Generierung und Aufrechterhaltung polarer Zellstrukturen dar.

Veränderungen epithelialer Zell-Zellkontakte beeinflussen das Migrationsverhalten und die Motilität von Zellen und sind somit für Prozesse wie Gastrulation, Neurulation, Wundheilung, aber auch an pathologischen Prozessen wie der Metastasierung von entscheidender Bedeutung (Gumbiner, 1996).

### 1.1.1 Der molekulare Aufbau der *Adherens Junctions*

*Adherens Junctions* stellen Zellkontaktstrukturen dar, in denen Cadherine über homophile Wechselwirkungen ihrer extrazellulären Domänen Zell-Zellkontakte zu den benachbarten Zellen herstellen. Wie aus der schematische Darstellung des Cadherin/Catenin-Komplexes (Abb. 1-2) hervorgeht, wird die Verankerung der Cadherine an das Aktincytoskelett über die Bindung an Catenine vermittelt.

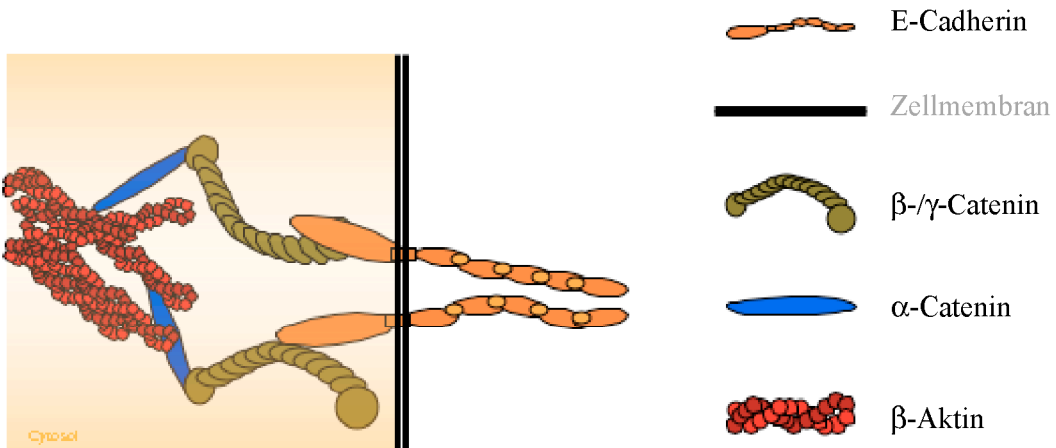


Abb. 1-2: **Schematische Darstellung des E-Cadherin/Catenin-Komplexes.** E-Cadherin bindet über seine cytoplasmatische Domäne an die Plaqueproteine β-Catenin oder γ-Catenin, welche ihrerseits über α-Catenin an das Aktincytoskelett verankert sind.

Das epithelspezifische E-Cadherin ist das am besten untersuchte Cadherin (Ozawa and Kemler, 1990). Es gehört zur Sub-Familie der klassischen Cadherine (Kemler, 1992; Takeichi, 1991) und ist aus drei Domänen aufgebaut: einer extrazellulären, transmembranen und cytoplasmatischen Domäne. Der extrazelluläre Bereich ist durch fünf sogenannte Cadherin-Repeats charakterisiert. Dabei handelt es sich um ca. 110 Aminosäuren lange, stark homologe Sequenzwiederholungen, die durch Bindungstaschen für je 3  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen voneinander getrennt sind. Neben der extrazellulären Domäne ist die cytoplasmatische Domäne mit den daran assoziierten Cateninen für die adhäsive Funktion von E-Cadherin von zentraler Bedeutung. Die cytoplasmatische Domäne von E-Cadherin bindet an die Proteine  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin, welche über  $\alpha$ -Catenin an das Aktincytoskelett verankert werden (Aberle et al., 1994).

Die Catenine wurden zuerst aus Komplexen mit E-Cadherin isoliert und nach ihrer Molekülgröße als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin unterschieden (Ozawa et al., 1989).  $\alpha$ -Catenin (102 kDa) ist strukturell mit Vinculin verwandt, einem Protein, welches für die Bindung des Aktincytoskeletts an Strukturen der inneren Plasmamembran von Bedeutung ist (Huber et al., 1997; Menkel et al., 1994; Rüdiger, 1998).  $\beta$ -Catenin zeigt starke Homologien (ca. 80%) zu dem *Drosophila melanogaster* Genprodukt Armadillo (Hatzfeld, 1999). Auch  $\gamma$ -Catenin besitzt starke Homologie zu Armadillo und zu  $\beta$ -Catenin.  $\gamma$ -Catenin wurde zuerst in Desmosomen lokalisiert und Plakoglobin (Franke et al., 1989) genannt, ehe die strukturelle Identität mit  $\gamma$ -Catenin ermittelt wurde. Proteininteraktionsstudien mit rekombinanten Cadherinen und Cateninen haben im weiteren zur Aufklärung der molekularen Struktur des Cadherin/Catenin-Komplexes geführt (Aberle et al., 1994) und die Identität von Plakoglobin und  $\beta$ -Catenin gesichert (Butz and Kemler, 1994; Näthke et al., 1994). Dabei wurde auch gezeigt, dass für die Verbindung des Cadherin/Catenin-Komplexes mit dem Aktincytoskelett Vinculin und  $\alpha$ -Actinin von Bedeutung sein können (Rüdiger, 1998).

Die Bedeutung der cytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin für die adhäsive Funktion der extrazellulären Domäne wurde in Deletionsstudien aufgeklärt. Die Deletion der 72 C-terminalen Aminosäuren von E-Cadherin zeigte einen Verlust der Catenin-Bindung an das Cytoskelett und reduzierte die Adhäsivität der intakten extrazellulären E-Cadherin-Domäne (Ozawa et al., 1990). Schließlich wurde als wichtige Voraussetzung für die durch den Cadherin/Catenin-Komplex vermittelte adhäsive Funktion eine Dimerisierung der Cadherine erkannt (Briher et al., 1996; Yap et al., 1997). Für die laterale Interaktion benachbarter Cadherin-Moleküle wurde eine Beteiligung der Transmembrandomäne gezeigt (Huber et al., 1999).

### 1.1.2 Der molekulare Aufbau der *Tight Junctions*

Claudine und Occludin konnten als transmembranale Bestandteile der *Tight Junctions* identifiziert werden. Darüberhinaus sind an der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran mehrere Plaqueproteine charakterisiert worden, die für die Bindung der *Tight Junctions* an das Cytoskelett verantwortlich sind.

Occludin wurde 1993 von Furuse et al. in den *Tight Junctions* von Epithelzellen identifiziert (Furuse et al., 1993). Dieses Protein enthält vier Transmembran-Domänen mit zwei extrazellulären Loops. Occludin wird eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der *Tight Junctions* zugeordnet. So führte z.B. die Transfektion mit Occludin bei *Tight Junction*-defizienten Fibroblasten zu der Ausbildung von *Tight Junction*-ähnlichen Strukturen (Furuse et al., 1998b). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Barrierefunktion der *Tight Junctions* durch synthetische Peptide, die den extrazellulären Loops von Occludin entsprechen, stark beeinträchtigt wird. Bei epithelialen Zellen führt die Wirkung dieser Peptide zum Verlust der *Tight Junctions* (Balda et al., 1996; Bamforth et al., 1999; Huber et al., 2000; McCarthy et al., 1996). Trotz dieser und weiterer zahlreicher Experimente ist die genaue Rolle, die Occludin innerhalb der *Tight Junctions* zukommt, weiterhin unklar, zumal Occludin knock-out Mäuse im Gegensatz zu den oben aufgeführten Befunden überraschenderweise einen normalen Phänotyp ohne Barrieredefekte aufweisen (Saitou et al., 2000).

Claudine konnten als weitere transmembranständige *Tight Junctions*-Komponenten identifiziert werden (Furuse et al., 1998a). Hierbei handelt es sich um eine Familie von ca. 20-27 kDa großen Proteinen, die aus 24 Mitgliedern besteht (Tsukita et al., 2001). Claudine weisen ebenso wie Occludin vier Transmembran-Domänen mit jeweils zwei extrazellulären Loops auf. Sie zeigen aber keine Sequenzähnlichkeiten zu Occludin (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). Mittlerweile gibt es vermehrte Hinweise, dass Claudinen für die Funktion der *Tight Junctions* eine wesentlich größere Rolle zukommt als Occludin. So zeigten immunelektronenmikroskopische Aufnahmen (Furuse et al., 1999; Morita et al., 1999a; Morita et al., 1999b), dass die Claudine die Hauptkomponenten der *Tight Junctions* darstellen. Die Expression einzelner Claudine führte, vergleichbar zu den Versuchen mit Occludin, in *Tight Junction*-defizienten Fibroblasten zu einem gut ausgebildeten Netzwerk von *Tight Junction*-Strängen (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). Das Expressionsmuster der Claudine variiert in den verschiedenen Geweben erheblich (Gonzalez-Mariscal et al., 2003), wobei die Kombination und die unterschiedlichen Expressionsraten verschiedener Claudine die Barriereigenschaften der *Tight Junctions* stark beeinflussen. So führte z.B. die Transfektion von MDCK I-Zellen mit Claudin-2 zu einer erheblichen Reduzierung des transepithelialen Widerstandes (TER), was auf eine veränderte Dichtigkeit der *Tight Junctions* hinweist (Furuse et al., 2001).

Die cytoplasmatische Seite der *Tight Junctions* setzt sich aus mehreren Plaqueproteinen zusammen. Neben den Aktinfilament-bindenden Proteinen ZO-1, ZO-2 und ZO-3 (Balda and Anderson, 1993; Gumbiner et al., 1991; Stevenson et al., 1986; Wittchen et al., 1999) kennt man mittlerweile zahlreiche weitere *Tight Junctions*-assoziierte Proteine (Gonzalez-Mariscal et al., 2003).

Die ZO-Proteine ordnet man der Familie der MAGUK-(membrane-associated guanylate kinase homologous) Proteine zu. Bei der Analyse ihrer Primärstrukturen finden sich bei allen drei ZO-Proteinen folgende Domänen: eine oder mehrere PDZ-Domänen, eine Src-homologe SH3-Domäne und eine Guanylatkinase-ähnliche GUK-Domäne. Außerdem weisen die ZO-Proteine jeweils einen sauren, prolinreichen C-Terminus auf. Proteininteraktionsstudien ergaben, dass die ZO-Proteine über eine ihrer PDZ-Domänen (Itoh et al., 1999) an Claudine binden. Die Bindung zu Occludin erfolgt jeweils über eine PDZ- oder eine GUK-Domäne (Fanning et al., 1998; Haskins et al., 1998; Itoh et al., 1999; Schmidt et al., 2001). Während ZO-1 und ZO-2 über ihre C-terminale Domäne an Aktin binden (Fanning et al., 1998; Itoh et al., 1997; Wittchen et al., 1999), konnte bei ZO-3 eine Interaktion mit dem N-terminalen Bereich nachgewiesen werden (Wittchen et al., 2000).

### 1.1.3 Zell-Zellkontakte und ihre biologische Bedeutung

Die Ausbildung spezifischer Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen ist für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Geweben und Gewebegrenzen von zentraler Bedeutung. Die auf der Zelloberfläche präsentierten Zelladhäsionsmoleküle bestimmen die Affinität der Zellen füreinander. Für die stabile Zelladhäsion durch Cadherine ist neben der Wechselwirkung ihrer extrazellulären Domänen die Verankerung an das Cytoskelett, die durch Catenine vermittelt wird, notwendig. Ein direkter Beweis für die Rolle der cytoplasmatischen Domäne von Cadherinen bei der embryonalen Zelladhäsion stammt aus Studien früher *Xenopus*-Blastulae, bei denen im Ektoderm kurz vor der Gastrulation C-Cadherin exprimiert wird und N-Cadherin in der späteren Neuralplatte auftaucht. Injiziert man vor der Blastulation mRNA, die N-Cadherin ohne die extrazelluläre Domäne codiert, so führt das zu einer gestörten Embryonalentwicklung (Detrick et al., 1990; Huber et al., 1996; Levine et al., 1994). Durch die überexprimierte trunkierte N-Cadherin Variante wird  $\beta$ -Catenin vermehrt gebunden und steht in der Folge für den Aufbau von E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin-Komplexen nicht mehr zur Verfügung. Die hieraus resultierende Zerstörung des Ektoderms während der Gastrulation zeigt, dass die Assoziation des Cadherin/Catenin-Komplexes mit dem Cytoskelett für die stabile Zell-Zelladhäsion essentiell ist.

In verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung sind morphogenetische Prozesse zu beobachten. Diese morphologischen Veränderungen eines Zellverbandes können

grundsätzlich zwei Prozesse zugrunde liegen: Formveränderungen der Zellen sowie Umstrukturierungen des Zellverbands. Den konzertierten Ablauf dieser Prozesse kann man beispielsweise bei der Gastrulation beobachten, bei der ursprünglich epitheliale Zellen eine Umwandlung in mesenchymale Zellen durchlaufen (Savagner, 2001). Dabei nehmen die Zellen eine veränderte, mesenchymale Gestalt an und werden beweglich. Die Fähigkeit von Zellen, zu wandern und ihre Form zu verändern, wird von Umordnungen ihrer intrazellulären Cytoskelettstrukturen bestimmt. Gleichzeitig verlieren die Zellen durch den Verlust von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin und durch die Endocytose von Cadherinen ihre gegenseitige Adhäsion.

Ungefähr 90% aller humanen Tumore entstehen aufgrund abnormaler Proliferation von epithelialen Zellen (Nollet et al., 1999). Seit längerem ist bekannt, dass die interzelluläre Adhäsion von malignen Tumorzellen schwächer ist als die von entsprechenden, nicht entarteten Zellen (Coman, 1944; McCutcheon et al., 1948). Verschiedene Befunde sprechen dafür, dass u.a. die Verminderung oder gar der Verlust der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion Wachstum und Ausbreitung von Tumoren begünstigen können (Birchmeier and Behrens, 1994; Conacci-Sorrell et al., 2002; Hirohashi, 1998). So findet man genetische Mutationen von E-Cadherin und Cateninen in zahlreichen humanen Tumorzelllinien (Oda et al., 1994; Oyama et al., 1994). Protein-Protein-Interaktionsanalysen zeigten, dass Mutationen von  $\beta$ -Catenin dessen Bindung an  $\alpha$ -Catenin schwächen können (Wei et al., 2002). Bei humanen Tumorzellen, die genetische Veränderungen von  $\alpha$ -Catenin aufwiesen, konnte man durch die Transfektion mit Wildtyp- $\alpha$ -Catenin-cDNA die Wiedererlangung der interzellulären Adhäsion herbeiführen (Hirano et al., 1982).

Die Ausbildung Cadherin-vermittelter Zell-Zellkontakte in den *Adherens Junctions* ermöglicht zudem die Ausbildung anderer Zell-Zellkontakte, wie beispielsweise die Formierung von Desmosomen, *Gap Junctions* oder von *Tight Junctions* (Matter and Balda, 2003). Aber auch nach Abschluß der Ausbildung der verschiedenen interzellulären Adhäsionsstrukturen werden die Funktion und Integrität der entsprechenden Zell-Zellkontakte weiterhin durch *Adherens Junctions* beeinflusst. So geht z.B. die Zerstörung der *Adherens Junctions* mit einer funktionalen Beeinträchtigung der *Tight Junctions* einher (Rajasekaran et al., 1996). Es wird schon lange vermutet, dass E-Cadherin auch an der Regulation des Lef-1/TCF- $\beta$ -Catenin-Signalings beteiligt ist (Cox et al., 1996; Fagotto and Gumbiner, 1996; Heasman et al., 1994; Sanson et al., 1996). Angenommen wird, dass der Einbau von  $\beta$ -Catenin in E-Cadherin/Catenin-Komplexe zu einer vermehrten Lokalisation von  $\beta$ -Catenin führt; der Nachweis, dass E-Cadherin selektiv transkriptionskompetentes  $\beta$ -Catenin (Gottardi et al., 2001) bindet, stützt die Hypothese, dass E-Cadherin über dieses Trapping an die Membran auch die damit verbundene Verminderung des Pools von freiem

cytoplasmatischen  $\beta$ -Catenin bewirkt und somit indirekt die Ausbildung des Lef-1/TCF- $\beta$ -Catenin-Transkriptionskomplexes im Kern inhibiert. Folglich müßten stabile Cadherin-vermittelte Zellkontakte und die korrelierende Lokalisation von signal-kompetentem  $\beta$ -Catenin an der Membran das Wachstum von Zellen hemmen. Dieser Vermutung entsprechend führt in Tumorzellen die Reexpression von Cadherinen zu einer verminderten Zellproliferation und Zellmotilität (Miyaki et al., 1995; Navarro et al., 1991). Die Ausbildung Cadherin-vermittelter Zell-Zellkontakte ist auch an der Kontaktinhibition konfluent gewachsener Zellen beteiligt (Miyaki et al., 1995; Navarro et al., 1991; St Croix et al., 1998).

Auch bei der Metastasierung von Tumoren ist der Verlust von E-Cadherin als Ursache des invasiven Wachstumsverhaltens beteiligt (Wei et al., 2002). Beispielsweise findet man in colorektalen Tumoren in den äußeren Bereichen des krankhaften Gewebes eine fehlende Expression von E-Cadherin. Der Verlust von E-Cadherin korreliert mit einer vermehrten Lokalisation von  $\beta$ -Catenin im Kern und geht mit einem invasiven Verhalten der Tumorfront einher. Interessanterweise kann man bei den aus diesen Tumoren hervorgehenden Metastasen normal ausgebildete E-Cadherin-vermittelte Zell-Zellkontakte nachweisen (Brabletz et al., 2001).

#### 1.1.4 Regulation epithelialer Zell-Zellkontakte

Auf molekularer Ebene kann man topologische Veränderungen in Zellverbänden und somit auch morphologische Änderungen von Geweben letztlich als Folge der regulierten räumlichen und zeitlichen Expression von Molekülen ansehen, welche die Zelladhäsion, die Zellmotilität sowie die Zellproliferation steuern. Wie schon im vorherigen Abschnitt erläutert, geht die Umstrukturierung ursprünglich epithelialer Zellverbände oft mit dem Verlust epithelialer und dem Erwerb mesenchymaler Merkmale einher. Dabei kann der Verlust von E-Cadherin bzw. der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion vorübergehender Natur sein, wie man am Beispiel des Wiedererwerbs der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion in den Metastasen hochinvasiver Tumoren beobachten kann. Zellen müssen folglich über Mechanismen verfügen, die Stärke ihrer Zelladhäsion zu steuern.

Mittlerweile kennt man eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, welche die Promotoraktivität des *CDH1*-Gens verändern. E-Cadherin wird durch das *CDH1*-Gen kodiert. Bekanntermaßen inhibieren Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Snail-1 (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000), Slug (Hajra et al., 2002), E12/E47 (Perez-Moreno et al., 2001) und SIP-1 (Comijn et al., 2001) durch ihre Bindung an den *CDH1*-Promotor die Transkription des E-Cadherin-Gens und induzieren eine Umwandlung vom Epithel zum

Mesenchym (EMT). Während man von der *Drosophila*-Embryogenese schon längere Zeit weiß, dass Slug und Snail die Umwandlung vom Epithel zum Mesenchym während der Bildung des Mesoderms maßgeblich beeinflussen, konnte dieses kürzlich auch für die murine Gastrulation gezeigt werden (Nieto, 2002). Neben der transkriptionellen Regulierung der *CDH1*-Promotoraktivität beobachtet man auch, dass die Inhibierung der E-Cadherin-Transkription aufgrund der Methylierung des Promotors erfolgen kann (Grady et al., 2000; Graff et al., 2000; Wheeler et al., 2001).

Neben transkriptionalen Regulationsmechanismen verfügt die Zelle aber auch über die Möglichkeit, die Inaktivierung der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion durch posttranskriptionale Modifikationen herbeizuführen. Beispielsweise weiß man von EGF, FGF und HGF, dass sie über Rezeptortyrosinkinasen weitere Tyrosinkinasen aktivieren, die dann in der Folge verschiedene Komponenten der *Adherens Junctions* phosphorylieren. Die dabei nachgewiesene Tyrosinphosphorylierung von  $\beta$ -Catenin schwächt die Cadherin/Catenin-Bindung (Brady-Kalnay et al., 1995; Fuchs et al., 1996; Kypta et al., 1996). Neben der verringerten Adhäsion kann es nach der Destabilisierung des Cadherin/Catenin-Komplexes zu einem verstärkten Abbau der Proteine kommen. E-Cadherin besitzt im Bereich der  $\beta$ -Catenin-Bindungsstelle mit den aneinanderfolgenden Aminosäuren Pro, Glu, Ser und Thr (PEST) ein Sequenzmotiv, welches durch den Ubiquitin/Proteasomen-Abbauweg degradiert werden kann (Huber et al., 2001). Möglicherweise bewahrt die Bindung von  $\beta$ -Catenin an den cytoplasmatischen Teil von E-Cadherin durch sterische Hinderung E-Cadherin vor den Abbau. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die HGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung von E-Cadherin zur Bindung von Hakai an die cytoplasmatische Domäne von E-Cadherin führt. Hakai katalysiert als E3-Ubiquitin-Ligase die Ubiquitinierung von E-Cadherin und bewirkt somit eine verringerte Halbwertszeit von E-Cadherin (Fujita et al., 2002).

Die Cadherin-vermittelte Adhäsion kann auch durch proteolytische Prozesse beeinflusst werden (Steinhusen et al., 2001). So wurde beispielsweise gezeigt, dass E-Cadherin durch Matrilysin und Stromelysin-1 von der Zelloberfläche abgespalten wird (McGuire et al., 2003). Die durch diesen Shedding-Prozess freigesetzten löslichen E-Cadherin-Fragmente können die E-Cadherin-vermittelte Adhäsion benachbarter Zellen beeinträchtigen (Nawrocki-Raby et al., 2003).

Neben Wachstumsfaktoren und Hormonen beeinflussen regulatorische Peptide biologische Entwicklungsprozesse und Funktionen von Zellen. Im Gegensatz zu klassischen Hormonen wirken regulatorische Peptide oftmals über parakrine und/oder autokrine Signalübertragungswege. Solche Peptide werden häufig gewebespezifisch exprimiert (Dignass and Sturm, 2001).



So werden beispielsweise TFF-Peptide in allen Epithelien des gastrointestinalen Trakts exprimiert und sekretiert (Hoffmann et al., 2001). Diese regulatorischen Peptide üben auf mucinöse Epithelien sowohl eine schützende wie auch regenerative Wirkung aus. Bekanntlich ist die Oberfläche des Gastrointestinal- und des Pulmonal-Traktes einem besonders breiten Spektrum von Noxen sowie einem teilweise extrem sauren Milieu ausgesetzt. Eine permanente Stabilisierung der die Schleimhaut schützenden Mucinschicht ist daher für die Aufrechterhaltung der Integrität des Organismus von großer Bedeutung.

Um bei der hohen Turnover-Rate gastrointestinaler Epithelzellen die Schutzfunktion des Epithels dauerhaft aufrecht erhalten zu können, bedarf es einer stetigen und schnellen Regeneration des Epithels. Hierbei spielen die TFF-Peptide offensichtlich eine entscheidende Rolle. Es gibt erste Hinweise, dass TFF-Peptide die Cadherin-vermittelte Zell-Zelladhäsion beeinflussen (Efstathiou et al., 1998; Liu et al., 1997). Somit ist es durchaus denkbar, dass die bei allen drei humanen TFF-Peptiden nachgewiesenen motogenen Effekte (s.u.) teilweise auf der Modulation Cadherin-vermittelter Zell-Zelladhäsion beruhen.

## 1.2 TFF-Peptide

### 1.2.1 TFF-Peptide und ihre Expression

Die Familie der TFF (Trefoil factor)-Peptide setzt sich aus den drei sekretorischen Polypeptiden TFF1, TFF2 und TFF3 zusammen. Als gemeinsames Strukturmerkmal weisen alle drei TFF-Peptide mindestens eine sogenannte TFF-Domäne auf. Diese Domäne wird durch die folgende Konsensussequenz charakterisiert (Thim, 1997):

C-X<sub>9</sub>-<sub>10</sub>-C-X<sub>9</sub>-C-X<sub>4</sub>-C-C-X<sub>10</sub>-C (mit C werden Cysteinreste, mit X andere Aminosäurereste bezeichnet).

Durch die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken zwischen dem ersten und fünften, dem zweiten und vierten sowie dem dritten und sechsten Cysteinrest (Kinoshita et al., 2000; Thim, 1989) bildet sich eine kleeblattähnliche Sekundärstruktur aus, die dieser Polypeptidfamilie ihren Namen gegeben hat (Thim, 1989; Wright et al., 1997).

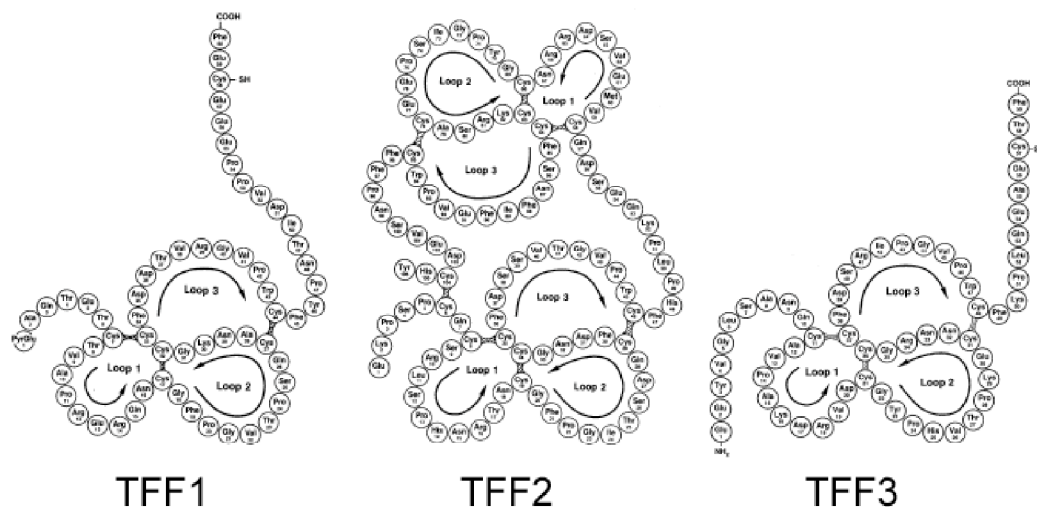


Abb. 1-3: Sekundärstruktur der drei humanen TFF-Peptide (Thim, 1997).

Zunächst bestand keine einheitliche Nomenklatur. TFF1 wurde als pSP2, TFF2 als spasmolytisches Polypeptid (SP) und TFF3 als intestinaler "trefoil factor" (ITF) oder auch hP1.B bezeichnet.

Die Gene, die die drei humanen TFF-Peptide kodieren, liegen innerhalb eines 55kb großen Abschnitts auf dem Chromosom 21q22.3 (Gott et al., 1996; Seib et al., 1997). In den Promotorbereichen der jeweiligen *TFF*-Gene findet man starke Homologien, die eine koordinierte Regulation ihrer Genexpression vermuten lassen (Gott et al., 1996; May and Westley, 1997).

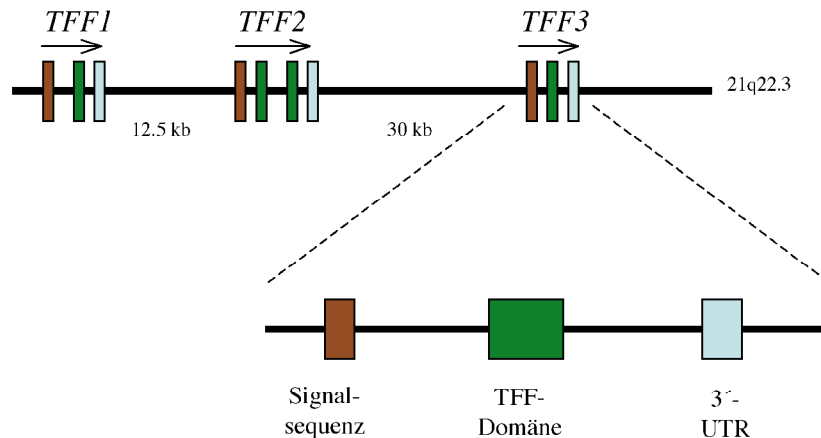


Abb. 1-4: Die Region des Chromosoms 21q22.3, die die drei humanen TFF-Peptide kodieren.

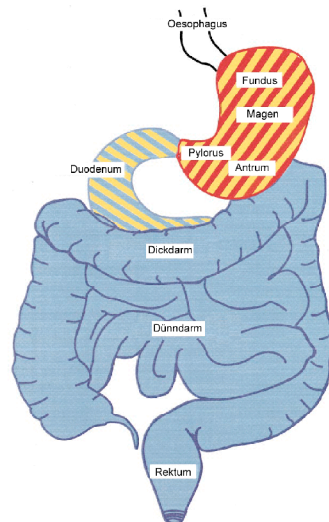
Die *TFF*-Gene kodieren Proteine, die jeweils ein 20 bis 24 Aminosäuren langes Signalpeptid am N-Terminus aufweisen. Im Golgi-Apparat werden sie in Mukusgranula verpackt und zusammen mit Mucinen sekretiert.

Natürlicherweise liegen die TFF1- und TFF3-Peptide im Gegensatz zu TFF2 vor allem als Homodimere vor (Chadwick et al., 1995; Chinery and Cox, 1995; Playford et al., 1995; Thim et al., 1995). Über einen siebten Cysteinrest am C-Terminus können TFF1 und TFF3 über eine intermolekulare Disulfidbrücke Homo- oder Heterodimeren ausbilden (Chinery and Cox, 1995).

TFF-Peptide weisen eine außerordentlich hohe Resistenz gegenüber enzymatischen Abbau und saurer Hydrolyse auf (Jorgensen et al., 1982b; Playford et al., 1995; Thim et al., 1995). Desweiteren sind TFF-Peptide sehr temperaturbeständig (Gmachl et al., 1990). Es wird vermutet, dass diese Eigenschaften zumindest teilweise auf der kompakten Struktur der TFF-Domäne beruhen.

Die Expression und Sekretion von TFF-Peptiden hat man ursprünglich vor allem in der gastrointestinalen Mucosa nachweisen können. Inzwischen wurden TFF-Peptide auch in zahlreichen anderen, zumeist mucinösen Epithelien gefunden.

Im folgenden soll kurz auf das Vorkommen der TFF-Peptide in humanen Geweben eingegangen werden, wobei hauptsächlich die gewebespezifische Expression der TFF-Peptide im Bereich des Gastrointestinaltraktes betrachtet wird.



**Abb. 1-5: Expression der humanen TFF-Peptide im GI-Trakt.** hTFF1 (rot) wird hauptsächlich im Magen, hTFF2 (gelb) im Magen und Duodenum und TFF3 (blau) im Dün- und Dickdarm exprimiert (Ribieras et al., 1998).

TFF1 wurde während des Screenings einer cDNA-Bibliothek in der humanen Brustkrebszelllinie MCF7 entdeckt (Jakowlew et al., 1984; Masiakowski et al., 1982). Das *TFF1*-Gen kodiert ein 84 Aminosäuren großes Polypeptid. Das sekretierte, prozessierte hTFF1-Peptid ist 60 Aminosäuren lang, sein Molekulargewicht beträgt 6.6 kDa. TFF1 enthält eine TFF-Domäne, natürlicherweise liegt es als Monomer sowie als Dimer vor.

TFF1 findet man in gesunden Geweben vor allem im Gastrointestinaltrakt. Während in der Speicheldrüse nur eine sehr schwache und im Oesophagus keine Expression gefunden wurde, ist TFF1 in den Schleimdrüsen des Magens in allen Bereichen nachgewiesen worden (Luqmani et al., 1989; Rio et al., 1988). Im Duodenum zeigen vor allem die duktaalen Lumina der Brunnerschen Drüsen und im übrigen Dünndarm die Spitzen der Mikrovilli eine deutliche TFF1-Expression (Hanby et al., 1993b; Rio et al., 1988). Im Dickdarm ist TFF1 in den Becherzellen nahe der Oberfläche der Krypten schwach exprimiert. Ein schwaches, zum Teil fleckenförmiges Expressionsmuster findet sich in der Gallenblase, im Pankreas und in neuroendokrinen Epithelien (Wright et al., 1990).

TFF2 wurde bei der Gewinnung und Aufreinigung von Insulin aus Schweinepankreas als Verunreinigung entdeckt (Jorgensen et al., 1982a; Jorgensen et al., 1982b). Das fertig prozessierte TFF2-Peptid besteht aus 106 Aminosäuren und enthält zwei TFF-

Domänen. Im gesunden Gewebe sind die Magenschleimhaut, die Brunnerschen Drüsen (Hanby et al., 1993b) und das Gallenblasenepithel (Seitz et al., 1991) die Hauptexpressionsorte. Im Oesophagus und im Dickdarm findet sich kein TFF2.

Als letztes der drei humanen TFF-Peptide wurde TFF3 entdeckt (Hauser and Hoffmann, 1991; Suemori et al., 1991). Nach Abspaltung eines 21 Aminosäuren langen N-terminalen Signalpeptids beträgt das Molekulargewicht dieses 59 Aminosäuren langen Polypeptids 6.8 kDa. TFF3 weist ebenso wie TFF1 nur eine TFF-Domäne auf; gleichfalls liegt es hauptsächlich als Homodimer vor. In Analogie zu den beiden anderen Mitgliedern der TFF-Familie stellt der Gastrointestinaltrakt den Hauptexpressionsort der TFF3-Peptide dar. Sie werden am stärksten in den Becherzellen des Dünndarms und des Kolons, aber auch in den Brunnerschen Drüsen und dem Gallenblasenepithel exprimiert (Hauser et al., 1993; Podolsky et al., 1993). TFF3 findet sich jedoch nicht im Magen und Oesophagus.

Auch außerhalb des Gastrointestinaltraktes sind TFF-Peptide nachgewiesen worden. Sie finden sich hauptsächlich in mucinösen Epithelien mit zum Teil spezifischen Expressionsmustern. Die Co-Expression von TFF-Peptiden mit Mucinen dürfte für die Aufrechterhaltung der Integrität epithelialer Gewebe von Bedeutung sein.

Unter pathologischen Bedingungen ist das Expressionsmuster der TFF-Peptide gewebe- und krankheitsspezifisch verändert. Eine Übersicht der TFF-Expression bei Entzündungen, sowie ulcerösen und tumorösen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes findet sich in der Tabelle 1. Generell kann gesagt werden, dass bei den hierin aufgeführten krankhaften Prozessen eine vermehrte bzw. anormale Aktivierung von TFF-Genen vorliegt, die oft mit einer Co-Expression von TFF-Peptiden und Mucinen einhergeht.

Außerhalb des Gastrointestinaltraktes ist TFF1 zuerst bei Mammakarzinomen beschrieben worden. TFF1-mRNA findet sich bei ca. 2/3 dieser Tumoren (Henry et al., 1991). Während TFF2-Peptide nicht in Mammakarzinomen exprimiert sind, findet sich eine TFF3-Expression in einer Hormonrezeptor-abhängigen Form (Poulsom et al., 1997). Zudem ist die TFF1-Expression bei Tumoren von Gebärmutter, Eierstöcken, Prostata sowie beim medulären Schilddrüsenkarzinom, schleimbildenden Hauttumoren und Adenokarzinomen der Lunge vom bronchoalveolären Typ nachgewiesen worden (Wong et al., 1999). Beim Prostatakarzinom ist TFF1 inzwischen ein nützlicher diagnostischer Faktor für neuroendokrine Differenzierung (Bonkhoff et al., 1995). Die Bedeutung der TFF1-Expression in neuroendokrinen Zellen verschiedener Gewebe und Organe sowie bei neuroendokrinen Tumoren ist noch unklar (Wong et al., 1999).

Tab. 1: Expression der humanen TFF-Peptide bei gastrointestinalen Erkrankungen.

TFF-Peptide	Organ	Beschreibung	Bemerkung	Referenz
TFF1	Oesophagus	Barrett-Metaplasie, Ulcera, Karzinome	distaler Oesophagus	(Hanby et al., 1994; Labouvie et al., 1999)
	Magen	Ulcera, intestinale Metaplasie, hyperplastische Polypen, Karzinome (diffuser > intestinaler Typ)	Verlust bei 50% der Karzinome	(Henry et al., 1991; Luqmani et al., 1989; Theisinger et al., 1991)
	Dünndarm	gastrale Metaplasie, Ulcera, Entzündungen, Hyperplasie endokrine Mukosazellen	Morbus Crohn	(Hanby et al., 1993a; Khulusi et al., 1995)
	Dickdarm	Entzündungen, Ulcera, hyperplastische Polypen, Adenome, Adenokarzinome	Morbus Crohn	(Hanby et al., 1993c; Welter et al., 1994) (Labouvie et al., 1999)
	Pankreas/ Gallenwege	Endzündungen, Karzinome		(Collier et al., 1995; Welter et al., 1992)
TFF2	Oesophagus	Barrett-Metaplasie, Karzinome	distaler Oesophagus	(Hanby et al., 1994; Labouvie et al., 1999)
	Magen	hyperplastische und metaplastische schleimbildende Zellen, Ulcera		(Machado et al., 2000; Theisinger et al., 1991)
	Dünndarm	gastrale Metaplasie, Ulcera	Duodenum (Ulcus-Basis)	(Wright, 1993)
	Dickdarm	hyperplastischer Polyp, Adenome, Adenokarzinome, Ulcera (selten)	selten	(Wong et al., 1999)
	Pankreas/ Gallenwege	Karzinome		(Welter et al., 1992), (Seitz et al., 1991)

(Fortsetzung: *Expression der humanen TFF-Peptide bei gastrointestinalen Erkrankungen.*):

TFF-Peptide	Organ	Beschreibung	Bemerkung	Referenz
TFF3	Oesophagus		nicht beschrieben	
	Magen	Ulcera, intestinale Metaplasie		(Wong et al., 1999)
	Dünndarm	gastrale Metaplasie, Ulcera		(Wong et al., 1999)
	Dickdarm	Ulcera, hyperplastische Polypen, Adenome, Adenokarzinome (mucinöser Typ)	selten nur mRNA, Verlust bei Tumornekrosen	(Hlanby et al., 1993c; Taupin et al., 1996)
	Pankreas/ Gallenwege		nicht beschrieben	

### 1.2.2 Biologische Wirkungen der TFF-Peptide

Zahlreiche Untersuchungen stützen die Annahme, dass TFF-Peptide eine schleimhautprotektive und heilungsfördernde biologische Wirkung haben. Diese Effekte werden vor allem auf schleimstabilisierende und motogene Eigenschaften der TFF-Peptide zurückgeführt, die offensichtlich bei der epithelialen Restitution von Schleimhautschädigungen von großer Bedeutung sind. Zellproliferative Wirkungen konnten bisher nicht nachgewiesen werden.

Die Annahme einer motogenen Wirkung der TFF-Peptide stützt sich auf Beobachtungen, dass die TFF-Expression unmittelbar nach einer Gewebeschädigung hochreguliert wird. Parallel hierzu zeigte sich eine Wanderung von Epithelzellen in den Wundbereich, wo sie den zerstörten Gewebereich bedecken. Die Beteiligung aller drei TFF-Peptide am Zellmigrationsprozess im Rahmen der Wundheilung konnte inzwischen mit Hilfe von Zellmigration-Assays und rekombinanten TFF-Peptiden nachgewiesen werden (Wong et al., 1999). Zudem zeigten murine Mammakarzinom-Zelllinien, die mit humanem TFF1 transfiziert wurden, ein diffuses Ausbreitungsmuster in dreidimensionalen Kollagengelen (Williams et al., 1996). TFF2 und TFF3 entfalten ihre motogene Wirkung auf Zellmonolayer, in denen Wunden gesetzt wurden, in einer

TGF- $\beta$ -unabhängigen Art (Dignass et al., 1994; Playford et al., 1995). Im Gegensatz hierzu wird die Wundheilung durch EGF und TGF- $\alpha$ , die neben mitogenen auch motogene Eigenschaften besitzen, über TGF- $\beta$ -Rezeptoren an der basolateralen Seite des Epithels vermittelt (Levi et al., 1993).

Das Vorhandensein von zwei TFF-Domänen ist für die biologische Wirkung von TFF-Peptiden offensichtlich von entscheidender Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass TFF2-Peptide wirksamer vor einer Schleimhautschädigung durch Indomethacin schützen als ein modifiziertes TFF2-Peptid mit nur einer TFF-Domäne (Marchbank et al., 1998). Dabei vermittelt die Ausbildung von intermolekularen Disulfid-Brücken eine stärkere Zellmigration als die monomere Form von TFF2. Die Dimerisierung dürfte somit auch für die biologischen Funktionen von TFF1- und TFF3-Peptiden von großer Bedeutung sein. Verhindert man z.B. bei TFF1-Peptiden die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken, indem man die daran beteiligten Cysteinreste mutiert, so zeigen die monomeren Mutanten keinerlei motogenen Effekte mehr (Chadwick et al., 1997).

Analysen bei knock-out Mäusen ergaben weitere Hinweise auf die restitutive und protektive Wirkung der TFF-Peptide. So bilden *TFF1* knock-out Mäuse keine epitheliale Schleimschicht im Magen. Bei allen Tieren traten epitheliale Entartungen und bei einem Drittel der Tiere Magentumore auf (Lefebvre et al., 1996). Zwar zeigen *TFF2* und *TFF3* knock-out Mäuse einen normalen Phänotyp, aber auch hier führte die orale Gabe von Noxen (Indomethacin) zu einer erhöhten Anfälligkeit für Schleimhautschädigungen (Farrell et al., 2002). Zudem verstarben *TFF3* knock-out Mäuse kurz nach der Gabe von SDS an einer Colitis, die bei normalen Mäusen nur zu einer leichten, vorübergehenden Entzündungsreaktion im Darm führt. Umgekehrt wirkt rekombinantes TFF3 in *TFF3* knock-out Mäusen protektiv. So führte die rektale Gabe von rekombinantem TFF3 bei *TFF3* knock-out Mäusen nach Schädigungen der Mucinschicht durch Essigsäure zu einer normalen Heilung (Mashimo et al., 1996).

Die TFF-Peptide wirken sowohl bei oraler wie auch bei subcutaner Verabreichung. Allerdings benötigt man bei oraler Gabe deutlich höhere Dosen, um vergleichbare Effekte zu erzielen (Farrell et al., 2002; Playford et al., 1995). Diese Befunde wurden an einem Rattenmodell erhoben, bei dem mit Indomethacin Magenulcera induziert wurden. TFF2-Gabe führte zu einer verminderten Schädigung, wobei für die Erzielung eines vergleichbaren protektiven Effektes bei oraler Applikation eine Vielfach höhere Dosis eingesetzt werden mußte (Babyatsky et al., 1996). Aus den Beobachtungen wird vermutet, dass TFF-Peptide vornehmlich basolateral wirken. Dies läßt eine Rezeptor-vermittelten Wirkungsmechanismus annehmen. Der Nachweis eines entsprechenden



TFF-Rezeptors steht allerdings noch aus (Carr, 1992; De et al., 1994; Frandsen et al., 1986; Gajhede et al., 1993).

Der zweite wichtige Wirkungsmechanismus der TFF-Peptide besteht in der Interaktion mit Mucinen. So erhöhte die Applikation von TFF2 und TFF3 die Viskosität von Mucingelen *in vitro* (Babyatsky et al., 1996; Hauser and Hoffmann, 1992). Bisher wurde nur die direkte Interaktion von TFF1 mit den C-Termini der murinen Mucinproteine Muc2- und Muc5AC experimentell nachgewiesen (Longman et al., 2000; Tomasetto et al., 2000). Es wird aber auch eine Bindung der TFF-Peptide an den Oligosaccharid-Teil von Mucinen vermutet (Tanaka et al., 1997). Somit könnten TFF-Peptide als Quervernetzer von Mucinen wirksam sein. Dieses steht mit der Hypothese im Einklang, dass TFF-Peptide und Mucine auf synergetische Weise eine schützende und regenerative Wirkung auf die schleimbildenden Epithelien ausüben (Sands and Podolsky, 1996; Tomasetto et al., 2000).

Die Erkenntnis, dass alle drei TFF-Peptide motogene Eigenschaften besitzen, weisen darauf hin, dass TFF-Peptide nicht nur Einfluß auf die Zelloberfläche von Epithelzellen bzw. deren zelluläre Umgebung haben, sondern auch gezielt intrazelluläre Prozesse beeinflussen. Man diskutiert zur Zeit zwei Hypothesen, mit denen man die beobachteten Effekte der TFF-Peptide zu erklären versucht. Zum einen wäre die Aktivierung eines putativen TFF-Rezeptors denkbar, zum anderen wird eine Wirkung von TFF-Peptiden als Co-Faktoren anderer Liganden in Erwägung gezogen (Taupin and Podolsky, 2003).

Zahlreiche Signaltransduktionswege werden mit der biologischen Aktivität von TFF-Peptiden in Verbindung gebracht. Dies beinhaltet u.a. den PI-3-Kinase/AKT-Signalweg, die Rho-/ROCK-Kaskade, sowie den Cox-2/TXA<sub>2</sub>-R/Gap-, den PLC/PKC-, den MAP-Kinase- und den EGFR-Signalweg (Emami et al., 2001; Graness et al., 2002; Kinoshita et al., 2000; Rodrigues et al., 2003a; Rodrigues et al., 2001; Rodrigues et al., 2003b). So vermindert TFF3 die ERK-Aktivität. ERK ist eine Mitglied der MAP-Kinasen. Die Wirkung von TFF3 auf ERK konnte durch Tyrosinphosphatase-Inhibitoren aufgehoben werden. Dies läßt vermuten, dass die Effekte von TFF3 u.a. durch Tyrosinphosphatasen vermittelt werden (Kanai et al., 1998). Auch ist bekannt, dass bei colorektalen Karzinomzellen HT-29 die Inkubation mit rekombinatem TFF3 im Zellkulturmedium die Tyrosinphosphorylierung von EGFR und  $\beta$ -Catenin bewirkt (Liu et al., 1997). In einer weiteren Untersuchung an HT-29-Zellen konnte nach Inkubation mit rTFF3 eine Reduktion der Mengen an E-Cadherin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden (Efsthathiou et al., 1998). Diese Wirkung von rTFF3 konnte durch die Gabe eines Tyrosinkinase-Inhibitors aufgehoben werden. Aufgrund dieser Untersuchungen muß man davon ausgehen, dass die motogene Wirkung von TFF3 zumindest teilweise auf der Modulation und Störung des E-Cadherin/Catenin-Adhäsionskomplexes beruht.

### 1.3 Fragestellung

Aus den bislang vorliegenden experimentellen Befunden zu den biologischen Wirkungen von TFFs leitet sich die Hypothese ab, dass die motogenen Eigenschaften von TFFs auf einer Modulation von Zellkontaktstrukturen, insbesondere des Cadherin/Catenin-Adhäsionskomplexes, beruhen. Unklar blieb, über welche molekularen Mechanismen TFF-Peptide ihre Wirkung auf die Zelladhäsion entfalten. Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, diese Frage durch Untersuchungen des Einflusses von hTFF3 auf die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion an einem geeigneten epithelialen Zellkulturmodell aufzuklären.

Hierzu sollte

1. ein epitheliales Zellkulturmodell entwickelt werden, bestehend aus einem hTFF3-defizienten Wildtyp und einer durch stabile Transfektion generierten Mutante, die hTFF3 in einer biologisch aktiven Form sezerniert,
2. an diesen Zellkulturmodellen geprüft werden, ob sezerniertes hTFF3 autokrin die Migration von Epithelzellen beeinflusst,
3. bei Nachweis einer solchen autokrinen motogenen Wirkung der Einfluss von hTFF3 auf den Komplex der *Adherens Junctions*- und der *Tight Junctions*-Proteinen untersucht werden. Überprüft werden sollte dabei sowohl ein Einfluss auf der transkriptionellen wie der posttranslationalen Ebene.

Die zu erarbeitenden Ergebnisse sollten einen Beitrag zu einem verbesserten Verständnis der biologischen Rolle von TFF-Peptiden im Gastrointestinaltrakt und anderen epithelialen Geweben leisten.