

Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Aus der Medizinischen Klinik I
Gastroenterologie / Infektiologie / Rheumatologie
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Zeitz

Analyse der Genexpression von Tight Junction-Proteinen der Claudin-Genfamilie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades Doctor rerum medicarum
an der Charité – Universitätsmedizin Berlin

vorgelegt von: **Shida Tavalali**

aus: Teheran, Iran

Referent: Prof. Dr. med. Jörg-Dieter Schulzke

Korreferent: Prof. Dr. Otmar Huber

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin,
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 25. 2. 2005

تقدیم به تمام عزیزانم
همسر و پسر م به پاس حمایتها و یاریهایشان
مادرم را به پاس رنجهای و زحمات بیدریغش
و همچنین پدر و خواهر از دست رفته ام که یادشان همواره با من و در قلب من است.

Ich widme diese Arbeit meiner lieben Familie,
meinem Mann und meinem Sohn für die Unterstützung und Motivation,
meinen Eltern die mir diese Arbeit durch ihren Rückhalt und ihre Unterstützung erst ermöglichen haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Epithelien	6
1.2 Zell-Zellverbindungen	8
1.3 Tight Junction-Proteine	9
1.4. Der Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine auf die epitheliale Barriere bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	17
1.5. Die Regulation der Genexpression von Tight Junction Proteinen	19
2. Fragestellung	22
3. Material und Methoden	23
3.1. Material	23
3.1.1. Geräte	23
3.1.2. Chemikalien.....	23
3.1.3. Materialien.....	26
3.1.4. Zelllinien	27
3.1.5. Puffer und Lösungen	27
3.2. Molekularbiologische Methoden	30
3.2.1. Genome Walking.....	30
3.2.2. Herstellung von cDNA	32
3.2.3. Screening genomischer Bibliotheken	34
3.2.4. Aufreinigung von DNA Fragmenten.....	36
3.2.5. Ligation von DNA Fragmenten in Plasmide.....	37
3.2.6. Transformation in kompetente Zellen	38
3.2.7. Plasmid-Miniprep.....	38
3.2.8. Plasmid-Midiprep (endotoxinfrei).....	39
3.2.9. Restriktionsverdau.....	39
3.2.10. Polymerase I-Klenow-Reaktion	40
3.2.11. Sequenzierung von DNA.....	40
3.2.12. Glycerolstocks	41
3.2.13. Agarosegel-Elektrophorese	41
3.2.14. Herstellung einer mit Digoxigenin markierten DNA-Sonde.....	41
3.2.15. Southern Blot.....	42
3.3. Zellbiologische Arbeitsmethoden	44
3.3.1. Zellkultur.....	44
3.3.2. Passagieren von Zellen	44

3.3.3.	Bestimmung der Zellzahl	44
3.3.4.	Transfektion eukaryontischer Zellen.....	45
3.3.5.	Reporter-gen-Assay	45
3.4.	Elektrophysiologische Methoden	46
3.4.1.	Messung des Transepithelialen Widerstandes.....	46
4.	Ergebnisse	48
4.1	Identifizierung der Promotoren für Claudin-2 und Claudin-4 mittels Genome Walking	48
4.1.1.	Amplifikation Claudin-2-spezifischer Sequenzen.....	48
4.1.2.	Amplifikation Claudin-4-spezifischer Sequenzen.....	50
4.2.	Identifizierung der Promotoren für Claudin-1 und Claudin-3 mittels genomischer Bibliotheken	51
4.2.1	Herstellung der Claudin-1-spezifischen Sonde und Identifikation des genomischen Klons	52
4.2.2.	Subklonierung der Claudin-1-Promotor-spezifischen Sequenzen	53
4.2.3.	Herstellung der Claudin-3-spezifischen Sonde und Identifikation des genomischen Klons	54
4.2.4.	Subklonierung der Claudin-3-Promotor-spezifischen Sequenzen	55
4.3.	Sequenzierung der Claudin-Promotoren.....	57
4.3.1.	Sequenzierung des Claudin-1 Promotors.....	57
4.3.2.	Sequenzierung des Claudin-2 Promotors.....	59
4.3.3.	Sequenzierung des Claudin-3 Promotors.....	60
4.3.4.	Sequenzierung des Claudin-4 Promotors.....	62
4.4.	Funktionelle Analyse der Claudin-spezifischen Promotoren	63
4.4.1.	Klonierung in den Luciferase Reporter-gen-Vektor.....	63
4.4.2.	Verkürzung einzelner Promotorsequenzen	64
4.4.3.	Transfektion in HT-29/B6-Zellen und Nachweis der Promotor-Aktivität.....	65
4.4.4.	Einfluss von pro-inflammatorischen Zytokinen auf die Claudin- Promotor-Aktivität.....	69
5.	Diskussion	74
6.	Zusammenfassung	82
7.	Abkürzungsverzeichnis	84
8.	Literaturverzeichnis.....	85

Danksagung

Diese Arbeit wurde an der Medizinischen Klinik I, Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie und am Institut für Klinische Physiologie am Campus Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke und Herrn Prof. Dr. Michael Fromm danke ich, dass sie es mir ermöglicht haben, in ihren Arbeitsgruppen meine Doktorarbeit anzufertigen. Ich bedanke mich auch für die intensive Betreuung und für die zahlreichen Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Dr. Joachim Mankertz möchte ich mich besonders herzlich für die ausgezeichnete und intensive Betreuung bedanken.

Allen meinen Kollegen, insbesondere Frau Sonja Dullat, Frau Anja Fromm, Frau Friederike Hirsch, Frau Ingrid Lichtenstein, Frau Sieglinde Lüderitz, Frau Brigitte Papanis und Frau Susanna Schön danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Bei Herrn Dr. Salah Amasheh, Herrn Dipl.-Biochem. Bernd Hillenbrand, Prof. Dr. Otmar Huber, Frau Luise Kösel, Frau Dr. Rita Rosenthal und Herrn Ing. Detlef Sorgenfrei möchte ich mich für ihre technischen Hilfestellungen und fachliche Beratung bedanken.

Bei meinem Mann Farzad Ahrari und meinem Sohn Tejaw möchte ich mich ganz herzlich für ihr Verständnis und ihre ausgesprochene Geduld, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Ich möchte mich auch bei meinen beiden Freunden Mahnaz und Mehdi Akbari für ihre Aufmunterung während dieser Zeit bedanken.