

5. Diskussion

Tight Junction-Proteine

Tight Junctions erfüllen im epithelialen Zellverband eine Doppelfunktion: Sie verhindern, dass gelöste Substanzen ungehindert zwischen den Zellen durch das Epithel hindurch treten, und erhalten damit auf beiden Seiten des Epithels unterschiedliche Stoff-Konzentrationen aufrecht. Außerdem dienen die Tight Junctions innerhalb der Plasmamembran als Diffusionsbarrieren, welche die verschiedenen Plasmamembran-Proteine der Zelle in den einzelnen Membrandomänen festhalten. Die Plasmamembranen benachbarter Epithelzellen werden dabei von einem dichten Netzwerk aus *strand*-bildenden Tight Junction-Proteinen zusammengehalten. Zu diesen Tight Junction-Proteine gehören neben Occludin und JAM Mitglieder der Claudin-Familie. Inzwischen sind 24 verschiedene Claudine bekannt.

Claudine gehören zur Gruppe der integralen Membranproteine und haben ein Molekulargewicht von 21-27 kDa. Nach den gängigen Modellvorstellungen bilden sie vier Transmembran-Domänen und damit zwei extrazelluläre Loops und einen kurzen intrazellulären Loop (Furuse et al., 1998a). Sie besitzen eine kurze aminoterminal Domäne und eine längere carboxyterminale Domäne. Claudin-1 wird in zahlreichen Geweben wie z.B. Leber, Niere, Milz, Darm exprimiert. Die Claudin-2-Expression wurde unter anderem in den Krypten von Dünn- und Dickdarm in der Leber und im Pankreas beobachtet. Claudin-3 findet sich im Oberflächen-Epithel des Magens, in Leber, in Krypten und Villi des Dünndarms sowie in Krypten und im Oberflächen-Epithel des Dickdarms. Claudin-4 wird in den Villi des Dünndarms und im Oberflächen-Epithel des Dickdarms exprimiert (Rahner et al., 2001). Die Claudine haben unterschiedliche funktionelle Bedeutung. So ist Claudin-1 für die Abdichtung der Tight Junction von essentieller Bedeutung (Furuse et al., 2002). Claudin-2 dagegen ist an der Ausbildung Kationen selektiver Kanäle beteiligt (Amasheh et al., 2002; Anderson, 2001). Claudin-3 und Claudin-4 sind außerdem unter infektiologischen Gesichtspunkten von Bedeutung. Sie binden spezifisch einen extrazellulären Ligan den, das *Clostridium perfringens* Enterotoxin (Katahira et al., 1997).

Identifizierung und Struktur-Analyse der Promotoren von Claudin-1, -2, -3 und -4

Es wird allgemein angenommen, dass die komplexe Verteilung der Tight Junction-Proteine und ihre funktionelle Vielfalt die Grundlage für die unterschiedliche Dichtigkeit verschiedener Epithelien darstellt. Im Laufe der Differenzierung epithelialer Zellen ist es daher notwendig, dass Zelltyp-spezifische Transkriptionsfaktoren im Konzert mit den *in cis* essentiellen regulatorischen Elementen die differentielle Genexpression der Tight Junction-Proteine steuern. Die Identifizierung von Promotoren bildet daher die Grundlage für die Untersuchung der an der Regulation der Genexpression beteiligten Faktoren und Signaltransduktionswege unter physiologischen aber auch pathophysiologischen Gesichtspunkten.

Im Laufe dieser Arbeit ist es gelungen, die Promotor-Sequenzen für Claudin-1, -2, -3 und -4 zu identifizieren und in ihrer Funktion zu untersuchen. Mit Hilfe der Genome Walking Methode wurden ausgehend von der bereits bekannten cDNA-Sequenz mit genspezifischen Primern aus humaner genomischer DNA Fragmente mit den potentiellen Promotorbereichen für die humanen Tight Junction-Proteine Claudin-2 (420 bp) und Claudin-4 (357 bp) amplifiziert. Zur Identifikation der regulatorischen Sequenzen von Claudin-1 und Claudin-3 wurden genomische Cosmid-Bibliotheken verwendet, die uns über eine Kooperationsvereinbarung mit dem Deutschen Ressourcenzentrum für das humane Genom-Forschung (RZPD) zur Verfügung gestellt wurden. Nylon-Membranen mit den darauf immobilisierten genomischen Cosmid-Klonen führten nach Hybridisierung mit Claudin-1- und Claudin-3-spezifischen radioaktiven Sonden zur Identifizierung genspezifischer Klone. Subklonierungen aus den Cosmid-Klonen nach Fragmentierung durch Restriktionsenzyme führten in der Folge zur Isolierung von genomischen DNA-Fragmenten mit dem potentiellen Promotorbereichen für Claudin-1 (1772 bp, davon wiederum ein 789 bp Subfragment) und Claudin-3 (628 bp).

Das 789 bp Claudin-1-spezifische Promotor-Fragment umfasst den Transkriptionsstartpunkt und 5' aufwärts liegende Sequenzen des humanen Claudin-1-Gens. Der Vergleich zwischen dem in dieser Arbeit gefundenen Promotor und der publizierten genomischen Sequenz des Claudin-1-Gens (Genbank Nr. AF260403; Krämer et al., 2000) zeigte einen Austausch an drei Stellen im Bereich der 5'-untranslatierten Region. Diese Austauschstellen lassen sich einem Mustern von Basensubstitutionen aufgrund von Single Nucleotide Polymorphism (SNP) zuordnen

und haben nach bisherigen Erkenntnissen keinen Einfluss auf eine veränderte Regulation der Claudin-1-Expression etwa bei Brustkrebserkrankungen (Krämer et al., 2000). Auf dem Claudin-1-Promotor wurden drei Gruppen von potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie ZO-1 und ZONAB, NF- κ B und LEF/TCF gefunden. ZONAB ist im Nukleus und an der Tight Junction lokalisiert und bindet an der SH3 Domäne des ZO-1-Proteins. Experimente haben gezeigt, dass die Expression von ZONAB und ZO-1 an der Regulation der parazellulären Permeabilität beteiligt sind (Balda & Matter, 2000b). Der funktionelle Beweis für den Effekt von ZONAB und ZO-1 auf die Genexpression wurde anhand des erbB-2 Proto-Onkogen geführt. Es deutet daher vieles darauf hin, dass diese beiden Proteine für Signaltransduktionswege, welche die epitheliale Differenzierung und Morphogenese regulieren, eine wichtige Rolle spielen (Balda & Matter, 2000a).

Die Strukturanalyse der Claudin-2 Promotorsequenz ergab Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen für die intestinalen *Caudal-related Homeodomain*-Proteine (Cdx1 und Cdx2), für LEF/TCF und für NF κ B. Die Claudin-2 Promotorregion enthält außerdem eine potentielle Bindungsstelle für den *Hepatocyte Nuclear Factor* (HNF-1 α). In Untersuchungen mit HNF-1 α -defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass HNF-1 α an der komplexen Regulation der Claudin-2-Expression entlang der Krypten-Villus-Achse im murinen Ileum beteiligt ist (Sakaguchi et al., 2002). In eigenen Arbeiten konnte die funktionelle Bedeutung des Wnt-Signaltransduktionsweges nachgewiesen werden. In murinen C57-Zellen, die Wnt-1 exprimieren, ist die Aktivität des Claudin-2-Promotors deutlich erhöht gegenüber der Aktivität in Wnt-1-defizienten C57-Zellen (Mankertz et al., 2004). In Band Shift-Analysen wurde nachgewiesen, dass die Bindung des nukleären Effektors für den Wnt-Signaltransduktionsweg, LEF-1, an der ersten, nicht aber an der zweiten LEF/TCF-Bindungsstelle erfolgt. Die Co-Expression von LEF-1 zusammen mit β -Catenin führt zu einer Erhöhung der Claudin-2-Promotor-vermittelten Genexpression. Die Mutation der ersten LEF/TCF-Bindungsstelle führt zu einer verminderten Aktivierung durch LEF-1/ β -Catenin (Mankertz et al., 2004). Cdx1 und Cdx2 sind für die Regulation der Genexpression einer Vielzahl spezifischer intestinaler Gene durch Bindung an entsprechende Promotor-Sequenzen verantwortlich (Suh et al., 1994). In der intestinalen Caco-2 Zelllinie spielen sie bei der Transkription von Sucrase-Isomaltase und Lactase-Phlorizin-Hydrolase, zwei Markergenen der intestinalen Differenzierung, eine wichtige Rolle (Lorentz et al., 1997). Eine kürzlich erschienene Arbeit hat gezeigt, dass Cdx1 und

Cdx2 den Claudin-2-Promotor in Caco-2-Zellen aktivieren (Sakaguchi et al., 2002). Die Expression von Cdx1 wird durch den Wnt-Signaltransduktionsweg reguliert (Lickert et al., 2000). In unserer Arbeitsgruppe konnte belegt werden, dass die Mutation der Cdx-Bindungsstellen im Claudin-2-Promotor eine Aktivierung durch LEF-1/ β -Catenin verhindert (Mankertz et al., 2004). Daraus lässt sich ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Cdx- und LEF/TCF-vermittelten Regulation der Claudin-2-Genexpression ableiten.

In den Promotor-Regionen für die Tight Junction-Proteine Claudin-3 und Claudin-4 wurden ebenfalls potentielle Bindungsstellen für LEF/TCF und NF κ B lokalisiert. Auf dem Claudin-3-Promotor findet sich darüber hinaus eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor ZONAB.

Funktionelle Analyse der Promotor-Fragmente

Die isolierten Promotor-Fragmente wurden zum Nachweis der Promotor-Funktion ganz oder teilweise in einen Luciferase Reporter-Gen-Vektor eingebaut. Das Luciferasegen wird nur dann exprimiert, wenn ein aktiver Promotor vorhanden ist. Alle identifizierten Promotoren für die Claudine-1- bis -4-vermittelten spontan im Reporter-Gen-Assay die Expression des Luciferase-Gens. Dabei zeigte der Promotor für Claudin-1 die stärkste und für Claudin-3 die schwächste Aktivität, die aber immer noch deutlich über der Basisaktivität des promotorlosen Reporter-Gen-Vektors pGL3-Basic lag. Die relativ niedrige Aktivität des Claudin-3 Promotors ist möglicherweise damit zu erklären, dass bis zum vorhergesagten Transkriptionsstartpunkt noch etwa 40 bp liegen. Nach Invertierung der Promotorfragmente relativ zum Reporter-Gen konnte bei den Konstrukten für Claudin-1, -2 und -3 eine vollständige oder zumindest teilweise Verminderung der Aktivität gemessen werden, wie dies für die unidirektionale Wirkungsweise eines Promotors auch zu erwarten ist. Lediglich Claudin-4 zeigte keine Verminderung der Reporter-Gen-Aktivität, was auf einen Promotor für eine in entgegengesetzter Richtung vom Claudin-4-Gen stromaufwärts gelegene Transkriptionseinheit deutet. Zur weiteren Eingrenzung der Promotor-Aktivität wurden die Promotorfragmente für Claudin-1 von 798 bp auf 384 bp bzw. für Claudin-2 von 267 bp auf 148 bp in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstartpunktes verkürzt. Die Verkürzung führte bei Claudin-1 zu einer leichten aber signifikanten bzw. bei Claudin-2 zu einer deutlichen Verringerung der Promotoraktivität, was auf wichtige *in cis*-essentielle Sequenzen im Bereich der Deletionen hinweist. Von der Deletion im Be-

reich des Claudin-2-Promotors ist unter anderem die linke der beiden Cdx-Bindungsstellen betroffen.

Der Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine auf die Claudin-Genexpression

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie z.B. Colitis ulcerosa sind mit einer Änderung der Barrierefunktion assoziiert (Schmitz et al., 1999a). Verschiedene pro-inflammatorische Zytokine werden bei chronisch entzündlichen Darmkrankheiten verstärkt im Bereich der subepithelialen Zellen exprimiert (Cannistra et al., 1987) und haben Einfluss auf die Expression von Tight Junction-Proteinen. Die Regulationsmechanismen, die zu einer Zytokin-vermittelten Barrierefunktionsstörung führen, sind bis heute weitgehend unverstanden. IL-17 induziert die Bildung der Tight Junction und ist mit der Zunahme der Claudin-1- und -2-Genexpression korreliert (Kinugasa et al., 2000). $\text{TNF}\alpha$ reduziert den transepithelialen Widerstand in der Colon Carcinomzelllinie HT-29/B6 (Schmitz et al., 1999b). Die beiden Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ reduzieren die Occludin-Promotor-vermittelte Genexpression (Mankertz et al., 2000). Die Abnahme der Occludin-Expression in Astrozyten durch $\text{TNF}\alpha$ wird durch den TNF Typ-1-Rezeptor und nachfolgende NF- κ B-Aktivierung vermittelt (Wachtel et al., 2001). Zahlreiche Arbeiten weisen darauf hin, dass verschiedene Protein-Kinase C (PKC)-Isoformen mit Veränderungen der parazellulären Permeabilität assoziiert sind (Clark et al., 2000; Dodane & Kachar, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Barriere-Effekte durch PKC-Inhibitoren unterdrückt werden können (Coyne et al., 2002). Im Bronchialepithel von Patienten mit zystischer Fibrose (CF), einer mit chronischer Entzündung assoziierten Erkrankung der Atemwege, wurde eine vermehrte Expression des Signal Transducer and Activator of Transkription-1 (STAT-1), einer Komponente des $\text{IFN}\gamma$ Signaltransduktionsweges, beobachtet (Kelley & Elmer, 2000). Auch konnten erhöhte Menge an $\text{IFN}\gamma$ -mRNA im Bronchialepithel gemessen werden (Wojnarowski et al., 1999).

Auf der Ebene der genomischen DNA ist der Promotor ein entscheidendes *in cis*-essentiell Element. Zur Analyse der Genexpression von Tight Junction-Molekülen wurde als erstes in unserer Arbeitsgruppe der Promotor von Occludin als *in cis*-regulatorisches Element mit molekularbiologischen Arbeitsmethoden identifiziert (Diplomarbeit S. Tavalali, 1999; Mankertz et al., 2000). Es wurde nachgewiesen, dass ein 1853 bp großes Fragment den funktionsfähigen Promotor für das Occludin-

Gen enthält. In unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die pro-inflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ die Occludin-Promotor-vermittelte Genexpression alleine und in Kombination sogar in synergistischer Weise reduzieren (Mankertz et al., 2000). Neuere Studien haben ergeben, dass die Occludin-Genexpression zusätzlich durch differentielles Spleißen und einen alternativen Promotor charakterisiert ist. Auch dieser Promotor mit einer Länge von 325 bp wurde auf seine Aktivität in der humanen intestinalen Zelllinie HT-29/B6 untersucht. Die Aktivität dieses Promotors lässt sich ebenfalls durch Zugabe von $\text{TNF}\alpha$ vermindern (Mankertz et al., 2002).

Die bisherigen Befunde lassen also darauf schließen, dass die Veränderung der Tight Junction-Protein-Expression an entzündungsbedingten Permeabilitätsstörungen beteiligt ist. Daher wurde die Wirkung von pro-inflammatorischen Zytokinen (u.a. $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$) auf die Aktivität der hier isolierten Promotoren für die Tight Junction-Proteine Claudin-1, -2, -3 und -4 in der intestinalen Zelllinie HT-29/B6 untersucht. Diese Zelllinie ist ein geeignetes Zellkulturmodell für die Untersuchung der epithelialen Barrierefunktion, da sich aus ihr ein dichter, einschichtiger Epithelzellverband kultivieren lässt, der durch Tight Junctions abgedichtet wird. Der elektrische Widerstand, der über dem Epithel gemessen werden kann, kann als Maß für die Wirkung von Effekten verwendet werden, die die epitheliale Barriere beeinflussen. Weiterhin reagiert diese Zelllinie auf die Stimulation durch pro-inflammatorische Zytokine. Durch Inkubation des HT-29/B6-Epithelzellverbandes mit Zytokinen konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass $\text{TNF}\alpha$ eine Verminderung des transepithelialen Widerstandes hervorruft. Es werden zwei wesentliche Ursachen für die Abnahme des Widerstandes angenommen: 1) die Zunahme apoptotischer Lecks und 2) die Veränderungen an der Tight Junction. Messungen mit der Conductance Scanning-Technik ergaben eine Zunahme der mit Apoptosen verbundenen lokalen Leitfähigkeit nach Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$. Danach ist die aber Apoptose nur für etwa die Hälfte (56%) für der durch $\text{TNF}\alpha$ induzierten Permeabilitätszunahme verantwortlich, während die andere Hälfte durch Veränderungen der Tight Junction in nicht-apoptotischen Bereichen verursacht wird (Gitter et al., 2000). Mit der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass es durch $\text{TNF}\alpha$ zu einer Abnahme der Komplexität des Tight Junction-Netzwerks im apikalen Bereich der HT-29/B6-Zellen kommt (Schmitz et al., 1999b). Auch bei Human Airway Epithelial Cells (HAE-Zellen) konnte nach Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ eine deutliche

Veränderung der Tight Junction-Morphologie festgestellt werden. Western-Blot-Analysen ergaben eine Abnahme der Expression von ZO-1 und JAM sowie eine Zunahme einer hochmolekularen, stärker phosphorylierten Form von Occludin, während für Claudin-1 und -4 keine Veränderung festgestellt werden konnte (Coyne et al., 2002). Es ist jedoch auch eine Variabilität der Zytokin-Effekte in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe bzw. der verwendeten Zelllinie festzustellen. Intestinale epitheliale T84-Zellen zeigten weder ein Abnahme des transepithelialen Widerstandes (Madara & Stafford, 1989) noch eine Veränderung in der Expression von ZO-1, Occludin, JAM sowie Claudin-1 und -4 (Bruewer et al., 2003). In Astrozyten, die allerdings keine Permeabilitätsbarriere ausbilden, wurde die Expression von Occludin durch Zugabe von $\text{TNF}\alpha$ vermindert (Wachtel et al., 2001).

In dieser Arbeit wurden zum funktionellen Nachweis der Promotor-Aktivitäten die Reporter-gen-Konstrukte für alle vier Claudine in HT-29/B6-Zellen transfiziert und mit $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{IFN}\gamma$ sowie einer Kombination beider Zytokine inkubiert. Die erhaltenen Luciferase-Aktivitäten zeigten den Einfluss der Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ auf die Claudin-Promotor-vermittelte Genexpression, wobei bei allen Claudinen $\text{TNF}\alpha$ die Promotor-Aktivität deutlich reduziert und $\text{IFN}\gamma$ keine signifikante Änderung der Promotor-Aktivität hervorruft. Die Verminderung der Promotor-Aktivität durch die Kombination beider Zytokine ist daher allein auf die Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ zu beziehen. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass bei Entzündungsprozessen wie z.B. bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen die epitheliale Tight Junction im Sinne einer Regulation der Genexpression beeinflusst wird.

IL-6 ist ebenfalls ein pro-inflammatorisches Zytokin und spielt bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass die Genexpression über den STAT-3 Signaltransduktionsweg aktiviert wird. Der Rezeptor für IL-6 besteht aus der IL-6-bindenden Untereinheit gp80 und einem Dimer der signalübertragenden Untereinheit gp130. IL-6-Rezeptoren werden in verschiedenen Zellarten wie z.B. Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophilen, Epithelzellen und intestinalen Epithelzellen exprimiert. Der IL-6-Signaltransduktionsweg kann durch einen Inhibitor (Suppressor of cytokine signal 3 protein, SOCS-3) negativ reguliert werden. Basolaterale und apikale IL-6-Stimulation induzieren die Aktivierung des $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signaltransduktionsweges. IL-6 induziert die Expression des interzellulären Adhäsions Moleküls-1 (ICAM-1), das eine wichtige

Rolle bei der Wechselwirkung zwischen Neutrophilen und Epithelien bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielt (Wang et al., 2003). Monoklonale Antikörper gegen den IL-6-Rezeptor wurden bereits erfolgreich in murinen Colitis-Tiermodellen getestet (Ito, 2003).

Um zu untersuchen, inwieweit IL-6 einen Effekt auf die Expression Tight Junction-spezifischer Proteine haben kann, wurde die Claudin-2-Promotoraktivität unter Zugabe von IL-6 analysiert. Claudin-2 spielt eine besondere Rolle unter den untersuchten Tight Junction-Proteinen, da es eine permeabilisierende Komponente der Tight Junction darstellt. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Claudin-2 an der Bildung Kationen-selektiver Kanäle in der Tight Junction epithelialer Zellen beteiligt ist (Amasheh et al., 2002). Eine Hochregulation der Claudin-2-Expression im epithelialen Zellverband wäre also eine plausible Erklärung für eine Abnahme der Dichtigkeit der parazellulären Barriere. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-6 eine Zunahme der Claudin-2-Promotor-Aktivität induziert. Zusammen mit der Tatsache, dass IL-6 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen spielt, hat sich hiermit also ein direkter Hinweis auf einen möglichen molekularen Wirkmechanismus der Interleukin-6-vermittelten Barrierefunktionsstörung ergeben.

Die durch IL-6 induzierte Claudin-2-Expressionssteigerung sowie die Herabregulation der abdichtenden Tight Junction-Moleküle Claudin-1, -3 und -4 wirken insgesamt permeabilitätssteigernd für kleine Solute, insbesondere Kationen. Unter entsprechenden Umständen kann ein passiver Leckflux dieser Solute auftreten, dem aus osmotischen Gründen Wasser folgt. Dies würde zu einer Wegschwemmung von luminalen Noxen und Antigenen beitragen und somit einen protektiven Effekt darstellen. Diese Art der Barriestörungen kann mit einer erhöhten Permeation von kleineren Bakterienbestandteilen und luminalen Antigenen einher gehen, die durch Induktion von Immunreaktionen den Entzündungsprozess in der Darmwand unterhalten.