

4 Ergebnisse

4.1 Regulation des Claudin-1-Promotors durch den Wnt-Signalweg

Aus der Gruppe der abdichtenden Tight junction-Proteine wurde der Promotor von Claudin-1 auf die Anwesenheit von Bindungsstellen für *in trans* wirkende Faktoren der Genexpression hin untersucht. Bei der Analyse der Nukleotidsequenz fanden sich hierbei im Promotor des humanen Claudin-1 (**Abb. 7**) zahlreiche potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive wie z.B. zwei Bindungsstellen für nukleäre Effektoren des Wnt-Signaltransduktionswegs (LEF/TCF, Lymphoid Enhancer Faktor/T-Zell Faktor, 5'-WWCAAAGG-3'; Eastman und Grosschedl, 1999; Arnold et al., 2000), drei Bindungsstellen für das Zonula occludens-Protein-1 (ZO-1) assoziierte Nukleinsäure-Bindungsprotein ZONAB (5'-CCAAT-3'; Balda und Matter, 2000), zwei Bindungsstellen für den Nukleären Faktor kappa B (NF κ B) (5'-GGGRNNYYCC-3' und 5'-GGGAGGAGTC-3'; Parry und Mackman, 1994; Wang et al., 2000) sowie zwei Sp1 (5'-KRGCGGKRRY-3') Bindungsstellen vor einer AT-reichen Box. Beim Vergleich mit einer Sequenz, welche die genomische Organisation des Claudin-1 Gens beschreibt (Genbank Nr. AF260403; Kramer et al., 2000) wurde eine komplette Übereinstimmung der Nukleotidsequenz festgestellt.

Die Ausbildung der Tight junction ist ein Schlüsselereignis bei der Differenzierung und Polarisation von Epithelzellen. Da der Wnt-Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung und Differenzierung einnimmt, und der Promotor von Claudin-1 multiple potentielle Bindungsstellen für LEF/TCF aufweist, stellte sich die Frage ob Wnt auch bei der Regulation der Genexpression von Claudin-1 eine funktionelle Bedeutung besitzt.

4.1.1 Einfluss von Wnt auf den Claudin-1-Promotor

Um den Promotor von Claudin-1 auf eine Beeinflussung durch den Wnt-Signalweg hin zu untersuchen, wurden zunächst Reporteragen-Assays durchgeführt. Hierbei kam ein Luciferase-Reporteragen-Konstrukt zum Einsatz, welches den Promotorbereich von Claudin-1 (**Abb. 7**) enthielt. Das Plasmid basierte auf dem Vektor pGL3-Basic. pGL3-Basic ist ein Reporteragen-Vektor mit einer Größe von 4818 bp und besitzt unter anderem ein Ampicillin-Resistenzgen und ein Luciferasegen. Das Luciferasegen ist ein Reporteragen, das in den verwendeten Zelllinien nur exprimiert wird, wenn es unter der Kontrolle eines aktiven Promotors steht. Für Claudin-1 wurde das Reporteragen-Konstrukt pCLDN1proLucA+ verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Konstrukt, in dem der oben beschriebene Claudin-1-Promotor mit der Länge von 801bp (**Abb. 7**) über eine *SmaI* Schnittstelle 5' zum Luciferasegen in den Vektor pGL3-Basic integriert wurde.

Dieses Reporteragen-Konstrukt wurde transient in murine C57MG Zellen transfiziert, welche das sekretorische Glykoprotein Wnt-1 stabil exprimieren (C57MG/Wnt-1). Bei den C57MG Zellen handelt es sich um eine epitheliale Brustdrüsen-Linie der Maus (Blasband et al., 1992). C57MG/Wnt-1 Zellen sezernieren das sekretorische Glykoprotein Wnt-1, das den Wnt-Signalweg autokrin stimuliert. Für den Claudin-1-Promotor konnte in diesen C57MG/Wnt-1 Zellen im Vergleich zu C57MG Zellen, welche keine stabile Wnt-1 Expression aufwiesen (C57MG), eine Steigerung der Aktivität um 45 ± 9 % gezeigt werden (**Abb. 8**).

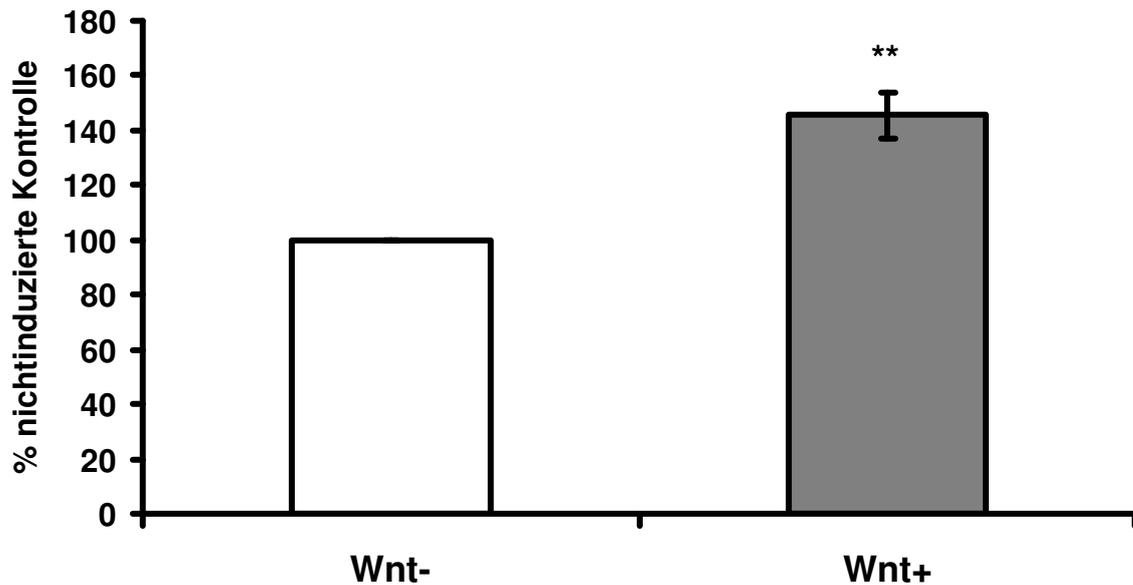


Abbildung 8 Die Claudin-1-Promotoraktivität ist in Wnt-exprimierenden Zellen erhöht

Aktivität des Claudin-1-Promotors in C57MG Zellen, die stabil Wnt-1 exprimieren (Wnt+), im Vergleich zu C57MG Zellen ohne Wnt-1 Expression (Wnt-). Der Claudin-1-Promotor zeigte eine Steigerung der Aktivität (n=6; p=0,0041) in Wnt-1 aktivierten Zellen (grauer Balken) gegenüber der nicht aktivierten Kontrolle (weißer Balken; auf 100% gesetzt).

4.1.2 Identifizierung von LEF/TCF Bindungsstellen im Claudin-1-Promotor

Aufgrund der in C57MG/Wnt-1 Zellen gezeigten Beeinflussung des Claudin-1-Promotors durch Wnt-1 sollten nun die beiden im Sequenzvergleich identifizierten potentiellen Bindungsstellen der nukleären Effektoren des Wnt-Signalwegs auf direkte Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren hin untersucht werden. Das in der Literatur beschriebene Sequenzmotiv für eine LEF/TCF Bindungsstelle lautet 5'-WWCAAWGG-3'. W steht hierbei für die Nukleotide Adenosin (A) oder Thymin (T). Die erste potentielle Bindungsstelle stimmt somit in allen acht von acht Positionen mit der Literatursequenz überein, die zweite Bindungsstelle in sieben von acht Positionen (**Abb. 9**).

LEF/TCF Bindungsmotiv	5`- WCAAWGG -3`
1. LEF/TCF Bindungsstelle	5`-CATAG ATCAAAGG GGATA-3`
mutierte 1. Bindungsstelle	5`-CATAGCGATCGATGGATA-3`
2. LEF/TCF Bindungsstelle	5`-AGCCA AGCAAAGG AGAGA-3`
mutierte 2. Bindungsstelle	5`-AGCCACGATCGATAGAGA-3`

Abbildung 9 Vergleich der LEF/TCF-Bindungsmotive des Claudin-1-Promotors mit der Konsensussequenz.

Übereinstimmungen in der Nukleotidsequenz mit der Konsensussequenz sind durch Rahmen hervorgehoben. Ferner sind zum Vergleich die Nukleotidsequenzen der eingeführten Mutationen dargestellt.

Zur Überprüfung der beiden potentiellen Bindungsstellen wurden EMSAs durchgeführt. Hierbei wurde rekombinantes Glutathion-S-Transferase (GST)-LEF-1 Fusionsprotein mit fluoreszenzmarkierten doppelsträngigen Oligonukleotiden inkubiert, welche die potentiellen LEF/TCF-Bindungsstellen enthielten. Ferner wurden Oligonukleotide benutzt, in denen die acht Nukleotide der potentiellen Bindungsstellen durch das Motiv 5'-CGATCGAT-3' ersetzt waren. Durch die Untersuchung des Laufverhaltens der Protein-DNA-Komplexe im nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel wurde die direkte Interaktion zwischen Protein und DNA überprüft. Es wurden Oligonukleotide für die erste LEF/TCF-Bindungsstelle (TCF FOR 8 cy5/TCF REV 8), für die mutagenisierte erste Bindungsstelle (TCF FOR 8M cy5/TCF REV 8M), für die zweite Bindungsstelle (TCF FOR 9 cy5/TCF REV 9) und die mutagenisierte zweite Bindungsstelle (TCF FOR 9M cy5/TCF REV 9M) untersucht (**Abb. 9**).

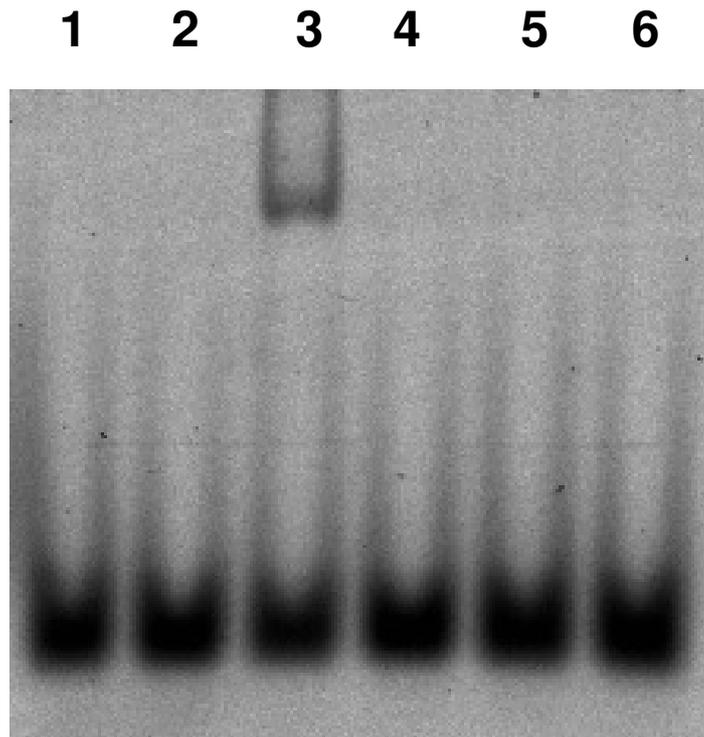


Abbildung 10 *LEF-1 bindet an die erste potentielle Bindungsstelle im Claudin-1-Promotor*

Untersuchung der Interaktion von LEF-1 mit der ersten potentiellen LEF/TCF Bindungsstelle im Claudin-1-Promotor. **1-3**: natives Oligonukleotid (TCF FOR 8 cy5/TCF REV 8) **1**: ohne Protein; **2**: mit GST; **3**: mit GST-LEF-1; **4-6**: mutagenisiertes Oligonukleotid (TCF FOR 8M cy5/TCF REV 8M) **4**: ohne Protein; **5**: mit GST; **6**: mit GST-LEF-1

Die Untersuchung des Laufverhaltens des Oligonukleotids mit der ersten Bindungsstelle zeigte eine Retardation der Mobilität im Gel bei Inkubation mit GST-LEF-1 (**Abb. 10, Spur 3**). Diese Veränderung des Laufverhaltens verschwand bei Mutation des Bindungsmotivs im Oligonukleotid (**Abb. 10, Spur 6**). Die Untersuchung des Oligonukleotids mit der zweiten potentiellen LEF/TCF-Bindungsstelle wies dagegen kein verändertes Laufverhalten in Anwesenheit von GST-LEF-1 auf (**Abb. 11**).

Die Untersuchung der Claudin-1-Promotorsequenz zeigte nur für die erste der beiden potentiellen LEF/TCF-Bindungsmotive eine direkte Interaktion mit rekombinantem LEF-1.

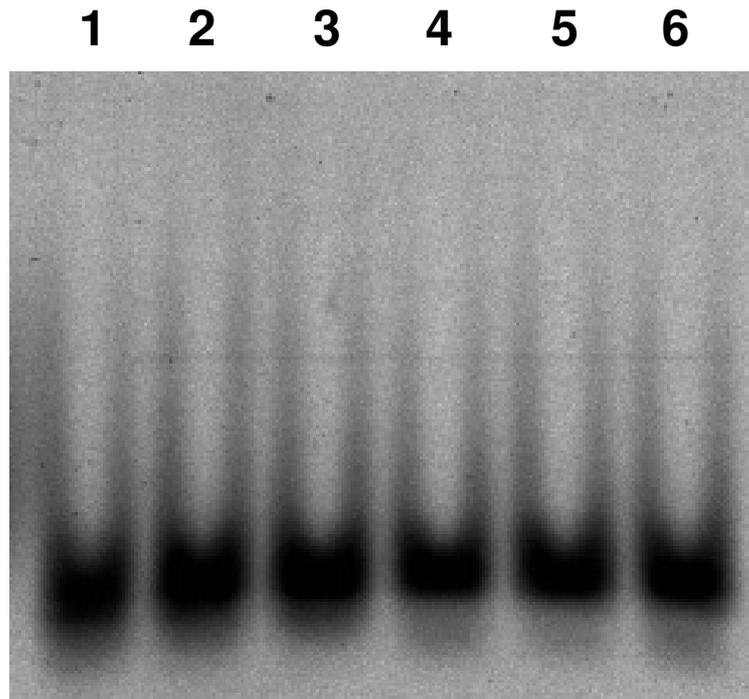


Abbildung 11 *LEF-1 bindet nicht an die zweite potentielle Bindungsstelle im Claudin-1-Promotor*

Untersuchung der Interaktion von LEF-1 mit der zweiten potentiellen LEF/TCF Bindungsstelle im Claudin-1-Promotor. **1-3**: natives Oligonukleotid (TCF FOR 9 cy5/TCF REV 9) **1**: ohne Protein; **2**: mit GST; **3**: mit GST-LEF-1; **4-6**: mutagenisiertes Oligonukleotid (TCF FOR 9M cy5/TCF REV 9M) **4**: ohne Protein; **5**: mit GST; **6**: mit GST-LEF-1

4.1.3 Herstellung eines Claudin-1 Reportergen-Konstruktes mit inaktiver LEF/TCF-Bindungsstelle

Zur Untersuchung der Funktionalität der identifizierten LEF/TCF-Bindungsstelle wurde ein Reportergen-Konstrukt erzeugt, in welchem die Bindungsstelle inaktiviert war. Als Ausgangspunkt diente hierbei das Reportergen-Konstrukt pCLDN1prolucA+.

Zur Erzeugung des Reportergen-Konstruktes mit inaktiver LEF/TCF-Bindungsstelle wurde eine gerichtete Mutagenese mittels PCR durchgeführt. Das Reportergen-Konstrukt pCLDN1prolucA+ wurde dabei mit den Mutagenese-Primern TCF FOR 8M2 und TCF REV 8M2 amplifiziert (**Abb. 9**, mutierte 1. Bindungsstelle). Bei der Mutagenese wurden die acht Nukleotide der LEF/TCF-Bindungsstelle durch die acht Nukleotide 5'-CGATCGAT-3' ersetzt. Dabei handelte es sich um den identischen Motivaustausch wie er bereits bei den EMSAs benutzt wurde. Somit war sichergestellt, dass nach der Mutagenese keine Bindung von Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie an das ausgetauschte Nukleotidmotiv erfolgen konnte. Dieses Konstrukt wurde neben dem nicht-mutierten Claudin-1-Promotor-Konstrukt zur Analyse des Effektes von nukleären Effektoren des Wnt-Signalwegs in den nachfolgend beschriebenen Reportergen-Assays eingesetzt. Zur Überprüfung der Mutagenese

nese wurde eine Restriktionsanalyse des Reportergen-Konstruktes durchgeführt. Bei erfolgreicher Mutagenese wird eine dritte *Pvu* I-Schnittstelle im Reportergen-Konstrukt erzeugt. Hierdurch verschiebt sich das Fragmentierungsmuster des nicht-mutagenisierten Claudin-1 Reportergen-Konstruktes (4561 bp- und 1046 bp-Fragment) zum mutagenisierten Claudin-1 Reportergen-Konstrukt (4229 bp-, 1046 bp- und 332 bp-Fragment). Wie die Restriktionsanalyse ergab zeigte sich das erwartete Fragmentierungsmuster (**Abb. 12**). Das durch Restriktionsanalyse identifizierte mutagenisierte Reportergen-Konstrukt wurde durch anschließende Sequenzierung in seiner Identität bestätigt.

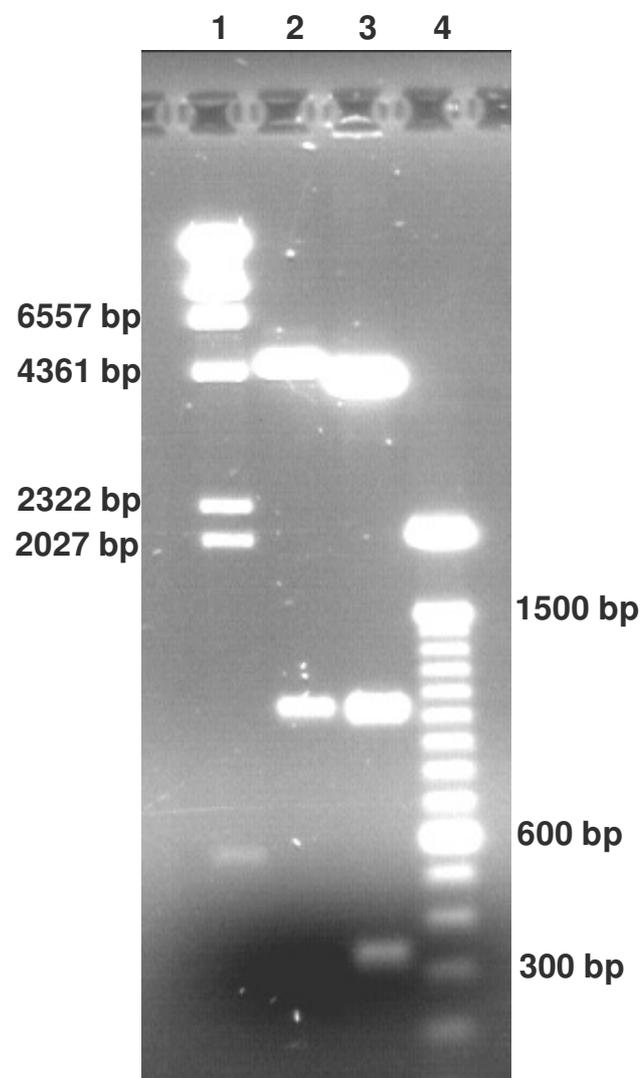


Abbildung 12 Restriktionsanalyse des Wildtyp- und des LEF/TCF-inaktivierten Claudin-1 Reportergen-Konstruktes

1: λ DNA/*Hind* III-Marker; 2: Wildtyp Claudin-1 Reportergen-Konstrukt/*Pvu* I behandelt; 3: LEF/TCF-mutagenisiertes Claudin-1 Reportergen-Konstrukt/*Pvu* I behandelt; 4: 100 bp-Marker

Wie das Bild zeigt, führt die Mutagenese der LEF/TCF-Bindungsstelle im Claudin-1 Reportergen-Konstrukt zur Erzeugung einer neuen *Pvu* I-Schnittstelle. Dies führt zum Verschwinden des 4561 bp-Fragmentes (2), und dem Auftauchen der 4229 bp- und 332 bp-Fragmente (3)

4.1.4 Beeinflussung des Claudin-1-Promotors durch LEF/TCF

Zur Untersuchung des Effektes von nukleären Effektoren des Wnt-Signalwegs auf den Promotor von Claudin-1 wurden Reporteragen-Assays in HEK293 Zellen durchgeführt. Hierzu wurde das mutierte und das nicht mutierte Reporteragen-Konstrukt für Claudin-1 sowohl alleine als auch in Kombination mit den Expressionskonstrukten für die nukleären Effektoren (siehe 3.1.6) β -Catenin, LEF-1 und TCF-4 in HEK293-Zellen transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden nach zwei Tagen lysiert und die Luciferase-Aktivität bestimmt.

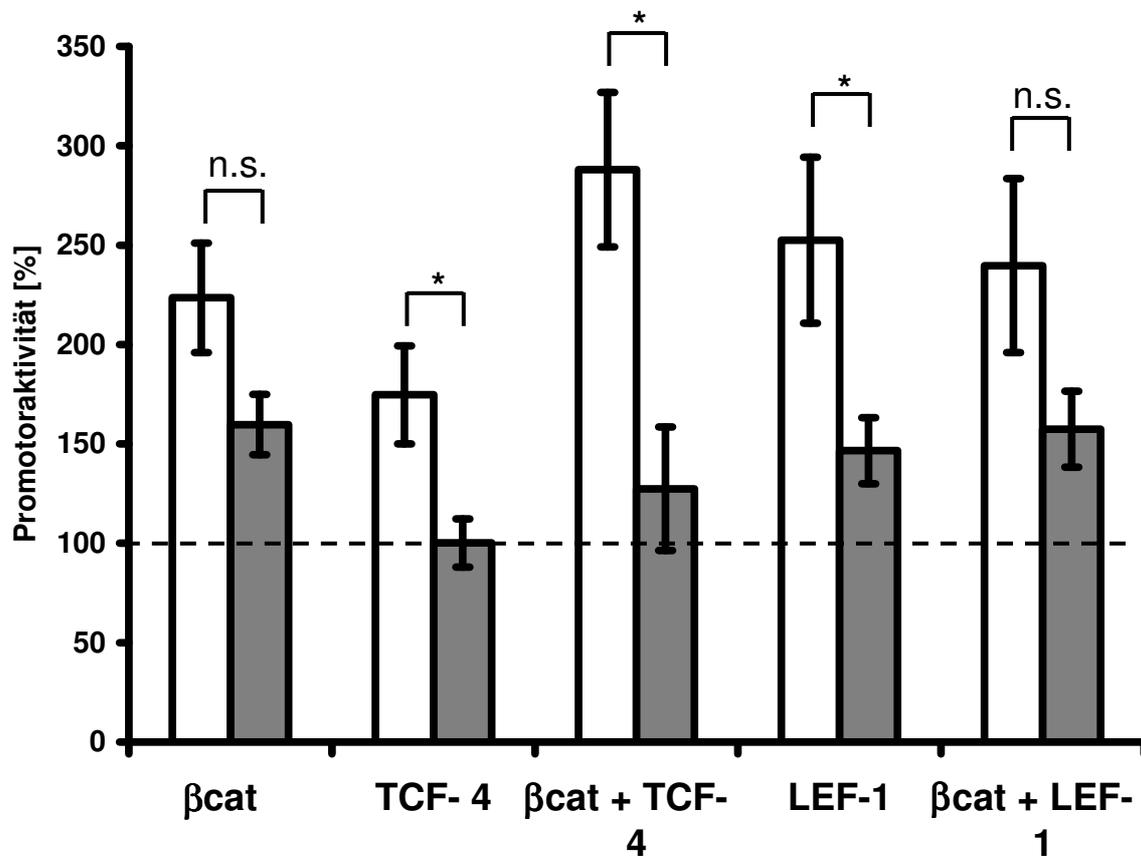


Abbildung 13 Der Claudin-1-Promotor wird durch nukleäre Faktoren des Wnt-Signalwegs stimuliert

Aktivität des Claudin-1-Promotors (weiße Balken) und des Claudin-1-Promotors mit mutagenisierter LEF/TCF-Bindungsstelle (graue Balken). Die Aktivität ist prozentual zum jeweiligen nichtstimulierten Promotor (100%; gestrichelte Linie) dargestellt. Die Mutation der LEF/TCF-Bindungsstelle resultiert in einer Verminderung der Stimulation des Claudin-1-Promotors durch nukleären Effektoren des Wnt-Signalwegs: TCF-4 (n=4; p=0,03536), β cat und TCF-4 (n=4; p=0,01787), LEF-1 (n=8; p=0,04406). β cat (n=8; p=0,06355) bzw. β cat und LEF-1 (n=7; p=0,11735) zeigten diese Verminderung nicht

Die Expression der Transkriptionsfaktoren β -Catenin, LEF-1 und TCF-4 führte zu einer deutlichen Steigerung der Promotoraktivität von Claudin-1. Durch die Mutagenese der LEF/TCF-Bindungsstelle kam es zu einer Verminderung dieses Effektes (**Abb.**

Bei der Analyse der Nukleotidsequenz des Claudin-2-Promotors (**Abb. 14**) konnten zwei potentielle LEF/TCF-Bindungsstellen (5'-WWCAAAGG-3'; Eastman und Grosschedl, 1999; Arnold et al., 2000), welche sich um ein Nukleotid überlappen, identifiziert werden. Ferner enthält der Promotor zwei Bindungsstellen für Caudal Related Homeobox Proteine (Cdx; Sakaguchi et al., 2002) und eine potentielle Bindungsstelle für den Nukleären Faktor kappa B (NFκB; 5'-GGGAGGAGTC-3', Wang et al., 2000). Durch die Identifizierung der beiden potentiellen LEF/TCF-Bindungsstellen ergab sich der erste Hinweis auf eine mögliche Beeinflussung des Claudin-2-Promotors durch den Wnt-Signalweg. Der untersuchte Claudin-2-Promotor weist im Vergleich mit einer Sequenz, welche die genomische Organisation des Claudin-2 Gens beschreibt (GenBank Nr. AL158821; Sakaguchi et al., 2002), einen Nukleotidaustausch auf (Position 203: A zu G).

4.2.1 Einfluss von Wnt auf den Claudin-2-Promotor

Um eine mögliche Beeinflussung durch den Wnt-Signalweg zu untersuchen, wurde ein Claudin-2 Reporter-gen-Konstrukt sowohl in C57MG-Zellen transfiziert, die stabil Wnt-1 exprimieren (C57MG/Wnt-1) als auch in C57MG-Zellen, welche keine Wnt-1 Expression besitzen (C57MG).

Das benutzte Reporter-gen-Konstrukt war hierbei pCLDN2proLucA+. Dabei handelt es sich wie im Fall des Reporter-gen-Konstruktes für Claudin-1 um ein Plasmid, das auf dem Reporter-gen-Vektor pGL3-Basic basiert. Im Fall von pCLDN2proLucA+ erfolgte die Integration eines Claudin-2-Promotorfragments von 263 bp (**Abb. 14**; Bereich mit „A“ markiert) in den pGL3-Basic Vektor über die Schnittstelle *NcoI*, welche sich 5' zum Luciferasegen befindet. Nach transienter Transfektion des Reporter-gen-Konstruktes in die C57MG-Zellen wurden diese für einen Tag inkubiert und anschließend die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Auswertung dieser Assays zeigte, dass die Aktivität des Claudin-2-Promotors in Anwesenheit von Wnt-1 um 120 ± 14 % gegenüber der Aktivität in Abwesenheit von Wnt-1 (**Abb. 15**) erhöht war.

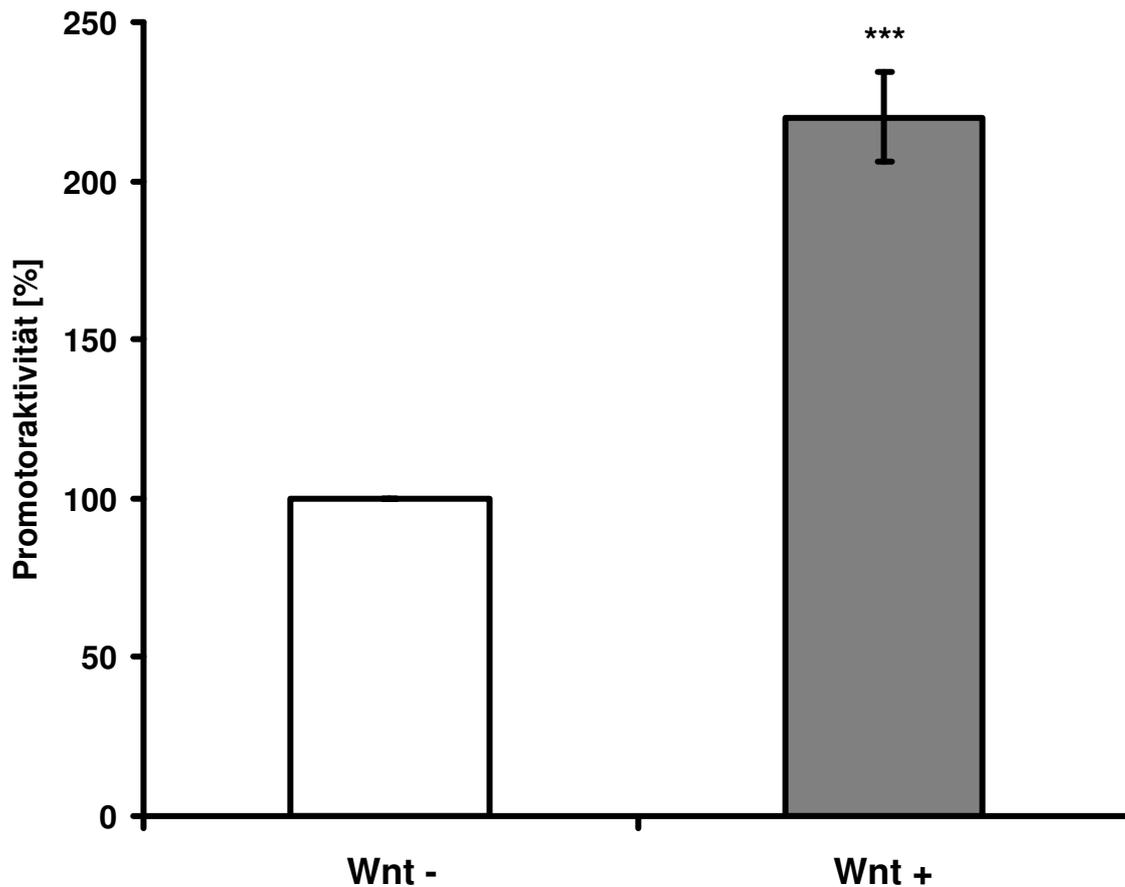


Abbildung 15 Die Claudin-2-Promotoraktivität ist in Wnt-exprimierenden Zellen erhöht

Aktivität des Claudin-2-Promotors in C57MG Zellen, die stabil Wnt-1 exprimieren (Wnt+), im Vergleich zu C57MG Zellen ohne Wnt-1 Expression (Wnt-). Der Claudin-2-Promotor zeigte eine Steigerung der Aktivität (n=6; p=0,00036) in Wnt-1 aktivierten Zellen (grauer Balken) gegenüber der nicht aktivierten Kontrolle (weißer Balken; auf 100% gesetzt).

4.2.2 Identifizierung von LEF/TCF Bindungsstellen im Claudin-2-Promotor

Nachdem die Beeinflussung des Claudin-2-Promotors durch Wnt-1 gezeigt werden konnte, sollte die Frage geklärt werden, welche der beiden potentiellen LEF/TCF-Bindungsstellen in der Lage ist, nukleäre Effektoren des Wnt-Signalwegs zu binden. Bei Betrachtung der Promotorsequenz ergab sich, dass die erste der beiden potentiellen Bindungsstellen in allen acht Nukleotiden mit der Konsensussequenz (5'-WWCAAWGG-3') übereinstimmte. Die zweite Bindungsstelle hingegen wies nur in sechs von acht Nukleotiden eine Übereinstimmung auf (**Abb. 16**).

LEF/TCF Bindungsmotiv	5`- <u>WWCAA</u> WGG-3`
LEF/TCF Bindungsmotiv	5`- <u>WWCAA</u> WGG-3`
1./2. LEF/TCF Bindungsstelle	5`-CTGGT <u>AACAAAGG</u> <u>TCAA</u> AAGGCATC-3`
mutierte 1. Bindungsstelle	5`-CTGGTCGATTCC <u>G</u> <u>TCAA</u> AAGGCATC-3`
mutierte 2. Bindungsstelle	5`-CTGGT <u>AACAAAGG</u> GACT <u>T</u> ACGCATC-3`
mutierte 1./2. Bindungsstelle	5`-CTGGTCGATTCC <u>G</u> GACT <u>T</u> ACGCATC-3`

Abbildung 16 Vergleich der LEF/TCF-Bindungsmotive des Claudin-2-Promotors mit der Konsensussequenz

Übereinstimmungen in der Nukleotidsequenz mit dem Konsensusmotiv sind durch Rahmen hervorgehoben. Ferner sind zum Vergleich die Nukleotidsequenzen der eingeführten Mutationen dargestellt.

Zur Untersuchung einer direkten Interaktion wurden EMSAs durchgeführt. Fluoreszenzmarkierte doppelsträngige Oligonukleotide, welche die potentiellen Bindungsstellen enthielten, wurden mit rekombinantem GST-LEF-1 Fusionsprotein inkubiert, und die Versuchsansätze anschließend in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Es wurden Oligonukleotide für die native Sequenz beider Bindungsstellen (TCF FOR 7cy5/TCF REV 7), für die mutagenisierte erste- und native zweite Bindungsstelle (TCF FOR 7M1cy5/TCF REV 7M1), für die native erste- und mutagenisierte zweite Bindungsstelle (TCF FOR 7M2cy5/TCF REV 7M2) und für die mutagenisierte Sequenz beider Bindungsstellen (TCF FOR 7M12cy5/TCF REV 7M12) benutzt (**Abb. 16**).

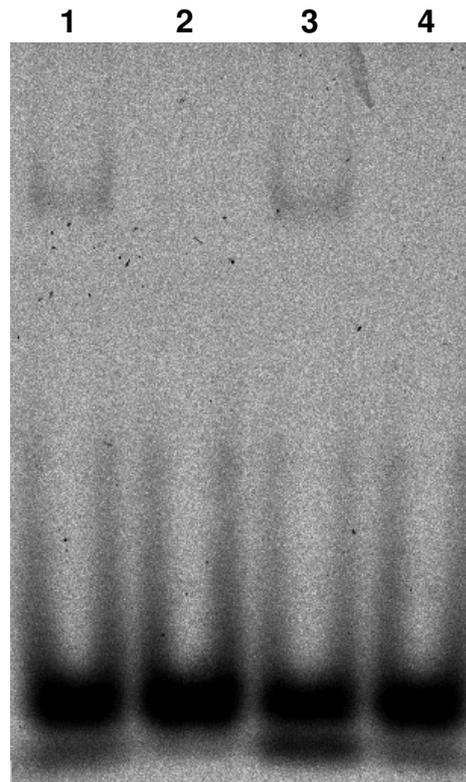


Abbildung 17 *LEF-1 bindet an die erste, nicht aber an die zweite potentielle Bindungsstelle im Claudin-2-Promotor*

Untersuchung der Interaktion von LEF-1 mit der ersten und zweiten potentiellen LEF/TCF Bindungsstelle im Claudin-2-Promotor. Inkubation von GST-LEF-1 **1:** mit nativer erster und zweiter Bindungsstelle; **2:** mit mutierter erster und nativer zweiter Bindungsstelle; **3:** mit nativer erster und mutierter zweiter Bindungsstelle; **4:** mit mutierter erster und zweiter Bindungsstelle

Die Untersuchung des Laufverhaltens der Oligonukleotide zeigte, dass es mit dem Oligonukleotid, welches beide LEF/TCF-Bindungsstellen enthält, zu einer Komplexbildung mit GST-LEF-1 kam (**Abb. 17**). Die Mutation der ersten- sowie beider Bindungsstellen resultierte in der Aufhebung dieser Bindung. Die Mutation der zweiten Bindungsstelle zeigte jedoch keine Beeinflussung der beobachteten Interaktion zwischen Oligonukleotid und LEF-1 Protein. Daraus war zu folgern, dass es sich nur beim ersten der beiden identifizierten Bindungsmotive um eine funktionelle LEF/TCF-Bindungsstelle handelt.

4.2.3 Herstellung eines Claudin-2 Reportergen-Konstruktes mit inaktivierter LEF/TCF-Bindungsstelle

Um die Beeinflussung des humanen Claudin-2-Promotors durch die nukleären Effektoren des Wnt-Signalwegs näher zu untersuchen, wurde ein Reportergen-Konstrukt erzeugt, in welchem die Bindungsstelle des Claudin-2-Promotors für

LEF/TCF mutiert war. Als Ausgangskonstrukt diente der Reportervektor pCLDN2proLucA+. Es wurde eine gerichtete Mutagenese mittels PCR durchgeführt, wobei die Primer TCF FOR 7M1 und TCF REV 7M1 (**Abb. 16**, mutierte 1. Bindungsstelle) verwendet wurden. Die daraus resultierende Mutation der LEF/TCF-Bindungsstelle entsprach der, welche im EMSA zu einer Aufhebung des DNA-Protein-Komplexes führte. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung überprüft.

4.2.4 Beeinflussung des Claudin-2-Promotors durch LEF/TCF

Um den Effekt der nukleären Effektoren des Wnt-Signalwegs näher zu charakterisieren wurden Cotransfektionen der Claudin-2 Reporter-Gen-Vektoren mit β -Catenin und LEF-1 vorgenommen. Beide Faktoren führten zu einer Steigerung der Aktivität des nicht mutierten Claudin-2-Promotors (**Abb. 18**). Die Koexpression von LEF-1 und β -Catenin führte beim nicht-mutierten Promotor zu einer Steigerung der Reporter-Gen-Aktivität auf mehr als das Doppelte der nicht stimulierten Kontrolle. Der Effekt der Stimulation ließ sich durch die Mutation der LEF/TCF-Bindungsstelle vermindern (**Abb. 18**).

Um zu überprüfen ob die Stimulation des Claudin-2-Promotors auch durch andere nukleäre Effektoren des Wnt-Signalwegs möglich ist, wurden Cotransfektionen des nicht-mutierten Claudin-2 Reporter-Gen-Konstruktes mit TCF-4 und β -Catenin vorgenommen. Es zeigte sich, dass die Überexpression von TCF-4 zu einer Steigerung der Claudin-2-Promotoraktivität führte (**Abb. 19**). Dieser Effekt ließ sich durch die gleichzeitige Koexpression von TCF-4 und β -Catenin noch weiter verstärken. Diese Ergebnisse zeigen, dass direkte Interaktionen zwischen den nukleären Effektoren des Wnt-Signalwegs und spezifischen Sequenzmotiven des Claudin-2-Promotors an der Steigerung der Genaktivität beteiligt sind.

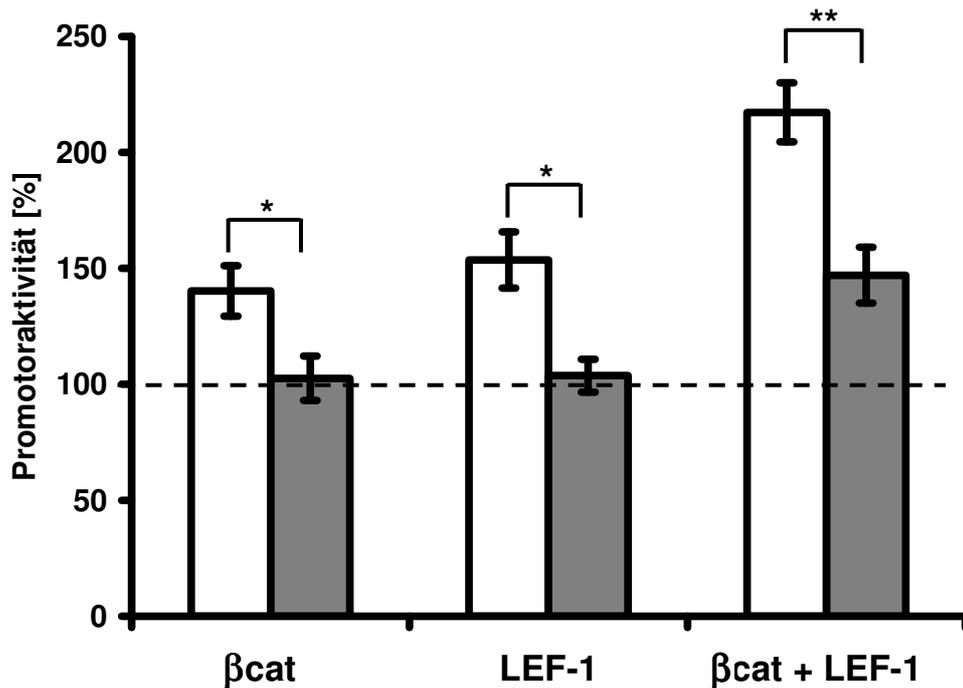


Abbildung 18 *Der Claudin-2-Promotor wird durch den nukleären Faktor LEF-1 stimuliert*

Die Expression von nukleären Effektoren des Wnt-Signalwegs führte zur Aktivierung des Claudin-2-Promotors (weiße Balken). Die gleichzeitige Expression von β -Catenin (β cat) und LEF-1 zeigte hierbei eine nochmalige Steigerung des aktivierenden Effektes gegenüber der Expression jeweils nur eines der beiden Transkriptionsfaktoren. Durch die Mutation der LEF/TCF-Bindungsstelle im Claudin-2-Promotor ließ sich die Aktivierung durch β -Catenin ($n=4$; $p=0,04108$), LEF-1 ($n=4$; $p=0,01188$) sowie β -Catenin und LEF-1 ($n=4$; $p=0,00715$) inhibieren bzw. verringern (graue Balken). Die Promotoraktivität ist prozentual zum jeweiligen nichtstimulierten Promotor (100%; gestrichelte Linie) dargestellt.

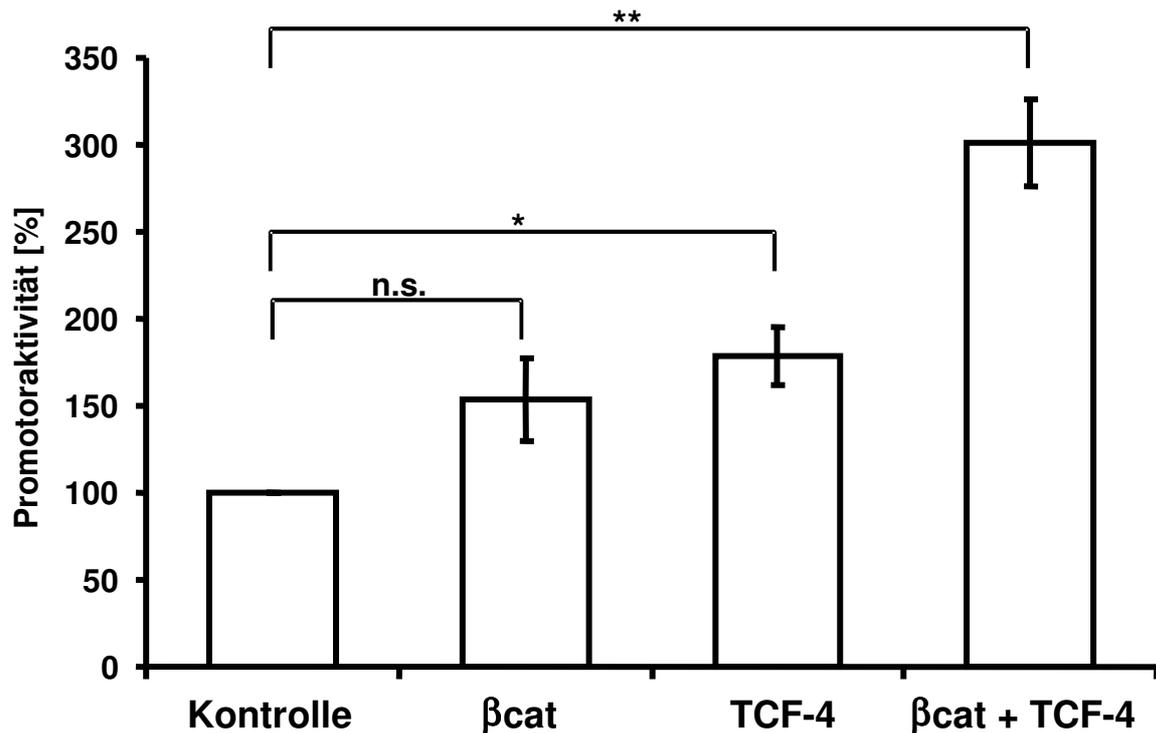


Abbildung 19 Der Claudin-2-Promotor wird durch den nukleären Faktor TCF-4 stimuliert

Die Expression von TCF-4 ($n=5$; $p=0,01566$), nicht jedoch von β -Catenin (β cat; $n=5$; $p=0,09180$) führte zu einer Zunahme der Claudin-2-Promotoraktivität im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (auf 100% gesetzt). Dieser Effekt ließ sich durch Koexpression von β -Catenin und TCF-4 ($n=5$; $p=0,0039$) nochmals steigern.

4.2.5 Cdx-abhängige Beeinflussung des Claudin-2-Promotors

Bei Untersuchungen des Claudin-2-Promotors konnten zwei funktionelle Bindungsstellen für Caudal Related Homeobox Proteine (Cdx) identifiziert werden (Sakaguchi et al., 2002). Ferner konnte gezeigt werden, dass die Expression des Caudal Related Homeobox Gens *Cdx1* im embryonalen Darm durch den Wnt-Signalweg beeinflusst wird (Lickert et al., 2000). Daher stellte sich die Frage, ob die Expression von nukleären Effektoren des Wnt-Signalwegs über die Aktivierung der *Cdx1* Expression zu einer Steigerung der Claudin-2-Promotoraktivität führt.

Cdx Konsensusmotive 5`-GTTTATG-3` ` 5`-TTTTAGG-3`
 Cdx Bindungsstellen 5`-ATCTGGTTTATGGATTTTTTTTAGGTCTTC-3`
 mutierte Bindungsstellen 5`-ATCTGGTGGCTGGATTTTTTGGCGGTCTTC-3`

Abbildung 20 Vergleich der Cdx-Bindungsmotive des Claudin-2-Promotors mit der Konsensussequenz

Übereinstimmungen in der Nukleotidsequenz mit den Konsensusmotiven sind durch Rahmen hervorgehoben. Ferner sind zum Vergleich die Nukleotidsequenzen der verwendeten Mutationen dargestellt.

Um die indirekte Beeinflussung des Claudin-2-Promotors über die Aktivierung der *Cdx1* Expression zu untersuchen, wurde ein Reporter-gen-Vektor hergestellt, in dem beide Cdx-Bindungsstellen inaktiviert waren. Es wurde eine gerichtete Mutagenese mittels PCR durchgeführt, wobei das Reporter-gen-Konstrukt pCLDN2proLucA+ als Ausgangsvektor diente. Dazu wurden die Mutageneseprimer Cdx mut1+2 FOR und Cdx mut1+2 REV (**Abb. 20**, mutierte Bindungsstellen) verwendet. Die Sequenzierung des so erzeugten mutierten Reporter-gen-Konstruktes zeigte neben der beabsichtigten Mutation die Deletion eines Nukleotides (Position 63: T deletiert) gegenüber dem nicht-mutierten Promotor. Da diese Deletion außerhalb der untersuchten Bindungsmotive lag, wurde sie toleriert.

Die Untersuchung der Promotor-Konstrukte im Reporter-gen-Assay zeigte eine Verringerung der Aktivierbarkeit des Claudin-2-Promotors durch die nukleären Effektoren des Wnt-Signalwegs, wenn die beiden Cdx-Bindungsstellen inaktiviert waren (**Abb. 21**). Diese Verringerung ließ sich für die Expression von β -Catenin, LEF-1 und beiden Faktoren in Kombination zeigen.

Die nach der Inaktivierung der Cdx-Bindungsstellen beobachtete Verringerung der Promotoraktivität von Claudin-2 entspricht in ihrem Ausmaß etwa der beobachteten Verringerung nach Inaktivierung der LEF/TCF Bindungsstelle.

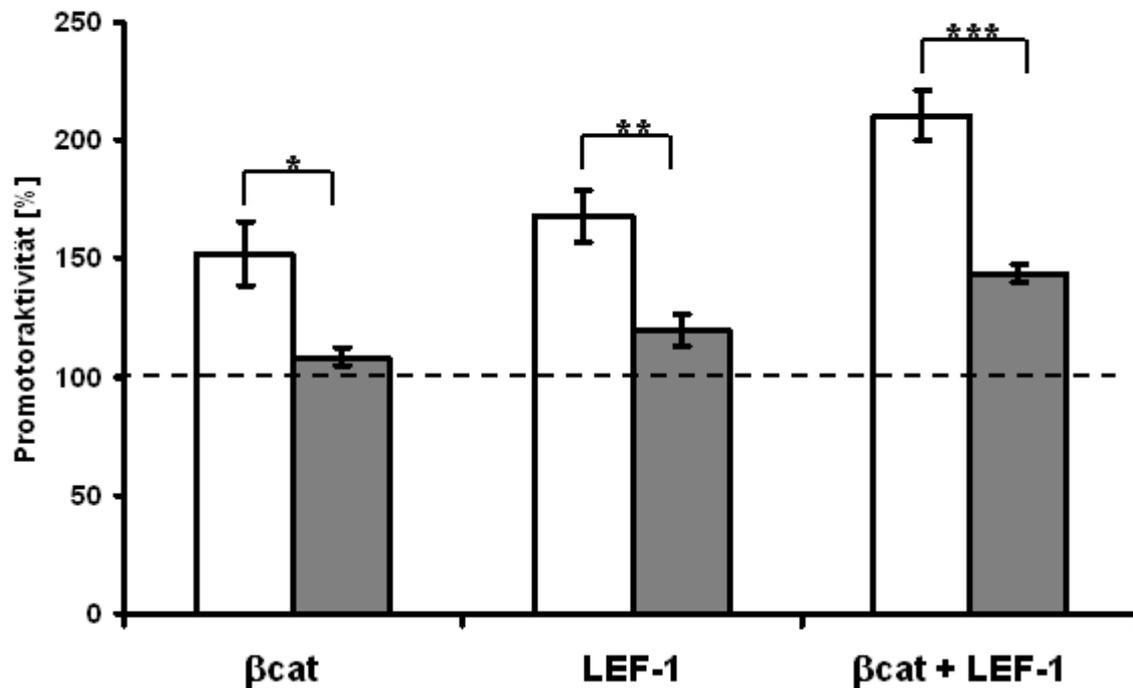


Abbildung 21 Die Wnt-abhängige Aktivierung des Claudin-2-Promotors lässt sich durch Mutation der Cdx-Bindungsstellen verringern

Die Expression von β -Catenin (β cat) bzw. LEF-1 führte zu einer Aktivierung des Claudin-2-Promotors (weiße Balken). Durch Koexpression beider Faktoren ließ sich dieser Effekt nochmals steigern. Die Mutation der Cdx-Bindungsstellen im Claudin-2-Promotor führte zu einer Verringerung der Aktivierbarkeit bei Expression von β -Catenin ($n=7$; $p=0,01881$), LEF-1 ($n=7$; $p=0,00304$) bzw. β -Catenin und LEF-1 ($n=7$; $p=0,00066$) (graue Balken). Die Promotoraktivität ist prozentual zum jeweiligen nichtstimulierten Promotor (100%; gestrichelte Linie) dargestellt.

4.2.6 Funktioneller Crosstalk zwischen dem Wnt-Signalweg und der Cdx abhängigen Transkriptionsaktivierung

Die mit dem Claudin-2-Promotor durchgeführten Versuche (Sakaguchi et al., 2002; Mankertz et al., 2004) lassen den Schluss zu, dass sowohl eine direkte Beeinflussung der Promotoraktivität über den Wnt-Signalweg als auch eine indirekte Beeinflussung über die Cdx-abhängige Aktivierung erfolgt. Bei beiden Signalwegen zeigte sich nach Inaktivierung der entsprechenden Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im Claudin-2-Promotor eine annähernd gleiche Verringerung der Aktivierbarkeit. Abschließend sollte die Frage geklärt werden, ob die Inaktivierung eines der beiden Signalwege bereits ausreichend ist um die Aktivierbarkeit des Claudin-2-Promotors maximal zu hemmen, oder ob sich der Effekt durch die gleichzeitige Inaktivierung beider Signalwege noch weiter steigern lässt.

Hierzu wurde eine gerichtete Mutagenese des Reporter-gen-Konstruktes mit bereits mutagenisierter LEF/TCF Bindungsstelle (siehe 4.2.3) mit den Mutageneseprimern Cdx mut1+2 FOR und Cdx mut1+2 REV durchgeführt. In dem resultierenden Reporter-gen-Konstrukt waren damit sowohl die LEF/TCF-Bindungsstelle als auch beide Cdx-Bindungsstellen mutiert.

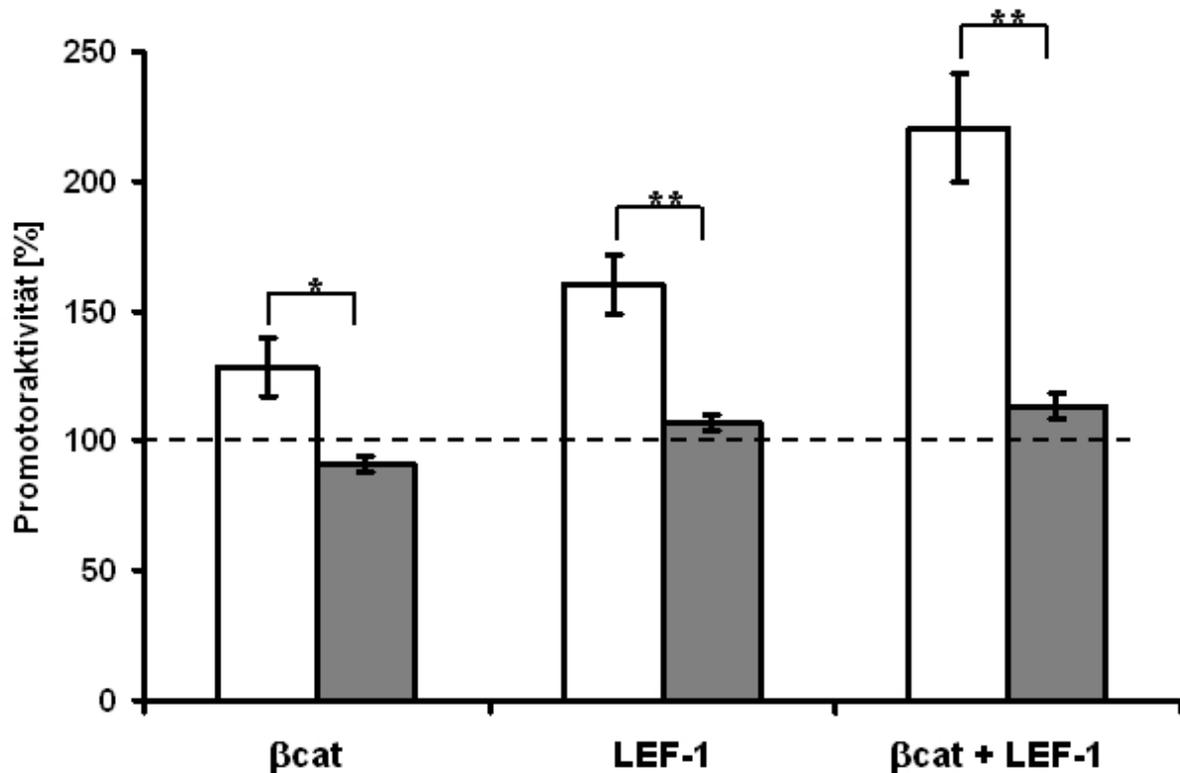


Abbildung 22 Die gleichzeitige Mutation von LEF/TCF- und Cdx-Bindungsstellen führt zu einer weiteren Verminderung der Wnt-abhängigen Claudin-2-Promotoraktivierung

Die Aktivierung des Claudin-2-Promotors durch β -Catenin (β cat) bzw. LEF-1 (weiße Balken) ließ sich durch Mutation der LEF/TCF-Bindungsstelle und der Cdx-Bindungsstellen (graue Balken) verringern. Die Mutation der LEF/TCF-Bindungsstelle als auch beider Cdx-Bindungsstellen führte zu einer nahezu vollständigen Aufhebung der Aktivierbarkeit des Claudin-2-Promotors durch β -Catenin (n=5; p=0,03152), LEF-1 (n=5; p=0,00967) bzw. beide Faktoren in Kombination (n=5; p=0,00772). Die Promotoraktivität ist prozentual zum jeweiligen nicht stimulierten Promotor (100%; gestrichelte Linie) dargestellt.

Im Reporter-gen-Assay zeigte sich, dass nach Inaktivierung sowohl der LEF/TCF- als auch der Cdx-Bindungsstellen die Aktivierbarkeit des Claudin-2-Promotors erniedrigt wurde. Im Gegensatz zu den Einzelmutationen war jedoch zu beobachten, dass es sogar bei gleichzeitiger Koexpression von β -Catenin und LEF-1 zu einer nahezu vollständigen Aufhebung der Promotoraktivierung kommt (**Abb. 22**). Noch deutlicher ist dieser Effekt darzustellen, wenn man die Aktivierbarkeit der einzelnen Promotorvarianten in Anwesenheit von β -Catenin und LEF-1 direkt miteinander vergleicht

(**Abb. 23**). Es ist zu erkennen, dass die Aktivierbarkeit der LEF-Cdx-Doppelmutante durch den Wnt-Signalweg weiter erniedrigt ist gegenüber den Einzelmutanten. Hieraus lässt sich folgern, dass die Beeinflussung des Claudin-2-Promotors durch den Wnt-Signalweg auf einem direkten LEF/TCF vermittelten und einem indirekten Cdx vermittelten Effekt beruht. Bei der transkriptionellen Regulation von Claudin-2 kommt es somit zu einem Crosstalk zwischen dem Wnt-Signalweg und der Cdx-vermittelten Aktivierung.

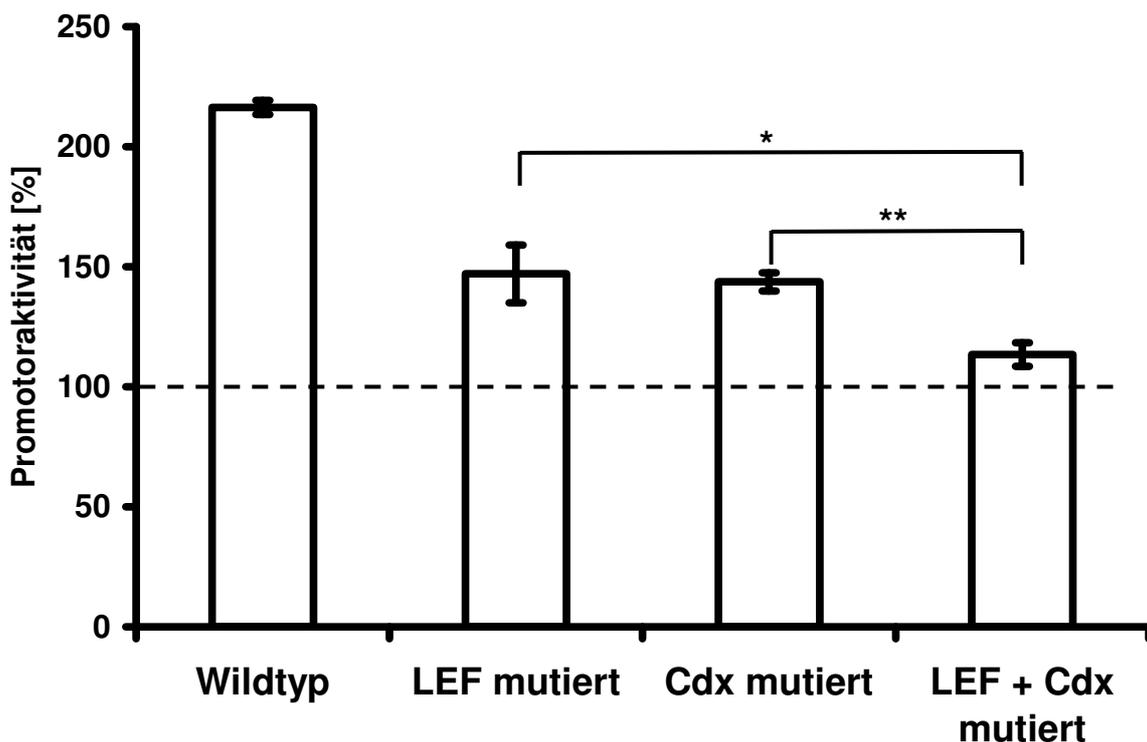


Abbildung 23 Die gleichzeitige Mutation der LEF/TCF- und Cdx-Bindungsstellen zeigt eine weitere Verminderung der Aktivierbarkeit des Claudin-2-Promotors gegenüber den Einzelmutationen bei Koexpression von β -Catenin und LEF-1

Direkter Vergleich der unterschiedlich mutierten Claudin-2-Promotorvarianten bei Koexpression von β -Catenin und LEF-1. Durch gleichzeitige Mutation der LEF/TCF- und der Cdx-Bindungsstellen lässt sich die Aktivierbarkeit des Claudin-2-Promotors gegenüber der LEF/TCF- ($p=0,02501$) bzw. der Cdx-Einzelmutation ($p=0,00126$) weiter verringern (Zusammenfassung der Daten aus **Abb. 18, 21** und **22**; Wildtyp, $n=16$; LEF mutiert, $n=4$; Cdx mutiert, $n=7$; LEF+Cdx mutiert, $n=5$).