

5 Diskussion

Die Regulation der Genexpression von Proteinen der Tight junction durch den Wnt-Signalweg rückt zunehmend in den Blickpunkt der Forschung. Außer für Claudin-1 (Miwa et al., 2000) gibt es auch für ein weiteres Protein des Tight junction Komplexes, nämlich für das Zonula occludens Protein-1 (ZO-1) experimentelle Hinweise, dass eine transkriptionelle Regulation durch den Wnt-Signalweg erfolgt. So konnte in humanen Colonkarzinom-Zelllinien für ZO-1 eine Verminderung der Genexpression bei Erhöhung der zellulären β -Catenin-Menge gezeigt werden (Mann et al., 1999).

In dieser Arbeit konnte der Effekt des Wnt-Signalwegs, sowie seiner nukleären Effektoren auf die Promotoren für zwei Claudin-Gene charakterisiert werden. Hierzu wurden die Promotoren für Claudin-1, welches eine abdichtende Komponente der Tight junction darstellt, sowie Claudin-2, das als kationenselektive Pore in der Tight junction fungiert, untersucht. Es konnte in beiden Promotoren jeweils eine Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie identifiziert werden. Die funktionelle Bedeutung dieser Bindungsstellen bei der Regulation der Claudin-Promotoren durch den Wnt-Signalweg konnte verifiziert werden. Für den Claudin-2-Promotor wurde darüber hinaus eine Cdx-abhängige Transkriptionsaktivierung durch den Wnt-Signalweg nachgewiesen. Dabei konnte ein Crosstalk zwischen der direkten Beeinflussung des Claudin-2-Promotors durch den Wnt-Signalweg und der indirekten Beeinflussung durch die Cdx-abhängige Transkriptionsaktivierung aufgezeigt werden (Mankertz et al., 2004). Diese Erkenntnisse bieten neuen Einblick in mögliche Regulationsmechanismen der epithelialen Barrierefunktion durch Variation der Claudin-Komposition der Tight junction.

Der Wnt-Signaltransduktionsweg ist an der Regulation der Claudin-1-Promotoraktivität beteiligt

Das untersuchte 801 bp Promotorfragment (**Abb. 7**) umfasst den Transkriptionsstartpunkt und den 5' liegenden Bereich des Claudin-1 Gens. Ein Vergleich mit der publizierten genomischen Sequenz (GenBank Nr. AF260403; Kramer et al., 2000) zeigte komplette Übereinstimmung. Es konnten zahlreiche potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie ZONAB, NF κ B und LEF/TCF identifiziert werden. ZONAB ist ein Transkriptionsfaktor, der mit dem Tight junction-assoziierten Protein

ZO-1 über eine SH3 Domäne interagiert. ZO-1 und ZONAB sind an der Regulation der parazellulären Permeabilität beteiligt und beeinflussen die Genexpression des Proto-Onkogens ErbB-2 (Balda und Matter, 2000). Außerdem ist ZONAB in die Regulation der epithelialen Proliferation und der Zelldichte involviert (Balda et al., 2003). NF κ B spielt eine zentrale Rolle bei der Signalvermittlung entzündlicher Prozesse in epithelialen Geweben. Die Aktivierung von NF κ B durch Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) wird als ein entscheidender Faktor für das Auslösen von Barrieredefekten bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie z.B. Morbus Crohn angesehen. In Caco-2 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von NF κ B notwendig ist, um nach TNF- α -Gabe eine Erhöhung der parazellulären Leitfähigkeit auszulösen (Ma et al., 2004). Ferner konnte eine Regulation der Genexpression von ZO-1 (Ma et al., 2004) sowie von Occludin (Wachtel et al., 2001) durch NF κ B nachgewiesen werden.

Lymphocyte enhancer factor (LEF) und T-cell factor (TCF) repräsentieren eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die im Wnt-Signalweg als nukleäre Effektoren fungieren. Sekretorisches Wnt-Glykoprotein aktiviert Signalwege, welche die zelluläre Differenzierung und Polarisierung beeinflussen. Die Bedeutung des Wnt-Signalwegs für die Expression von Tight junction-Proteinen konnte bereits gezeigt werden. So konnten Bindungsstellen im Bereich des Claudin-1-Promotors bestimmt werden, die im Rahmen der β -Catenin-LEF/TCF abhängigen Signaltransduktion von Bedeutung sind (Miwa et al., 2000). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Claudin-1-Promotor abhängige Genexpression in Zellen, welche stabil Wnt-1 exprimieren, gesteigert war gegenüber Zellen, die kein Wnt-1 exprimieren.

LEF-1 bindet an den Claudin-1-Promotor

Von den beiden potentiellen Bindungsstellen für LEF/TCF, in dem in dieser Arbeit untersuchten 801 bp langen Claudin-1-Promotorfragment, wurde für die erste Bindungsstelle eine direkte Interaktion mit rekombinantem LEF-1 Protein gezeigt. Die funktionelle Bedeutung dieser Bindungsstelle konnte durch eine vergleichende Untersuchung der Promotoraktivität des Wildtyp-Promotors und des Promotors mit inaktivierter LEF/TCF-Bindungsstelle verifiziert werden. Die Aktivität des Claudin-1-Promotors ließ sich durch LEF-1 steigern, diese Aktivierung des Promotors konnte durch Inaktivierung der LEF/TCF-Bindungsstelle verringert werden. Außer LEF-1

konnte auch durch TCF-4 eine Steigerung der Claudin-1-Promotoraktivität erzielt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass neben LEF-1 auch ein weiterer Vertreter der LEF/TCF-Familie in der Lage ist, den Claudin-1-Promotor zu aktivieren.

Die Lage der LEF/TCF-Bindungsstelle im Promotor des *Claudin-1* deckt sich mit der Position einer bereits beschriebenen Bindungsstelle (Miwa et al., 2000). Die hier identifizierte Bindungsstelle entspricht dabei dem in der vorausgegangenen Arbeit (Miwa et al., 2000) als Bindungsstelle zwei charakterisierten Abschnitt des Claudin-1-Promotors. Die in (Miwa et al., 2000) identifizierte erste Bindungsstelle befindet sich in einem Bereich upstream des hier in dieser Arbeit untersuchten Claudin-1-Promotorfragments. Auch die hier gezeigte direkte Interaktion der Bindungsstelle mit LEF-1 deckt sich mit dem im EMSA (Miwa et al., 2000) erzielten Befund, dass es zu einer Interaktion der Bindungsstelle mit β -Catenin-LEF/TCF-Komplexen kommt. Nicht verifiziert werden konnte eine beschriebene verminderte Basalaktivität der Reporter-genkonstrukte nach Mutation der LEF/TCF-Bindungsstelle. Dies lässt sich jedoch durch die Wahl der Zelllinie für die Reporter-gen-Assays erklären. Während die von uns benutzten HEK293 Zellen keine bekannte Mutation in der Wnt-Signaltransduktions-Kaskade aufweisen, besitzen die in der anderen Arbeit verwendeten SW480 Zellen eine Mutation, welche zu einer permanenten Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt. Somit repräsentieren die in (Miwa et al., 2000) dargestellten Luciferase-Aktivitäten nicht den unstimulierten Zustand, sondern die Transkriptionsaktivität unter Stimulation durch Wnt.

Der Wnt-Signaltransduktionsweg ist an der Regulation der Claudin-2-Promotoraktivität beteiligt

Ein Vergleich des verwendeten 263 bp umfassenden Promotorfragments mit der publizierten Sequenz (Genbank Nr. AL158821; Sakaguchi et al., 2002) zeigte einen Nukleotid-Austausch an Position 203 (Adenosin zu Guanosin). Dieser Austausch befindet sich in einem Bereich für den keine Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen beschrieben sind. Daher ist nicht anzunehmen, dass es durch den Austausch zu einer Veränderung der Aktivierbarkeit durch den Wnt-Signalweg kommt. Eine Strukturanalyse des Promotorfragments zeigte zwei potentielle Bindungsstellen für LEF/TCF, eine potentielle NF κ B-Bindungsstelle, zwei Bindungsmotive für Caudal Related Homeobox Proteine (Cdx; Sakaguchi et al., 2002) sowie eine Bindungsstelle

für Transkriptionsfaktoren der Hepatocyte Nuclear Factor (HNF) Familie. Die HNF-Familie von Transkriptionsfaktoren sind essentiell für die Expression einiger leberspezifischer Gene, finden sich jedoch auch in anderen Geweben wie Magen, Lunge und Darm (Cereghini, 1996). Durch Untersuchungen am Mäuse-Ileum konnte gezeigt werden, dass HNF-1 α an der komplexen Regulation der Claudin-2 Expression entlang der Krypten-Villus-Achse beteiligt ist (Sakaguchi et al., 2002).

Durch die Transfektion des Claudin-2-Promotor-Konstruktes in die stabil Wnt-1 exprimierenden C57MG Zellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Claudin-2 abhängige Genexpression unter autokriner Aktivierung durch Wnt-1 gesteigert ist gegenüber Zellen, denen diese Aktivierung durch Wnt-1 fehlt.

LEF-1 bindet an den Claudin-2-Promotor

Bei der Untersuchung einer direkten Bindung von rekombinantem LEF-1 Protein an den Claudin-2-Promotor wurde in dieser Arbeit für die erste der beiden potentiellen LEF/TCF-Bindungsstellen eine Interaktion zwischen dem rekombinanten LEF-1 und dem DNA-Bindungsmotiv gefunden. Die funktionelle Bedeutung der Bindung des nukleären Effektors LEF-1 an die LEF/TCF-Bindungsstelle wurde durch die Steigerung der Claudin-2-Promotoraktivität durch das LEF-1 Protein bestätigt. Durch Inaktivierung der identifizierten Bindungsstelle ließ sich diese Steigerung der Promotoraktivität vermindern. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur LEF-1 sondern mit TCF-4 auch ein weiteres Mitglied der LEF/TCF-Transkriptionsfaktorfamilie in der Lage ist, die Claudin-2-Promotoraktivität zu steigern. Die Koexpression von TCF-4 und β -Catenin bzw. LEF-1 und β -Catenin führte dabei zu einer nochmaligen Steigerung der Promotoraktivität im Vergleich zu den Versuchen, in denen die Stimulation mit jeweils nur einem der beiden Faktoren durchgeführt wurde. Dies entspricht dem erwarteten Effekt einer gemeinsamen Wirkung von β -Catenin und TCF-4 bzw. β -Catenin und LEF-1 bei der Transkriptionskontrolle.

Die Claudin-2-Promotor-abhängige Genexpression wird durch einen funktionellen Crosstalk zwischen dem Wnt-Signaltransduktionsweg und der Cdx-abhängigen transkriptionellen Aktivierung vermittelt

Untersuchungen des Claudin-2-Promotors führten zur Identifizierung zweier Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der Familie der Caudal Related Homeodomain Proteine (Cdx). Es konnte in Caco-2-Zellen gezeigt werden, dass der Claudin-2-Promotor durch zwei Mitglieder der Cdx-Familie, Cdx1 und Cdx2, sowie über den Hepatocyte Nuclear Faktor-1 α (HNF-1 α) reguliert wird (Sakaguchi et al., 2002). Für diese beiden Familien von Transkriptionsfaktoren wird eine Beteiligung an der Regulation der epithelialen Differenzierung im Dünndarm entlang der Krypten-Villus-Achse angenommen (Serfas und Tyner, 1993). So zeigt Cdx1 vornehmlich eine Expression im Bereich der Krypten, wohingegen Cdx2 im Bereich der Villi stark exprimiert wird (Silberg et al., 2000). Untersuchungen der Claudin-2 Expression entlang der Krypten-Villus-Achse im Darm zeigten eine Verminderung der Claudin-2 Expression von der Krypte hin zum Villus (Rahner et al., 2001), was auf eine mögliche differentielle Regulation durch Cdx1- bzw. Cdx2-Transkriptionskomplexe hinweist. Für Cdx1 konnte ferner gezeigt werden, dass die Expression dieses Transkriptionsfaktors im embryonalen Darm durch den Wnt-Signaltransduktionsweg reguliert wird (Lickert et al., 2000). Sowohl für LEF/TCF als auch für Cdx, welche offenbar beide an der Regulation der epithelialen Differenzierung im Darm beteiligt sind, existieren Bindungsstellen im Promotor für Claudin-2. Dieses sowie die Regulation von Cdx1 durch den Wnt-Signalweg legt den Schluss nahe, dass die Expression von Claudin-2 mittels eines interagierenden Netzwerks direkter und indirekter Modulationen beeinflusst wird. (**Abb. 24**). Diese These wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Durch die Mutation der beiden Cdx-Bindungsstellen kommt es zu einer Verringerung der Aktivierbarkeit des Claudin-2-Promotors durch LEF-1 und β -Catenin, die auf dem gleichen Niveau liegt wie nach Mutation der LEF/TCF-Bindungsstellen. Bei gleichzeitiger Inaktivierung der Cdx und der LEF/TCF-Bindungsstellen im Claudin-2-Promotor ist sogar eine weitere Verminderung der Aktivierbarkeit zu erzielen.

Auf diese Befunde gründet sich das Modell des funktionellen Crosstalks zwischen dem Wnt-Signalweg und der Cdx-abhängigen Transkriptionsaktivierung (**Abb. 24**). Das Modell beinhaltet eine direkte Beeinflussung des Claudin-2-Promotors durch die nukleären Effektoren des Wnt-Signalwegs und eine indirekte Beeinflussung durch die

Induktion von Cdx-Genen, welche wahrscheinlich durch die Steigerung des zellulären Cdx-Pools zu einer Aktivierung des Claudin-2-Promotors führt. Im Rahmen der Untersuchung der Autoregulation von Cdx1 konnte kürzlich ein neuer Transkriptionskomplex zwischen Cdx1 und LEF-1 nachgewiesen werden (Beland et al., 2004). Somit ist für die indirekte Aktivierung des Claudin-2-Promotors durch Cdx offen, ob es sich um einen alleine durch die Cdx-Transkriptionsfaktoren vermittelten Effekt handelt, oder die gesteigerte Promotoraktivität auf eine erhöhte Rekrutierung von β -Catenin/LEF-1 durch Komplexbildung mit Cdx zurückzuführen ist.

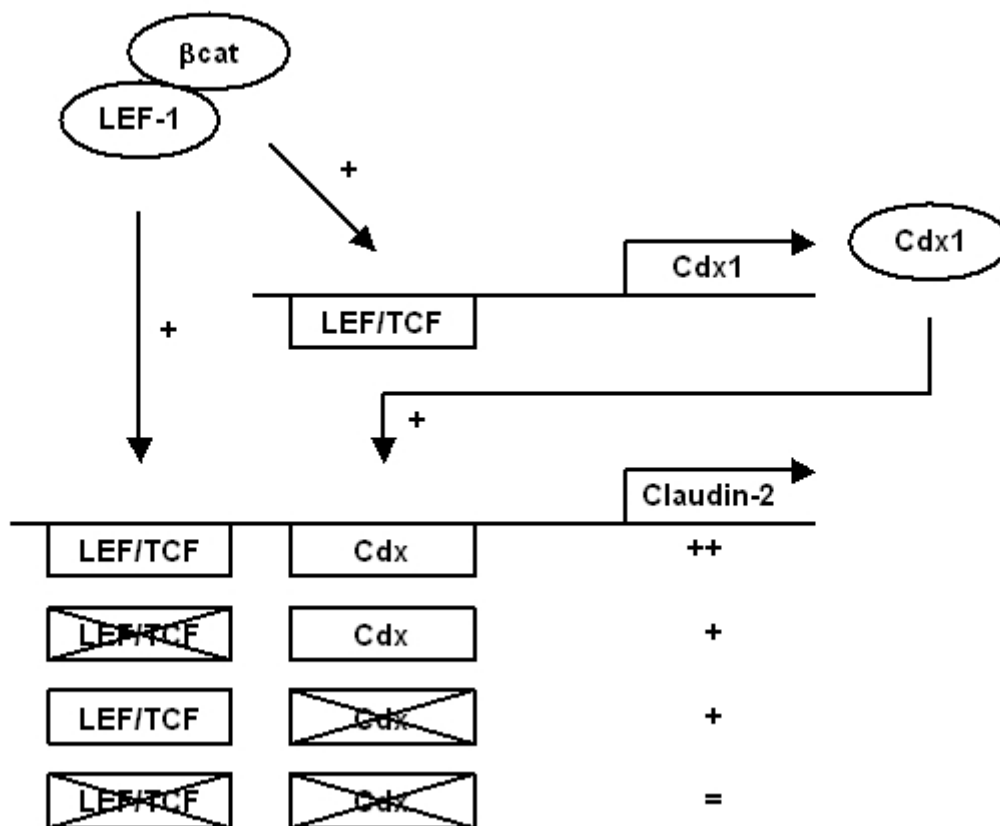


Abbildung 24 Modell eines funktionellen Crosstalks zwischen dem Wnt-Signalweg und einer Cdx abhängigen Transkriptionsaktivierung

Der LEF-1/ β -Catenin Komplex aktiviert die Claudin-2-Promotor vermittelte Genexpression direkt und indirekt durch die Induktion der Genexpression von *Cdx1*. Die Verhinderung der Transkriptionsfaktor-Bindung durch gerichtete Mutagenesen führt zur Verminderung der Aktivierbarkeit des Claudin-2-Promotors. ++ : starke Aktivierung der Transkription; + : abgeschwächte Aktivierung der Transkription; = : schwache Aktivierung der Transkription

Die Sequenzierung der Promotor-Konstrukte zeigte, dass es im Konstrukt mit mutierten Cdx-Bindungsstellen zur Deletion eines Nukleotids gekommen war. Dabei handelt es sich um das an Position 63 befindliche Thymidinmonophosphat (**Abb. 14**).

Diese Deletion liegt im Bereich der beschriebenen Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)-Bindungsstelle (Sakaguchi et al., 2002). Diese Mutation der HNF-Bindungsstelle sollte jedoch keine Auswirkung auf die Signifikanz der gezeigten Promotor-Effekte durch LEF-1 und β -Catenin haben. Es konnte zwar für den Promotor von Lactase-phlorizin hydrolase (LPH) gezeigt werden, dass HNF-1 α und Cdx2 direkt miteinander interagieren und dadurch die Bindung des Interaktionspartners an den Promotor erleichtern, was eine synergistische Steigerung der Promotoraktivität vermittelt (Mitchelmore et al., 2000). In dem hier verwendeten Promotor-Konstrukt sind die Cdx-Bindungsstellen jedoch bereits durch Mutation inaktiviert. Somit könnte ein potentieller Synergismus zwischen Cdx und HNF nicht zum Tragen kommen. Die Effektivität der benutzten mutierten Nukleotidmotive für die Cdx-Bindungsstellen konnte bereits gezeigt werden (Sakaguchi et al., 2002). Es ist nicht vollkommen auszuschließen, dass die Veränderung der HNF-Bindungsstelle zur Verminderung der Aktivierbarkeit im Cdx-mutierten Konstrukt beigetragen hat. Jedoch ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Deletion in der HNF-Bindungsstelle keinen signifikanten Einfluss auf die erzielten Ergebnisse hat, die Tatsache, dass die LEF/TCF-Cdx-Doppelmutante eine nochmalige Verringerung der Aktivierbarkeit gegenüber den Einzelmutanten zeigt. Die Doppelmutante besitzt die Deletion des Nukleotids an Position 63 nicht; trotzdem zeigt das Reporter-gen-Konstrukt eine Verringerung der Promotoraktivität, die einem additiven Effekt der LEF/TCF und Cdx-Einzelmutationen entspricht. Würde HNF bei Stimulation durch LEF/TCF und β -Catenin tatsächlich einen aktivierenden Effekt auf Cdx ausüben, dürfte in der Doppelmutante keine weitere Verminderung der Aktivierbarkeit zu beobachten sein. Es gibt ferner in der Literatur keinen Hinweis darauf, dass die Gene der *HNF*-Familie zu den Zielgenen des Wnt-Signalwegs zählen.

Die Regulation der Genexpression von Tight junction-Proteinen durch den Wnt-Signalweg, bzw. Cdx-Transkriptionsfaktoren könnte Teil eines Mechanismus sein, der essentiell für die Aufrechterhaltung der Balance zwischen Differenzierung und zellulärer Erneuerung in Epithelien ist (Beck, 2004). So lassen sich im Rahmen der oncogenen Transformation von Epithelien Störungen dieser Regulationsmechanismen nachweisen (Morin, 1999; Bienz und Clevers, 2000; Polakis, 2000; Giles et al., 2003). Ferner könnte die Wnt-abhängige Signaltransduktion eine Möglichkeit sein, die Barrierefunktion von Epithelien zu regulieren, die durch die Protein-Zusammensetzung der Tight junction entscheidend bestimmt wird.