

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

LI-Cadherin (Cadherin 17) ist ein Mitglied der Cadherin-Superfamilie mit einigen strukturellen Besonderheiten. Im Gegensatz zu klassischen Cadherinen besitzt es sieben anstelle von fünf extrazellulären Cadherin-Homologiedomänen und einen kurzen, 20 Aminosäuren umfassenden, zytoplasmatischen Anteil. Es zeigt ein spezifisches Expressionsmuster in den Enterozyten aller Darmabschnitte und wird darüber hinaus ektopisch bei der intestinalen Metaplasie des Magens exprimiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Regulationsmechanismus der humanen und murinen LI-Cadherin-Expression analysiert. Der Transkriptionsstartpunkt konnte mittels 5'-RACE und mit der Methode der Primer-Extension ermittelt werden. Des Weiteren wurde die Promotor-Aktivität der 2,8 kb umfassenden 5'-flankierenden Region durch GFP- und Luziferase-Reporterassays in gastrointestinalen Zelllinien untersucht.

Durch eine *in silico* Analyse dieser Region konnten potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen für AP-1, Cdx2, HFH3, HNF-1, GATA-1, -2, -3, OCT1, RFX1, Sp1 und cMyb gefunden werden. Sowohl die HNF-1- als auch die Cdx2-Bindungsstelle sind zwischen Maus und Mensch konserviert, während sich eine GC-Box nur in der murinen Region findet.

Sukzessive Deletionen der 5'-flankierenden Region des LI-Cadherin grenzten einen minimalen Bereich mit Promotoraktivität in intestinalen Zelllinien ein. Dieser umfasste die ersten 55 bp 5' vom Transkriptionsstartpunkt und enthielt die Bindungsstellen für Sp1 und HNF-1. Mittels EMSA und Supershift-Assays wurden Sp1 und HNF-1 als tatsächlich mit der 5'-flankierenden Region interagierende Faktoren identifiziert. Zwei Bindungsstellen für Cdx2, einem Darm-spezifischen Transkriptionsfaktor, befinden sich zusätzlich stromaufwärts der 55 bp-Region. Es konnte gezeigt werden, dass Cdx2 nur mit der distalen Bindungsstelle interagiert. Durch Mutationsanalyse der HNF-1- und Cdx2-Bindungsstellen wurde eine positive Regulation der Expression durch HNF-1 und Cdx2 nachgewiesen. Auch eine Mutation der GC-Box war in der Lage, die Promotor-Aktivität zu reduzieren.

In Reporterassays mit vierzehn Zelllinien aus acht unterschiedlichen Geweben von drei Spezies zeigte die 5'-flankierende Region des LI-Cadherins eine spezifische Aktivität in einigen Zelllinien des Darmes, der Leber, des Pankreas, des Magens und der Lunge. Bei fünf von vierzehn Zelllinien korrelierte die Aktivität mit einer endogenen LI-Cadherin-Expression. Zwei Zelllinien exprimierten zwar LI-Cadherin, zeigten aber keine Aktivität der Promotorregion, während zwei weitere Zelllinien sich reziprok verhielten. Fünf Zelllinien zeigten weder eine Promotor-Aktivität noch eine endogene LI-Cadherin-Expression. Interessanterweise wiesen die humanen Zelllinien Caco2 und HepG2 eine 1,6- bzw. 1,8mal höhere Reporter-Gen-Aktivität auf als die murinen STC-1-Zellen. Dies läßt darauf schließen, daß die Genregulation des LI-Cadherins zwischen den Spezies zumindest teilweise konserviert ist.

Die hier beschriebene *in vitro*-Charakterisierung des LI-Cadherin-Promotors legt den Grundstein für weitergehende Untersuchungen. Mittel für ein Projekt zur *in vivo*-Untersuchung der LI-Cadherin-Genregulation wurden bereits bewilligt. In diesem Projekt soll die embryonale und die gewebespezifische Genregulation von LI-Cadherin mittels transgener

Mäuse untersucht werden. Zusätzlich zu dem 2,8 kb-Bereich der 5'-flankierenden Region soll das gesamte Intron 1 des LI-Cadherin-Gens mit in die Analyse eingeschlossen werden, da bereits für E-Cadherin die Beteiligung von Intron-Sequenzen an der Transkriptionskontrolle nachgewiesen werden konnte (Hennig et al., 1996).

Drüber hinaus soll die Bedeutung der ektopischen Expression von LI-Cadherin im Zusammenhang mit der erhöhten Expression von Cdx2 bei der Entstehung der intestinalen Magenmetaplasie geklärt werden (Bai et al., 2002).