

4. Ergebnisse

4.1 Identifizierung der Promotoren für Claudin-2 und Claudin-4 mittels Genome Walking

Zur Identifizierung und Klonierung von genomischen DNA Sequenzen, die stromaufwärts der Transkriptionstartpunkte für die humanen Tight Junction-Proteine Claudin-2 und Claudin-4 liegen, wurde die Genome Walking-Technik verwendet. Das Genome Walking-Verfahren wurde mit einem Kit der Fa. Clontech durchgeführt. Dieser Kit enthält Fragmente humaner genomischer DNA, die in getrennten Ansätzen durch Restriktionsverdau mit fünf verschiedenen Restriktionsenzymen (*EcoRV*, *Scal*, *DraI*, *PvuII*, *SspI*) hergestellt wurden. Die unterschiedliche Schnittstellen-Spezifität der Restriktionsenzyme stellt eine Überlappung der Fragmente sicher.

Das Genome Walking-Verfahren geht von der publizierten cDNA-Sequenz der Claudin-2- und Claudin-4-Proteine aus. Um die stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes gelegenen Promotor-Sequenzen zu isolieren, wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation der genomische DNA eingesetzt. Die genspezifischen Oligonukleotidprimer wurden aus den cDNA-Sequenzen abgeleitet. Die Primer können an komplementärer Stelle an der genomischen DNA binden und enzymatisch entlang des komplementären Stranges in Richtung des Transkriptionsstartes über die Promoter-Sequenz verlängert werden. Die hier verwendeten genomischen DNA-Fragmente sind an ihren Enden mit Adaptoren ligiert. Die Adaptoren sind DNA-Stücke mit einer Länge von 49 Nukleotiden, deren Sequenz bekannt ist. Für die Synthesereaktionen konnten daher Adaptor-spezifische Oligonukleotid-Primer als zweite Primer zur Amplifikation der Promoter-spezifischen genomischen DNA eingesetzt werden.

4.1.1. Amplifikation Claudin-2-spezifischer Sequenzen

Zur Isolierung des Claudin-2 Promotors wurden für den ersten Amplifikationsschritt AP1 als adaptorspezifischer und humCLDN2A als genspezifischer Primer eingesetzt. Die verwendete humane genomische DNA war mit fünf verschiedenen Restriktionsenzymen (*EcoRV*, *Scal*, *DraI*, *PvuII*, *SspI*) verdaut worden.

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht wurden die PCR-Produkte nach Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht (**Abb. 4**).

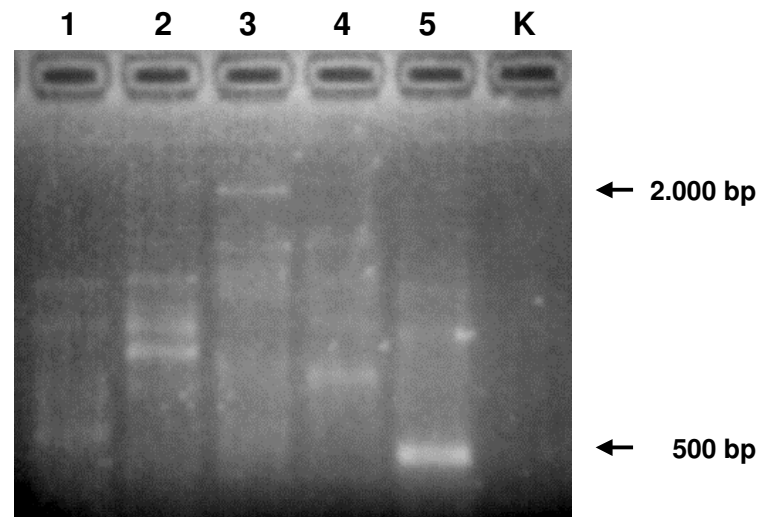


Abb. 4 Agarosegel mit den Produkten aus der ersten Genome Walking PCR mit Claudin-2-spezifischen Primern. 1: *EcoRV*-Ansatz, 2: *Scal*-Ansatz, 3: *Dral*-Ansatz, 4: *PvuII*-Ansatz, 5: *SspI*-Ansatz, K: H_2O ; jeweils 5 μ l

Um die Spezifität der PCR-Amplifikation zu erhöhen und damit ein distinktes Bandenpattern zu bekommen wurden die Produkte aus der ersten PCR für Claudin-2 in einer nested-PCR amplifiziert.

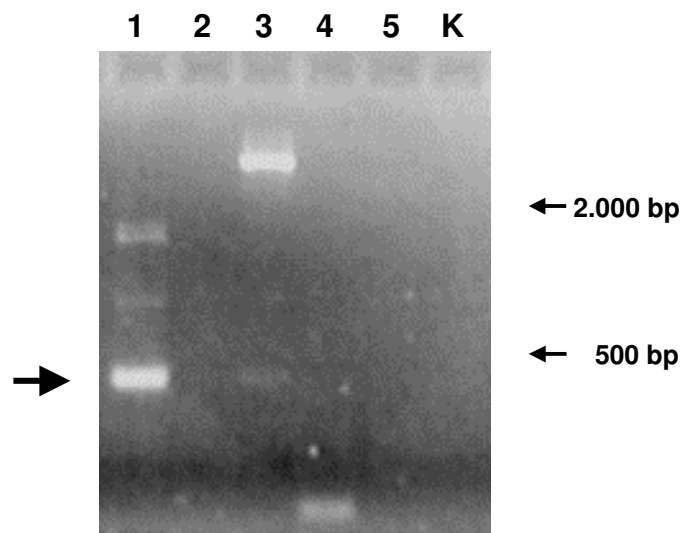


Abb. 5 Agarosegel mit den Produkten aus der nested PCR mit Claudin-2-spezifischen Primern. 1: *EcoRV*-Ansatz, 2: *Scal*-Ansatz, 3: *Dral*-Ansatz, 4: *PvuII*-Ansatz, 5: *SspI*-Ansatz, K: H_2O ; jeweils 5 μ l

Hierzu wurden die ersten PCR-Ansätze von Claudin-2 1:50 verdünnt und mit dem Adaptor-spezifischen Primer AP2 und dem genspezifischen Primer humCLDN2B amplifiziert (**Abb. 5**). Die mit einem Pfeil markierte 420 bp Bande aus Spur 1 (*EcoRV*-Fragmente) wurde extrahiert und zur Klonierung verwendet. Nach der elektrophoretische Trennung der PCR-Ansätze wurden die Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten, aus der Gelmatrix gereinigt und in den Plasmid-Vektor pGEM-T ligiert.

4.1.2. Amplifikation Claudin-4-spezifischer Sequenzen

Für die Amplifikation Claudin-4-spezifischer genomischer DNA-Fragmente wurden bei der ersten PCR der Adaptor-spezifische Primer AP1 und humCPE-RREV6 als genspezifischer Primer verwendet. Als Matrize wurde humane genomische DNA verwendet, die mit *EcoRV*, *DraI*, *PvuII* und *SspI* geschnitten war (**Abb. 6**). Anschließend wurde auch hier zur Erhöhung der Spezifität der PCR-Amplifikation eine nested-PCR durchgeführt. Hierzu wurde der erste PCR-Ansatz 1:100 verdünnt und mit dem Primer AP2 und dem genspezifischen Primer humCPE-RREV5 amplifiziert. Abweichend von den im Methodenteil für die nested PCR angegebenen Bedingungen wurde bei 69°C anstatt bei 67°C inkubiert.

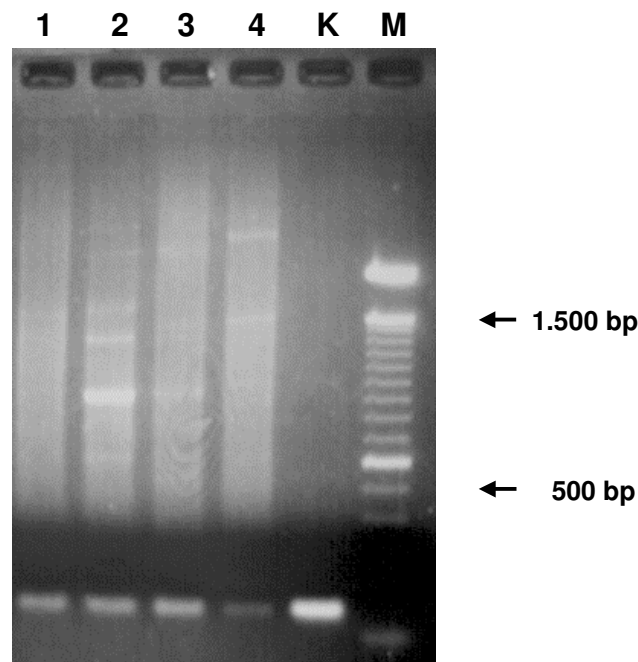


Abb. 6 Agarosegel mit den Produkten aus der ersten Genome Walking PCR mit Claudin-4-spezifischen Primern. 1: *EcoRV*-Ansatz, 2: *DraI*-Ansatz, 3: *PvuII*-Ansatz, 4: *SspI*-Ansatz, K: H₂O; jeweils 5 µl. M: 100 ng 100 bp Leiter

Die nested-PCR Ansätze wurden wie zuvor elektrophoretisch auf ein 1,5% Agarosegel bei 60V aufgetrennt und unter dem UV Licht sichtbar gemacht (**Abb. 7**). Die mit einem Pfeil markierte etwa 350 bp große DNA-Bande aus Spur 4 (*Sspl*-Verdau) wurde im weiteren Verlauf extrahiert und in den Plasmid-Vektor pCR2.1-TOPO ligiert.

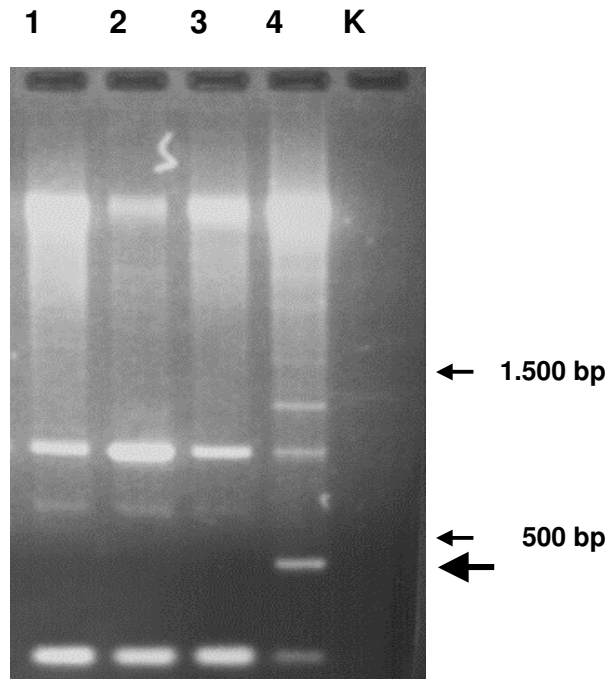


Abb. 7 Agarosegel mit den Produkten aus der nested PCR mit Claudin-4-spezifischen Primern. 1: *EcoRV*-Ansatz, 2: *Dral*-Ansatz, 3: *PvuII*-Ansatz, 4: *Sspl*-Ansatz, K: H₂O; jeweils 5 µl.

4.2. Identifizierung der Promotoren für Claudin-1 und Claudin-3 mittels genomischer Bibliotheken

Zur Klonierung der genomischen DNA Sequenzen, die stromaufwärts des Transkriptionsstartes für die humanen Tight Junction-Proteine Claudin-1 und Claudin-3 liegen, wurden auf Nylon-Membranen immobilisierte genomische Bibliotheken aus dem Ressourcenzentrum für die humane Genomforschung (RZPD) verwendet. Claudin-spezifische Klone wurden mit genspezifischen Sonden detektiert. Dazu wurden zunächst auf der Basis publizierter Sequenzinformationen Claudin-1- und Claudin-3-spezifische Oligonukleotideprimer generiert, mit denen DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert wurden.

Die Nylon-Membran mit der aufgetropften humanen genomischen DNA wurde in der Folge mit den radioaktiv markierten genspezifischen Fragmenten hybridisiert. Die Signale wurden mit Hilfe eines Fluoroimagers identifiziert und lokalisiert. Die Koordinaten der positiven Signale dienten der Identifikation der entsprechenden Cosmid-Klone, welche dann beim Ressourcenzentrum bestellt wurden. Aus diesen Klonen wurde nach Restriktionsverdau und erneuter Hybridisierung die Promotor-Sequenz subkloniert. Als Sonde dienten wiederum die genspezifischen DNA-Fragmente, welche diesmal in einer PCR Reaktion mit Digoxigenin markiert wurden.

4.2.1 Herstellung der Claudin-1-spezifischen Sonde und Identifikation des genomischen Klons

Als Ausgangsmaterial für die Claudin-1-spezifische Sonde wurde RNA aus Zellen der humanen intestinalen Zelllinie HT-29/B6 isoliert und mit Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation der cDNA erfolgte mit zwei genspezifischen Primern (humCLDN1E, humCLDN1C) die nach der für Claudin-1 veröffentlichten GenBank-Sequenz (AF101051) hergestellt wurden. Das 293 bp lange PCR Produkt wurde über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgereinigt und in den Plasmid Vektor pGEM-T-Easy ligiert. Die verwendete Präparation von pGEM-T-Easy ist im LacZ-Gen gespalten und trägt 3'-überhängende T-Enden. Diese gehen mit den Enden des PCR-Amplifikates, welches durch die verwendete Taq-Polymerase 3'-überhängenden A-Enden trägt, Wasserstoffbrückenbindungen ein. Ein Aliquot des Ligationsansatzes wurde in kompetente *E. coli* JM109 Bakterienzellen transformiert. Nach Weiß/Blau-Selektion auf ampicillinhaltigen Nährböden wurden nur die weiße Kolonien zur Plasmidpräparation eingesetzt. Die Insertion des Claudin-1 Fragmentes wurde mittels Nukleinsäuresequenzierung überprüft.

Zur Herstellung der radioaktiven Sonde wurde das Insert aus dem Vektor mit dem Restriktionsenzym *NotI* ausgeschnitten und nach Elektrophorese aufgereinigt. Das aufgereinigte Fragment wurde α -³²P-dCTP Radioaktiv markiert und als Sonde zur Hybridisierung der RZPD Nylon-Membran (Nummer 104.18.151) eingesetzt. Die Hybridisierung der RZPD Nylon-Membranen erfolgte für Claudin-1 bei 68°C. Nach der Hybridisierung wurden die Nylon-Membran zweimal je 15 min bei Raumtemperatur mit 2XSSC/0,1%SDS und einmal bei 60°C für 30 min in vorgewärmtem 0,1XSSC/0,1%SDS geschüttelt. Die immobilisierte Radioaktivität wurde durch Belichtung einer Bildplatte über Nacht gespeichert. Das Auslesen der Bildplat-

te erfolgte mit dem Fluoreszenz-Imager. Die aus den Koordinaten der Hybridisierungssignale nach Vorgabe des RZPD errechneten Identifizierungscodes wurden zur Bestellung der assoziierten Cosmid-Klone verwendet. Der hier zur weiteren Subklonierung verwendete Cosmid-Klon trägt die Bezeichnung RPCI-1 26F15.

4.2.2. Subklonierung der Claudin-1-Promotor-spezifischen Sequenzen

Der erhaltene Cosmid-Klon (pCYPAC2-Derivat in *E.coli* DH10B) wurde zunächst in Kanamycin-haltigem Medium zur Amplifikation der Cosmide kultiviert. Die Cosmide wurden nach Aufreinigung mit sieben verschiedenen Restriktionsenzymen (*Bam*HI, *Bst*EII, *Nco*I, *Nhe*I, *Sal*I, *Sma*I, *Sgr*AI) gespalten. Die Restriktionsfragmente wurden auf einem 0,5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (**Abb. 8A**).

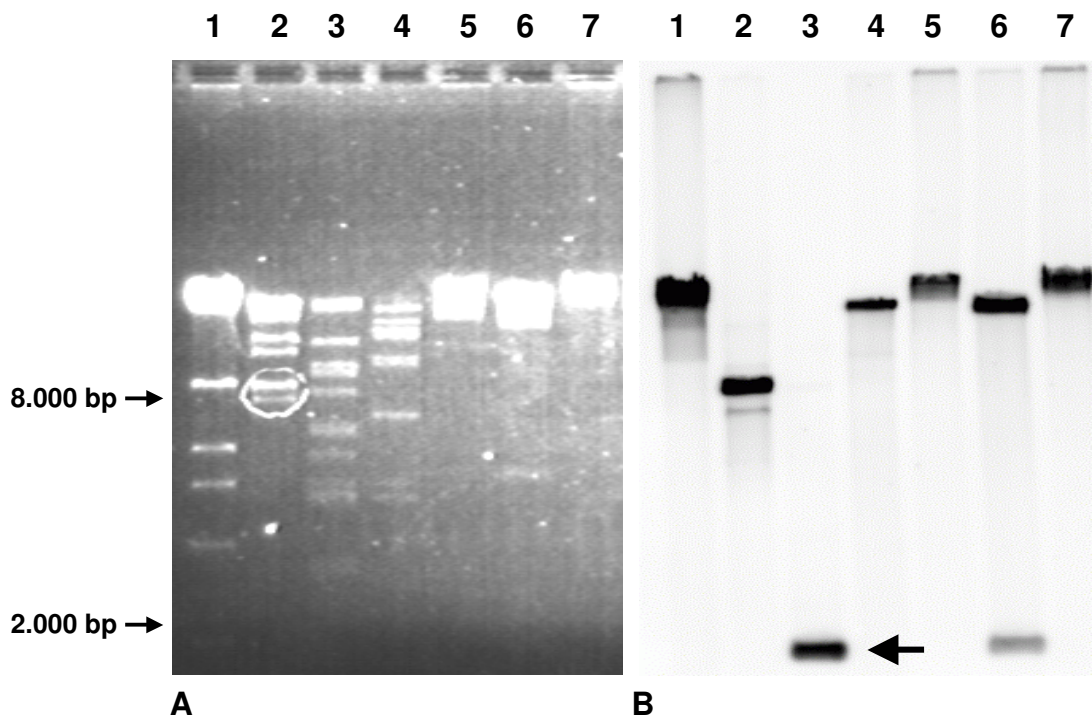


Abb. 8 **A** Agarosegel mit Restriktionsfragmenten des über Hybridisierung mit einer Claudin-1-spezifischen Sonde identifizierten Cosmid-Klons. 1: *Bam*HI, 2: *Bst*EII, 3: *Nco*I, 4: *Nhe*I, 5: *Sal*I, 6: *Sma*I, 7: *Sgr*AI; jeweils 10 μ l.

B Southern blot aus dem Agarosegel nach Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Claudin-1-spezifischen Sonde. Bezeichnung der Spuren wie unter A.

Um in der Vielzahl der bei der Restriktionsverdau entstandenen Fragmente ein oder mehrere Claudin-1-spezifische Produkte zu identifizieren, wurde die in dem Gel erhaltene DNA mittels Kapillartransfer auf eine Nylon-Membran übertragen und im Southern Blot Verfahren mit einer Claudin-1-spezifischen Digoxigenin-markierten

Sonde hybridisiert. Für die Herstellung der Digoxigenin-markierten Sonden wurden die Primer aus der veröffentlichten Claudin-1 Sequenz (Genbank AF101051) abgeleitet. Die PCR-Reaktion wurde mit dem Primerpaar humCLDN1C und humCLDN1E (Nukleotid Position 1-293) unter Verwendung von Digoxigenin-markiertem dUTP durchgeführt. Das 293 bp lange Fragment wurde im Southern-Blot als Hybridisierungssonde zur Detektion Claudin-1-spezifischer Restriktionsfragmente eingesetzt. Dabei konnte unter anderen ein etwa 1800 bp langes Fragment aus dem *Nco*I-Verdau identifiziert werden (**Abb. 8B**), das im folgenden in einen Plasmid-Vektor kloniert wurde. Dazu wurden die 5' überstehenden Enden mit DNA Polymerase I (Klenow-Fragment) und Nukleotidtriphosphaten aufgefüllt. Das 1800 bp große Fragment wurde nach Aufreinigung in den mit *Spe*I linearisierten und an den Enden aufgefüllten sowie dephosphorilierten Plasmid-Vektor pGEM-T-Easy Vektor ligiert.

4.2.3. Herstellung der Claudin-3-spezifischen Sonde und Identifikation des genomischen Klons

Für die Herstellung einer Claudin-3-spezifischen Hybridisierungssonde wurde zunächst RNA aus murinem Darmgewebe isoliert und mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation der cDNA erfolgte mit zwei genspezifischen Primern (mmCLDN03REV, mmCLDN03FOR), die nach der veröffentlichten cDNA-Sequenz für das murine Claudin-3 (Genbank AF087821) hergestellt wurden. Das 246 bp lange PCR Produkt wurde elektrophoretisch aufgereinigt und mittels T4 Ligase in den Plasmid-Vektor pGEM-T ligiert. Nach Transformation in kompetente *E. coli* TOP10F' Bakterien und Weiß/Blau-Selektion auf Ampicillin-haltigen Agarplatten wurden weiße Kolonien zur Plasmidpräparation eingesetzt. Die Insertion des Claudin-3-spezifischen Fragmentes wurde durch Nukleinsäuresequenzierung bestätigt.

Zur Herstellung der radioaktiven Hybridisierungssonde wurde das Insert mit den Restriktionsenzymen *Not*I und *Nco*I aus dem Vektor ausgeschnitten und nach Elektrophorese aufgereinigt. Das Fragment wurde mit α -³²P-dCTP radioaktiv markiert und als Sonde zur Hybridisierung der RZPD Nylon-Membran mit der Nummer 104.38.231 eingesetzt. Die Hybridisierung der RZPD Nylon-Membran erfolgte hier bei 60°C. Die Nylon-Membran wurde anschließend zweimal je 10 min mit 2XSSC/0,1%SDS bei Raumtemperatur gewaschen. Die immobilisierte Radioaktivität wurde durch Belichtung einer Bildplatte über Nacht gespeichert. Das Auslesen der

Bildplatte erfolgte mit dem Fluoreszenz-Imager. Die aus den Koordinaten der Hybridisierungssignale nach Vorgabe des RZPD errechneten Identifizierungs-codes wurden zur Bestellung der assoziierten Cosmid-Klone verwendet. Der hier zur weiteren Subklonierung verwendete Cosmid-Klon trägt die Bezeichnung RPCI 5-999C07.

4.2.4. Subklonierung der Claudin-3-Promotor-spezifischen Sequenzen

Der so erhaltene Cosmid-Klon (pCYPAC2-Derivat in *E.coli* DH10B) wurde mit Kanamycin-haltigem Medium amplifiziert und nach Aufreinigung mit sieben verschiedenen Restriktionsenzyme (*Bam*HI, *Bst*EII, *Nco*I, *Nhe*I, *Sal*I, *Sma*I, *Sgr*AI) geschnitten. Die Restriktionsfragmente wurden auf einem 0,5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (**Abb. 9A**).

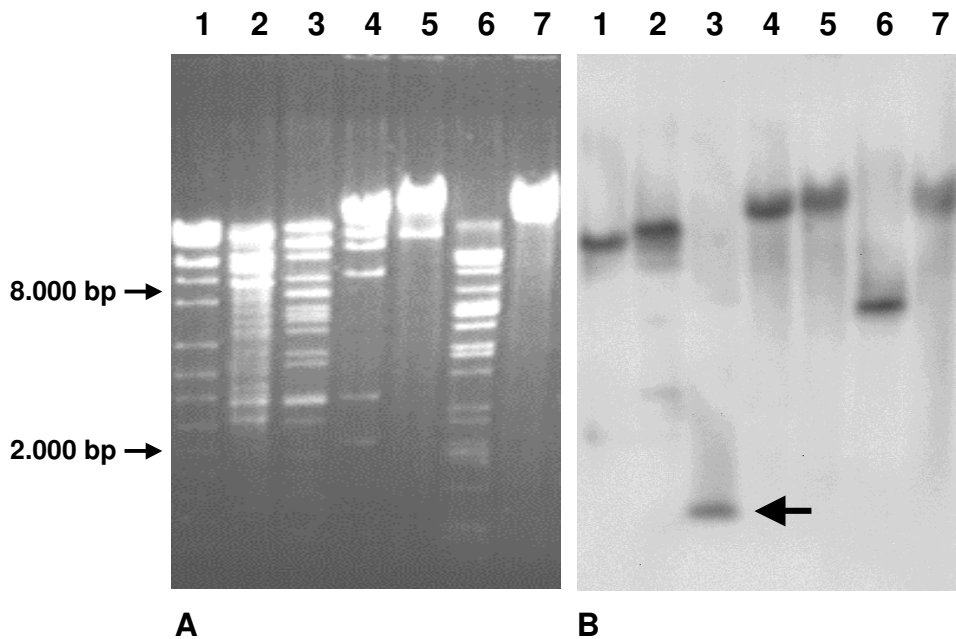


Abb. 9 **A** Agarosegel mit Restriktionsfragmenten des über Hybridisierung mit einer Claudin-3-spezifischen Sonde identifizierten Cosmid-Klons. 1: *Bam*HI, 2: *Bst*EII, 3: *Nco*I, 4: *Nhe*I, 5: *Sal*I, 6: *Sma*I, 7: *Sgr*AI; jeweils 10 μ l.

B Southern blot aus dem Agarosegel nach Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Claudin-3-spezifischen Sonde. Bezeichnung der Spuren wie unter A.

Um die Claudin-3-spezifischen Fragmente zu identifizieren, wurde die in dem Gel aufgetrennte DNA im Southern Blot Verfahren mit einer Claudin-3-spezifischen Digoxigenin-markierten Sonde hybridisiert. Zur Herstellung der Digoxigenin-markierten Sonde wurden die Primer mmCLDN03FOR und mmCLDN03REV (abgeleitet aus der veröffentlichten Genbank-Sequenz AF087821, Nukleotid Position

243-488) verwendet. Mit dem in der PCR entstandenen 246 bp Fragment wurde im Southern Blot Claudin-3 spezifische Fragmente detektiert (**Abb. 9B**). Ein etwa 1300 bp großes Fragment aus dem *Nco*I-Verdau wurde zur weiteren Analyse in einen mit *Nco*I linearisierten sowie dephosphorylierten pGEM-T-Easy Vektor ligiert.

Die Sequenz dieses Fragments entspricht einem Teil der veröffentlichten cDNA-Sequenz für das humane Claudin-3. Da das Fragment keine Sequenzen oberhalb des durch die cDNA vorgegebenen möglichen Transkriptionsstartpunktes

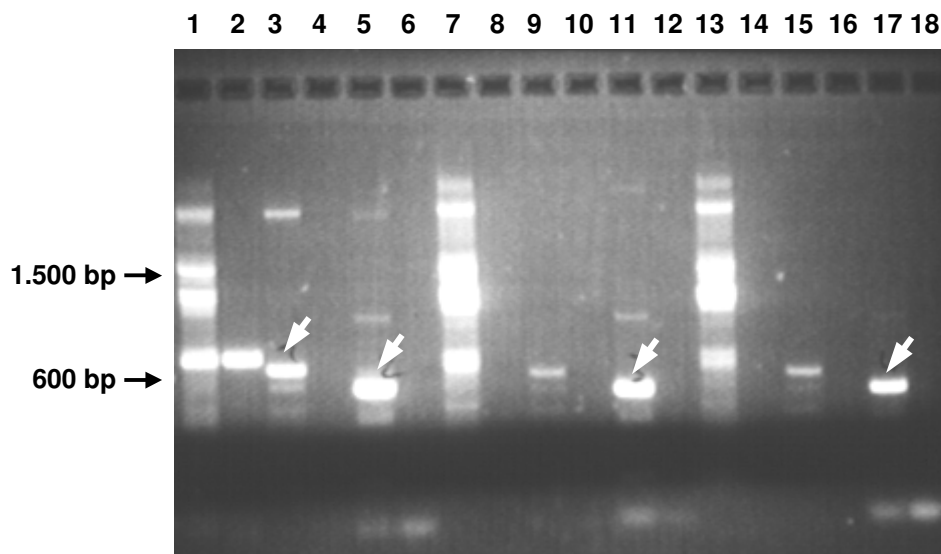


Abb. 10 Agarosegel mit Produkten aus der PCR mit Claudin-3-spezifischen Oligonukleotiden und dem zuvor identifizierten Cosmid-Klon als Matrize. 1: G/H+, 2: G/H-, 3: G/M+ 4 : G/M-, 5: G/K+, 6: G/K-, 7: I/H+, 8 : I/H-, 9: I/M+, 10: I/M-, 11: I/K+, 12 : I/K-, 13: L/H+, 14: L/H-, 15: L/M+, 16 : L/M-, 17: L/K+, 18: L/K-; jeweils 10 µl. Angegeben ist jeweils die Primer-Kombination. +: mit Cosmid, -: Kontrolle, ohne Cosmid.

enthält, war es für eine Promotor-Analyse nicht ausreichend. Die GenBank-Suche mit der Sequenz ergab jedoch eine Homologie zu einem Bacmid-Klon mit humaner genomischer DNA (GenBank Nr. AC093168). Auf der Basis dieser genomischen Sequenz wurden Primer hergestellt, die die Promotor-Region des Claudin-3 Gens beinhalten sollten. Der vorliegende Cosmid-Klon wurde als Matrize für eine PCR mit den unterschiedlichen und überlappenden Primer Kombinationen humCLDN3 -G/H, -G/M, -G/K, -I/K, -I/H, -I/M, -L/H, -L/M und -L/K verwendet. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. (**Abb. 10**)

Die Banden mit einer Größe zwischen 516-659 bp (je nach Primerpaar) wurden aus dem Gel ausgeschnitten (siehe Pfeilmarkierung), gereinigt und in den Plasmid-Vektor pCR2.1-TOPO ligiert und nach Transformation, Amplifikation und Aufreinigung sequenziert.

4.3. Sequenzierung der Claudin-Promotoren

Um die klonierten Bereiche strukturell charakterisieren zu können, wurde von den inserierten Claudin-spezifischen Fragmenten die Nukleotidsequenz bestimmt. Für die Sequenzierung wurden für die pGEM-T- und pGEM-T-Easy-Derivate die Vektor-spezifischen Primer T7 und GEMREV und für die pCR2.1-TOPO-Derivate die Vektor-spezifischen Primer M13REV und M13FOR verwendet. Bei jeder Sequenzierung konnten zwischen 200-400 Nukleotide ermittelt werden. Auf der Basis der erhaltenen Sequenzinformation wurden neue genspezifische Primer generiert, um schrittweise die Sequenz des gesamten Promotor-Fragmentes zu bestimmen.

4.3.1. Sequenzierung des Claudin-1 Promotors

Für die inserierten Fragmente der Klone pgCLDN1-3, -7, -8, -11 und -15 wurden mit den Primern T7 und GEMREV von beiden Seiten der Klonierungsstelle ansequenziert. Alle Sequenzen waren identisch. Durch Vergleich der Sequenzen mit der veröffentlichten GenBank Sequenz (AC069507, humane genomische DNA von Chromosom 3, Nukleotidposition 11686-13457) wurde eine Größe von 1772 bp für das Claudin-1 spezifische Fragment ermittelt. Aus dem Plasmid pgCLDN1-3 wurde ein Fragment mit einer Länge von 789 bp (enthält Position 12179-12967 aus der genomischen Genbank Sequenz AC069507) mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *SmaI* isoliert und in den Reporter-gen-Vektor pGL3-Basic kloniert. Dieses 789 bp lange Claudin-1 Promotorfragment wurde mittels überlappender Primer vollständig sequenziert. (**Abb. 11**).

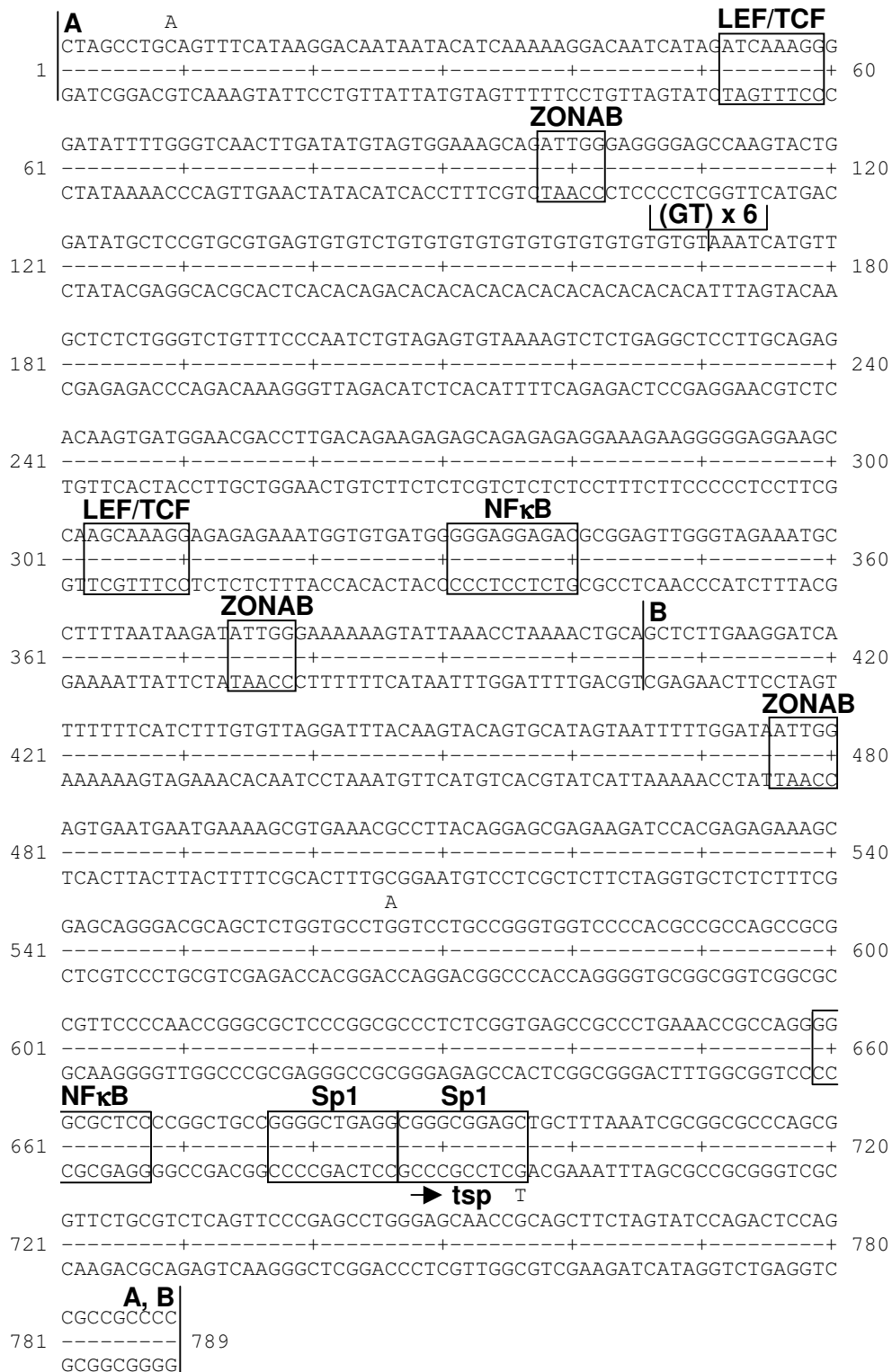


Abb. 11 Nukleotidsequenz des Claudin-1-spezifischen Promotors

Das 789 bp Fragment enthält den Transkriptionsstartpunkt für die humane Claudin-1 mRNA. Der Nukleotidsequenz ist identisch mit einer Sequenz von Chromosom 3 (Genbank Nr. AC 069507), was mit der Lokalisation des Genlocus von Claudin-1 auf dem humanen Chromosom 3q28-q29 übereinstimmt (Halford et al., 2000). Aus dem Vergleich einer Sequenz, die die genomische Organisation des Claudin-1-Gens beschreibt (Genbank Nr. AC 260403; Krämer et al., 2000) mit der hier ermittelten Promotorsequenz wurde an drei Stellen ein Basenaustausch (Position 9: C zu A, 566: G zu A und 765: G zu T) identifiziert. Weiterhin fehlen im Vergleich zur publizierten Sequenz sechs (GT)-Dinukleotide hinter der Position 170. Der Transkriptionsstartpunkt der Claudin-1 mRNA wurde mittels zweier verschiedener cDNA Sequenzen (Genbank Nr. AF134160 und AF101051) nahe der Position 747 lokalisiert. Es wurden eine Reihe von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen identifiziert: zwei Sp1 (5'-KGGCGGKRRY-3') Bindungsstellen vor einer AT-reichen Box, zwei Bindungsstellen für nukleäre Effektoren des Wnt Signaltransduktionsweg (LEF/TCF, 5'-WWCAAWGG-3'), drei Bindungsstellen für das ZO-1 assoziierte Nukleinsäure-Bindungsprotein ZONAB (5'-CCAAT-3') sowie zwei Bindungsstellen für NF- κ B (5'-GGGRNNYYCC-3' und 5'-GGGAGGAGTC-3').

4.3.2. Sequenzierung des Claudin-2 Promotors

Für Claudin-2 wurden 12 Plasmidklone beidseitig der Klonierungsstelle mit den Primern T7 und GEMREV sequenziert. Die Klone wurden pgCLDN2-1,1-12 genannt. Die Sequenzen der inserierten Fragmente waren fast identisch. Klon pgCLDN2-1,12 zeigt an der Position 203 einen Basenaustausch. Dieses Phänomen ist mit einem fehlerhaftem Einbau von Nukleotiden bei der Polymerisationsreaktion zu erklären.

Abb. 12 zeigt die Sequenz des Claudin-2 spezifischen Fragments in Klon pgCLDN2-1,1. Das Insert hat eine Länge von 420 bp. Die Sequenz weist verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie z.B. LEF/TCF (Lymphoid Enhancer Faktor, T-Zell Faktor), NF κ B (nuclear factor kappa B) und Cdx (caudal related homeoprotein) auf. An der LEF/TCF Bindungsstelle binden nukleäre Effektoren des Wnt Signaltransduktionsweges. LEF/TCF spielt eine Rolle bei Zelldifferenzierung und Zellpolarisierung. NF κ B wird durch TNF α (Tumornekrosefaktor alpha) aktiviert. Die Untersuchung von NF κ B hat eine große Bedeutung für die Feststellung der Wirkung

pro-inflammatorischer Zytokine auf die Claudin Genexpression. Cdx gehört zur Gruppe der zuerst bei Drosophila identifizierten Caudal related homeobox Gen-Familie, die für die Zelldifferenzierung bei Menschen eine Rolle spielt. Die potentielle Translationsstartstelle (ATG) konnte durch die strukturelle Analyse der Nukleotidsequenz identifiziert werden. Ab der Position 267 bis zur Position 420 sind noch drei weitere ATGs zu identifizieren. Der Transkriptionsstartpunkt im Claudin-2 Promotor wurde durch Vergleich mit einer murinen cDNA Sequenz (GenBank Nr. AK004990) bei Position 216 lokalisiert.

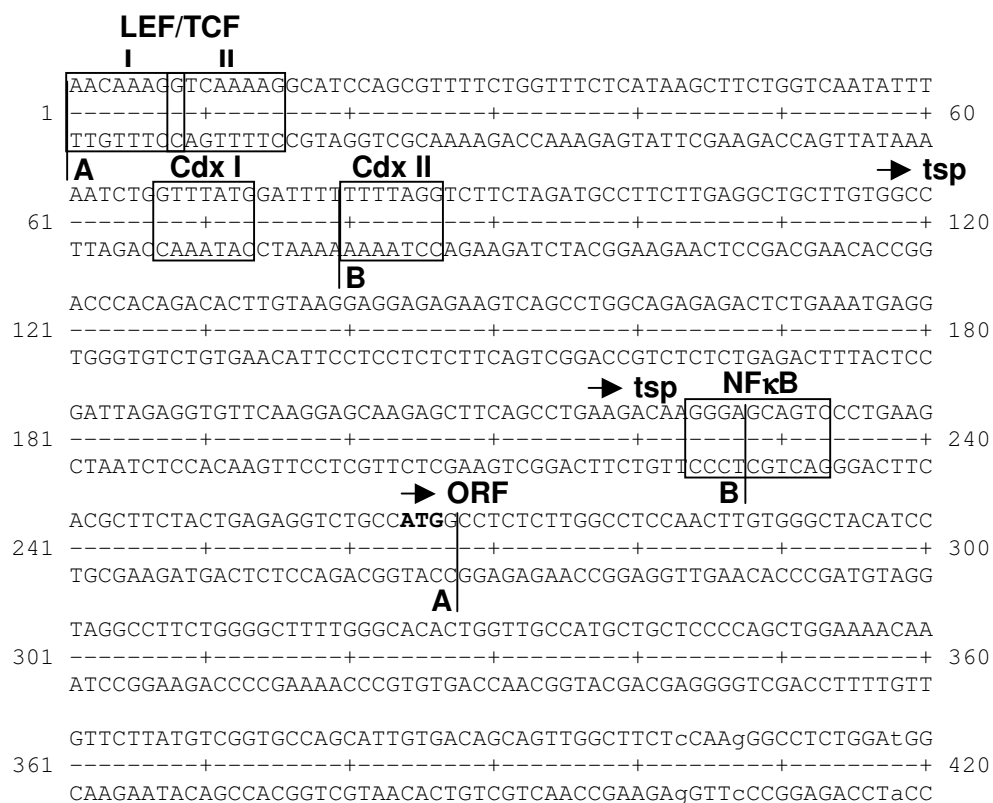


Abb. 12 Nukleotidsequenz des Claudin-2-spezifischen Promotors

4.3.3. Sequenzierung des Claudin-3 Promotors

Aus den nach Klonierung der Claudin-3-spezifischen PCR-Fragmente erhaltenen Plasmiden wurden 6 Klone (pgCLDN3-3, -8, -11, 25 und -37) von beiden Seiten mit den vektorspezifischen Primern M13FOR und M13REV ansequenziert. Daraus wurde ein Klon ausgewählt, der ein 628 bp langes Fragment, dass mit den Primern humCLDN3G und humCLDN3M amplifiziert worden war, enthält. Das Insert dieses Klons wurde vollständig sequenziert. Der humane Claudin-3 Promotor (**Abb.**

13) enthält ebenfalls Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor LEF/TCF sowie für NF κ B. Weiterhin weist die Sequenz eine Bindungsstelle für den kürzlich entdeckten Transkriptionsfaktor ZONAB (Zonula occludens nucleic acid binding protein) auf. ZONAB ist ein ZO-1-assoziiertes DNA-Bindungsprotein, das an die SH3 Domäne von ZO-1 bindet (Balda & Matter, 2000a). ZONAB ist sowohl im Nukleus als auch an der Tight Junction lokalisiert und bindet an eine spezifische DNA-Sequenz (5'-CCAAT-3'). ZONAB spielt eine Rolle bei der Regulation der Genexpression und der epithelialen Differenzierung. Der Transkriptionsstartpunkt liegt nach Vergleich mit der humanen cDNA Sequenz für die RVP1 mRNA (GenBank Nr. AB000714) etwa 40 bp stromabwärts des Promotor-Fragmentes.

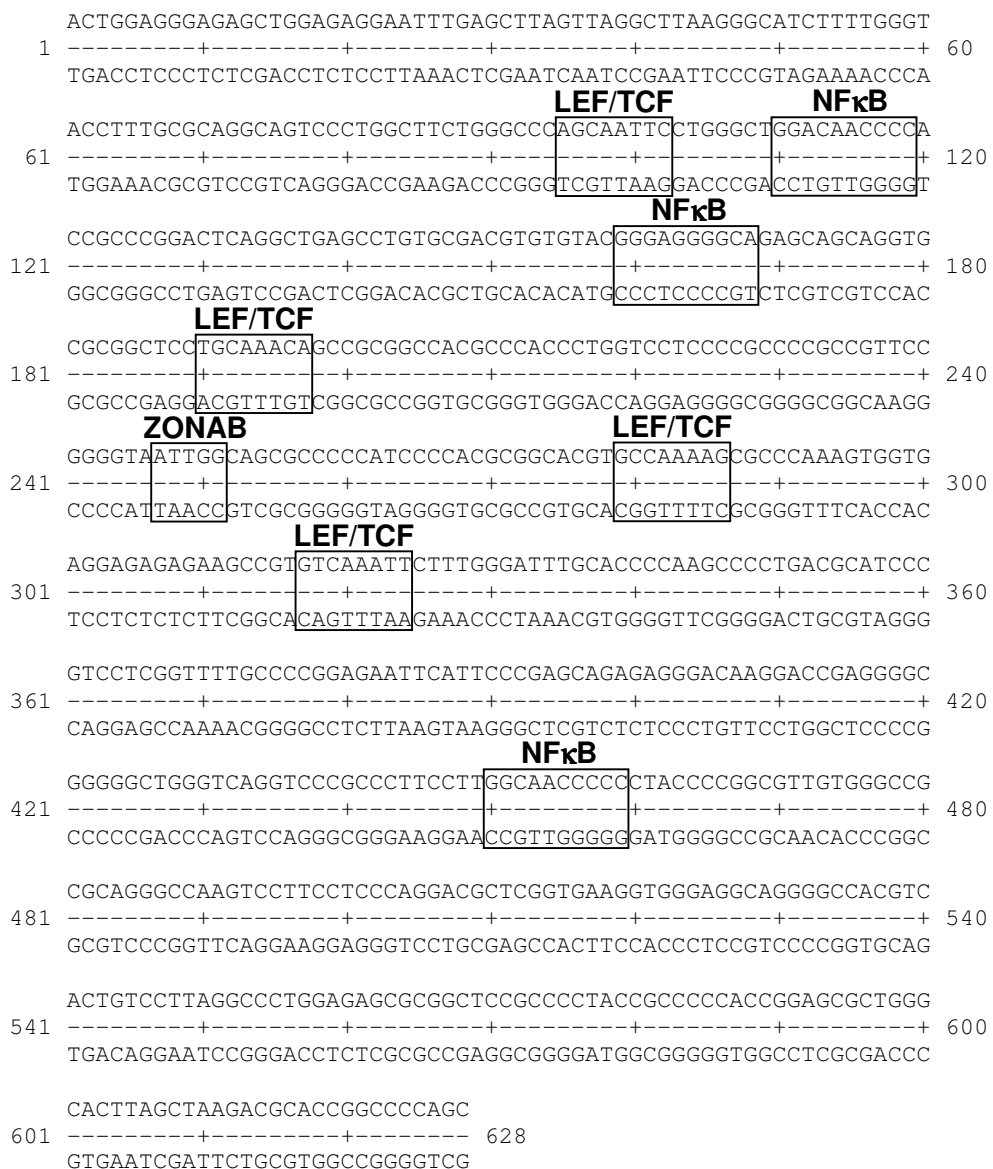


Abb. 13 Nukleotidsequenz des Claudin3-spezifischen Promotors

4.3.4. Sequenzierung des Claudin-4 Promotors

Sechs durch Genome Walking mit Claudin-4-spezifischen Primern erhaltene Klone (pgCLDN4-4, -5, -6, -7, -8 und -9) wurden von beiden Seiten mit den Primern M13FOR und M13REV sequenziert. Alle sechs Klone wiesen identische Sequenzen auf. Die identifizierte humane Claudin-4-spezifische Sequenz (**Abb. 14**) hat eine Größe von 357 bp. Der Transkriptionsstartpunkt befindet sich nach Vergleich mit der humanen CPE-R mRNA (GenBank Nr. AB000712) an Position 256. In der Promotor-Region sind drei Bindungsstellen für LEF/TCF und eine Bindungsstelle für NFκB identifizierbar. Weiterhin sind nach struktureller Analyse der Nukleotidsequenz eine Reihe von potentiellen Translationsstartpunkten (ATG) zu sehen. Daher ist davon auszugehen, dass sich die regulatorischen Sequenzen zwischen dem Cluster an ATG Sequenzen des sequenzierten Fragmentes und dem Beginn der publizierten cDNA Sequenzen befinden.

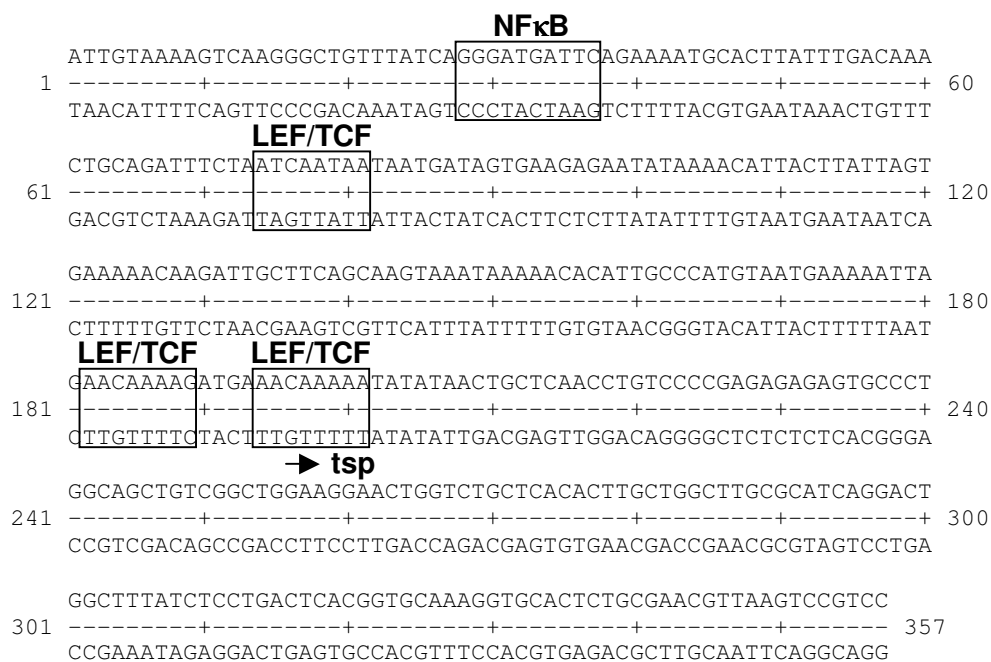


Abb. 14 Nukleotidsequenz des Claudin-4-spezifischen Inserts im Plasmid pgCLDN4-9

4.4. Funktionelle Analyse der Claudin-spezifischen Promotoren

Nach struktureller Analyse wurden die Claudin-Promotor-spezifische Fragmente komplett oder teilweise zum Nachweis der Promotor-Funktion in einen Luciferase-Reporter-gen-Vektor umkloniert. Die promotorspezifischen Fragmentgrößen betragen 789 bp für Claudin-1, 267 bp für Claudin-2, 628 bp für Claudin-3 und 357 bp für Claudin-4. Die Reporter-gen-Konstrukte wurden in die humane intestinale Epithel-Zelllinie HT-29/B6 transfiziert. Bei aktivem Promotor wird in den Zellen das Luciferase-Gen exprimiert. Die Promotor-Aktivität im Zellextrakt konnte mit der beim Substratumsatz durch die Luciferase einhergehenden Luminiszenzreaktion nachgewiesen werden.

4.4.1. Klonierung in den Luciferase Reporter-gen-Vektor

pGL3-Basic ist ein Reporter-gen-Vektor mit einer Größe von 4818 bp und besitzt unter anderem ein Ampicillin-Resistenzgen und ein Luciferase-Gen. Das Luciferase-Gen ist ein Reporter-gen, das in der verwendeten HT-29/B6-Zelllinie nur exprimiert wird, wenn es unter der Kontrolle eines aktiven Promotors steht. Die DNA-Fragmente wurden daher zur funktionellen Analyse aus den Klonierungs-Vektoren mit spezifischen Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in den Luciferase-Reporter-gen-Vektor umkloniert.

Für Claudin-1 wurde ein Fragment mit einer Länge von 789 bp (enthält Position 12179-12967 aus der genomischen Genbank Sequenz AC069507) aus dem Plasmid pgCLDN1-3 mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *SmaI* isoliert. Für Claudin-3 wurde ein 628 bp Fragment aus dem Plasmid pgCLDN3-8 mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *XhoI* herausgeschnitten. Für Claudin-4 wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* ein Fragment aus dem Plasmidklon pgCLDN4-9 herausgeschnitten, welches das 357 bp große Claudin-4-spezifische Promotorfragment enthält. Die Enden der Fragmente für Claudin-1, -3 und -4 wurden mit DNA Polymerase I (Klenow-Fragment) und Nukleotidtriphosphaten aufgefüllt. Anschließend wurden die Fragmente über ein Agarosegel aufgereinigt. Der Reporter-gen-Vektor pGL3-Basic wurde mit dem Restriktionsenzym *SmaI* stromaufwärts vom Luciferasegen gespalten, mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und ebenfalls über ein Agarosegel aufgereinigt.

Für Claudin-2 wurde aus dem Klon pgCLDN2,1-12 ein Fragment mit dem Restriktionsenzym *NcoI* isoliert, das die ersten 267 bp des Claudin-2-spezifischen Promotorfragmentes enthält. Die entstehende Bande wurde über ein Agarosegel aufgereinigt. Der pGL3-Basic Vektor wurde ebenfalls mit dem Restriktionsenzym *NcoI* stromaufwärts von Luciferasegen gespalten, mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt.

Alle vier Fragmente sowie die entsprechend behandelten Vektoren erhielten damit auf beiden Seiten gleiche und miteinander kompatible Enden. Eine Klonierung der Fragmente in beide Richtungen wurde damit sichergestellt. Fragmente und Vektor wurden mit T4-DNA Ligase miteinander verknüpft.

Das Claudin-2 Reporter-gen-Konstrukt wurde in kompetente *E.coli* JM-109 Bakterien transformiert. Für die Transformation der Claudin-1, -3 und -4 Reporter-gen-Konstrukte wurden kompetente *E.coli* TOP10F' Bakterien verwendet.

Nach Selektion, Amplifikation und Plasmidisolierung wurde die Plasmid-DNA im Agarosegel auf ihre Größe überprüft. Vektoren mit inserierten Fragmenten wiesen gegenüber dem nativen pGL3-Basic Vektor eine geringere elektrophoretische Mobilität auf. Durch DNA-Sequenzierung mit den Primern pGL3FOR und pGL3REV, die hinter bzw. vor der Klonierungsstelle im Vektor binden, wurde die Klonierung der Promotor-Inserts verifiziert und die native bzw. reverse Orientierung festgestellt. Mit nativer Orientierung ist hier gemeint, dass die stromaufwärts des Luciferase-Gens gelegenen Promotor-Sequenzen in derselben Orientierung vorliegen, wie dies in der genomischen DNA hinsichtlich des Claudin-Gens der Fall ist. Um genügend DNA für die Transfektion in die HT-29/B6-Zellen zu erhalten, wurde ein Plasmid Midiprep durchgeführt und die Konzentration der Plasmid DNA durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt. Die Klone wurden nach der Umklonierung in den pGL3-Basic Luciferase-Reporter-gen-Vektor je nach Orientierung des Inserts (+ = native Orientierung, - = inverse Orientierung) pCLDN1prolucA+/A-, pCLDN2prolucA+/A-, pCLDN3prolucA+/A- und pCLDN4prolucA+/A- genannt.

4.4.2. Verkürzung einzelner Promotorsequenzen

Zur Eingrenzung der für die Claudin-1- und Claudin-2-spezifischen Promotor-Aktivität wurden die entsprechenden Sequenzen mit Restriktionsenzymen gespalten. Für ein verkürztes Claudin-1-Fragment wurde das Plasmid pCLDN1prolucA+ mit

den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Nhe*I (Position 406-789) geschnitten und die 5' überhängende Enden mit DNA Polymerase I (Klenow-Fragment) und Nukleotidtriphosphaten aufgefüllt. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem Agarosegel wurde das Reportergenkonstrukt mit der auf 384 bp verkürzten Promotorsequenz aus der Gelmatrix extrahiert und religiert. Für ein verkürztes Claudin-2-Fragment wurde das Plasmid pCLDN2proLucA+ mit dem Restriktionsenzym *Bbs*I (Position 80-227) geschnitten und die 5' überhängenden Enden mit DNA Polymerase I (Klenow-Fragment) und Nukleotidtriphosphaten aufgefüllt. Das gewünschte 148 bp Fragment wurde nach Auftrennung auf einem Agarosegel aus der Gelmatrix isoliert. Das aufgereinigte Promotor-spezifische Fragment wurden anschließend mit T4 DNA-Ligase in den Luciferase Reportergen-Vektor pGL3-Basic, der mit *Sma*I linearisiert und mit alkalischer Phosphatase (CIP) dephosphoryliert wurde, ligiert. Nach Transformation in kompetente *E.coli* DH5- α (Claudin-1) bzw. TOP10F' (Claudin-2) Bakterien wurden die Plasmide wie oben beschrieben identifiziert und verifiziert. Die entstandenen Reportergenkonstrukte wurden pCLDN1proLucB+ sowie pCLDN2proLucB+ genannt.

4.4.3. Transfektion in HT-29/B6-Zellen und Nachweis der Promotor-Aktivität

Für die Regulation der Genexpression sind die stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes eines Gens gelegenen DNA Sequenzen wichtig. Hier wurden zur funktionellen Analyse der Genregulation der Claudin-Gene 1-4 entsprechende Promotorsequenzen, die in den Reportergen-Vektor pGL3-Basic kloniert wurden, in die eukaryontische Zelllinie HT-29/B6 transfiziert. Die HT-29/B6 Zelllinie ist ein in unserem Labor isolierter Subklon der intestinalen epithelialen Colonicarcinom-Zelllinie HT-29 (Kreusel et al., 1991) die sich besonders gut zur Analyse der epithelialen Barrierefunktion eignet. Zur Standardisierung der Transfektionseffizienz wurde als Coreporter das Plasmid phRL-null eingesetzt. phRL-null exprimiert eine modifizierte Luciferase aus *Renilla luciformis*, deren Lumineszenz-Reaktion sich im Luminometer durch eine gegenüber der Luciferase aus *Photinus pyralis* (die aus den pGL3-Basic-Derivaten exprimiert wird) veränderte Substratspezifität abgrenzen lässt. Als Negativkontrolle wurde jeweils pGL3-Basic (Luciferasegen ohne Promotor) benutzt. Ein Tag vor der Transfektion wurden 6-Loch-Gewebekulturplatten mit HT-29/B6-Zellen ausgesät und über Nacht bei 37°C im Begasungsbrutschrank inkubiert. Die DNA wurde

mit Lipofectamine System in die Zellen transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit DNA-Fragmente für die weitere 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

24 Stunden nach der Transfektion wurden die Luciferase Aktivitäten in den Extrakten aus den transfizierten HT-29/B6-Zellen mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System bestimmt. Mit diesem System konnte im gleichen Zellextrakt die Messung der Reporter- und Kontrollreporter-Aktivitäten ermöglicht werden. Dieser Assay enthält die Substrate Luciferin (für *Photinus* Luciferase) und Coelenterazin (für *Renilla* Luciferase), die bei ihrer Umsetzung zu Oxyluciferin und Coelenteramid eine Lumineszenz-Reaktion zeigen.

Für alle Claudin-Promotoren konnte eine deutliche Zunahme der Luciferase-Aktivität gegenüber dem promotorlosen Konstrukt pGL3-Basic nachgewiesen werden. Der Claudin-1-Promotor (**Abb. 15**) und der Claudin-2-Promotor (**Abb. 16**) zeigen in inverser Orientierung nur eine sehr schwache bzw. Basis-Aktivität. Dagegen zeigen die Promotoren für Claudin-3 (**Abb. 17**) und Claudin-4 (**Abb. 18**) auch in inverser Orientierung eine deutliche Erhöhung der Luciferase-Aktivität, was auf einen Promotor für ein in dieser Richtung gelegenes Gen hinweist. Die Verkürzung des Claudin-1-Promotors zeigt eine dem unverkürzten Promotor vergleichbare Aktivität (**Abb. 15**). Dagegen zeigt die Verkürzung der Claudin-2-Promotorsequenz eine deutliche Reduktion der Luciferase-Aktivität (**Abb. 16**), was auf einen Einfluss der deletierten Bereiche auf die Promotor-Aktivität hinweist.

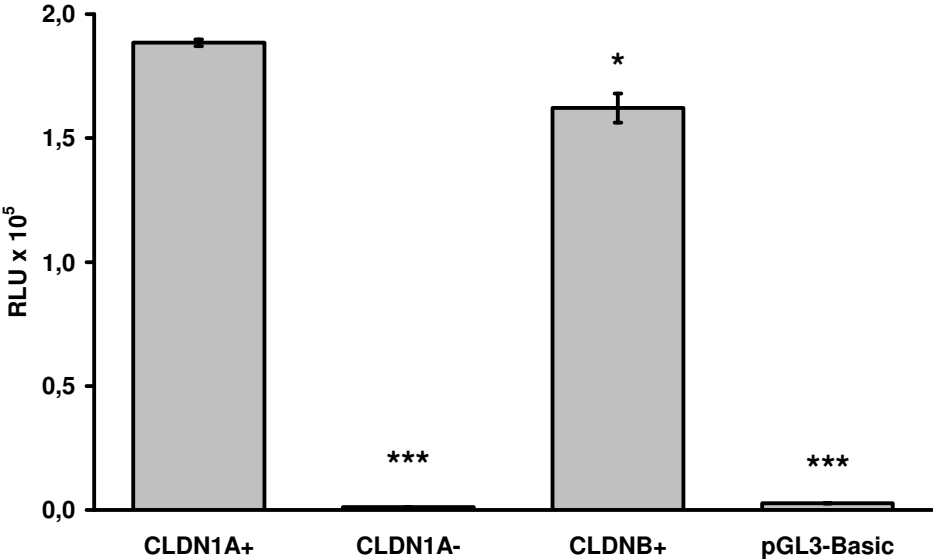


Abb. 15 Claudin-1-Promotor-vermittelte Expression von Luciferase in HT-29/B6-Zellen.

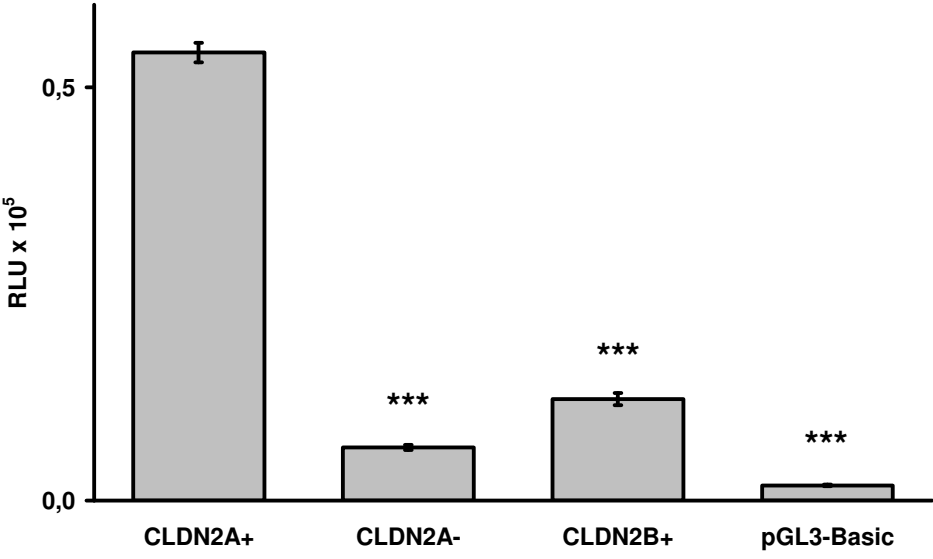


Abb. 16 Claudin-2-Promotor-vermittelte Expression von Luciferase in HT-29/B6-Zellen.

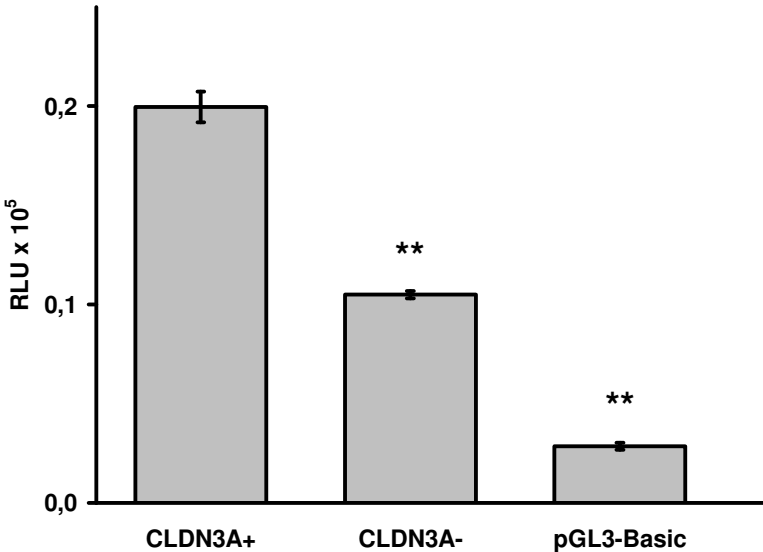


Abb. 17 Claudin-3-Promotor-vermittelte Expression von Luciferase in HT-29/B6-Zellen.

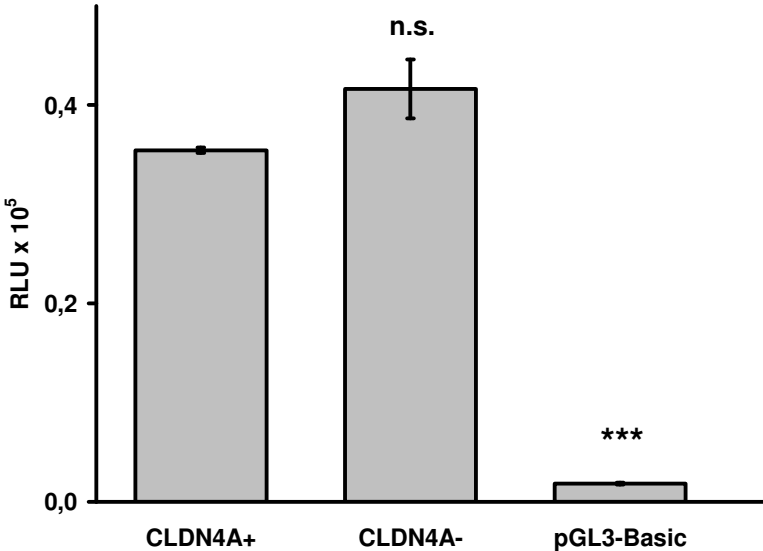


Abb. 18 Claudin-4-Promotor-vermittelte Expression von Luciferase in HT-29/B6-Zellen.

4.4.4. Einfluss von pro-inflammatorischen Zytokinen auf die Claudin-Promotor-Aktivität

Die Veränderung der Barriereeigenschaften der verwendeten HT-29/B6-Zelllinie durch pro-inflammatorische Zytokine lässt sich elektrophysiologisch durch eine Abnahme des transepithelialen Widerstandes untersuchen. Daher wurde der Widerstandsverlauf nach Zugabe von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ zu etwa sieben Tage alten, auf Filtern kultivierten konfluenten HT-29/B6-Monolayern gemessen.

Nach basolateraler Zugabe von 2500 U/ml $\text{TNF}\alpha$ und 24 h Inkubation wurde eine Abnahme des transepithelialen Widerstandes auf $21\pm 2\%$ des Wertes vor Zytokingabe im Vergleich zu $94\pm 5\%$ bei der unbehandelten Kontrolle gemessen. Die Zugabe von 25 U/ml $\text{IFN}\gamma$ alleine ergab mit einem Wert von $92\pm 3\%$ keine signifikante Änderung des Widerstandes. Bei kombinierter Zugabe von 2500 U/ml $\text{TNF}\alpha$ und 25 U/ml $\text{IFN}\gamma$ wurde mit einer Abnahme des Widerstandes auf $22\pm 2\%$ keine weitere Verminderung im Vergleich zur alleinigen Gabe von $\text{TNF}\alpha$ festgestellt (**Abb. 19**).

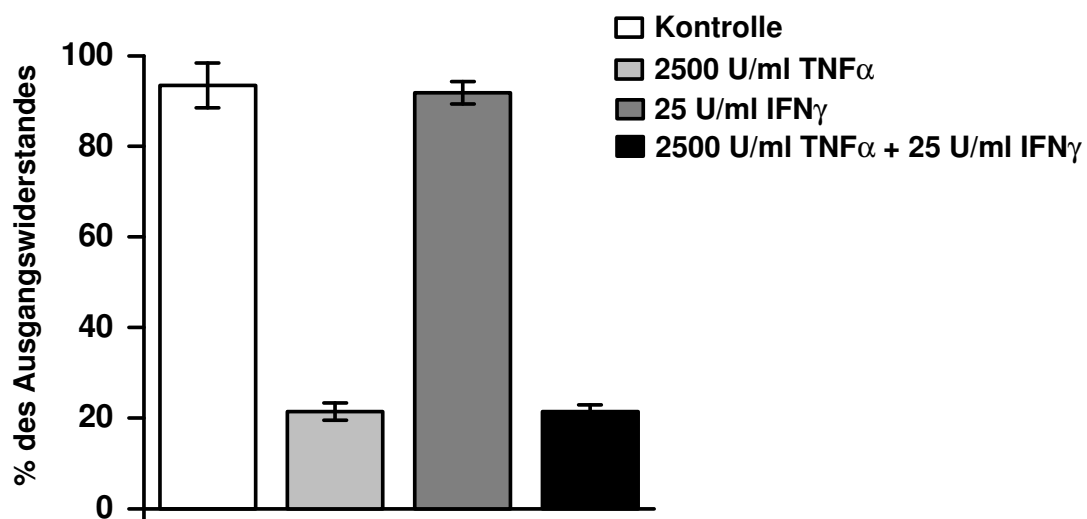


Abb. 19 Veränderung des transepithelialen Widerstandes bei HT-29/B6-Zellen nach Zugabe von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ einzeln und in Kombination.

Die Veränderung der elektrophysiologischen Parameter in Anwesenheit von Zytokinen korreliert mit einer Veränderung der epithelialen Barriere wie sie auch bei entzündlichen Darmerkrankungen festgestellt werden kann. Diese Veränderungen manifestieren sich morphologisch in einem Umbau der Tight Junction-Architektur und können in Western- und Northern Blot-Experimenten durch eine veränderte Expression der am Aufbau der Tight Junction beteiligten Proteine nachgewiesen werden. Auf diesem Hintergrund wurde die Aktivität der Promotoren für Claudin-1, -2, -3 und -4 unter Anwesenheit der pro-inflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ untersucht. Auch diese Analysen wurden mit dem HT-29/B6-Zellkultursystem durchgeführt, da diese Zellen für die verwendeten Zytokine Rezeptoren aufweisen bzw. reaktiv sind. Vier Stunden nach Transfektion wurde $\text{TNF}\alpha$ (2500 U/ml) bzw. $\text{IFN}\gamma$ (25 U/ml) unter Zugabe von Zellkultur-Medium zu den Zellen gegeben und für weitere 24 Stunden inkubiert. $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ wurden entweder einzeln oder in Kombination zu den Zellen gegeben.

Die Extrakte der Zellen wurden nach dem Ende der Zytokin-Behandlung zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität luminometrisch vermessen. Der Einfluss dieser Zytokine auf die Regulation der Claudin-Promoter-vermittelten Genexpression zeigen die folgenden Abbildungen. Alle Promotoren (Claudin-1, -2, -3 und -4) reagieren mit einer deutlichen Verminderung der Luciferase-Aktivitäten auf die Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$ (**Abb. 20-23**). Dagegen zeigte sich mit Ausnahme von Claudin-3 keine signifikante Veränderung der Luciferase-Aktivität nach der Inkubation des Promotors mit $\text{IFN}\gamma$. Die gleichzeitige Inkubation der Reporter-gen-Konstrukte mit beiden Zytokinen lässt sich bei allen Promotoren auf die Reduktion der Promotor-Aktivität unter der Wirkung der $\text{TNF}\alpha$ zurückführen.

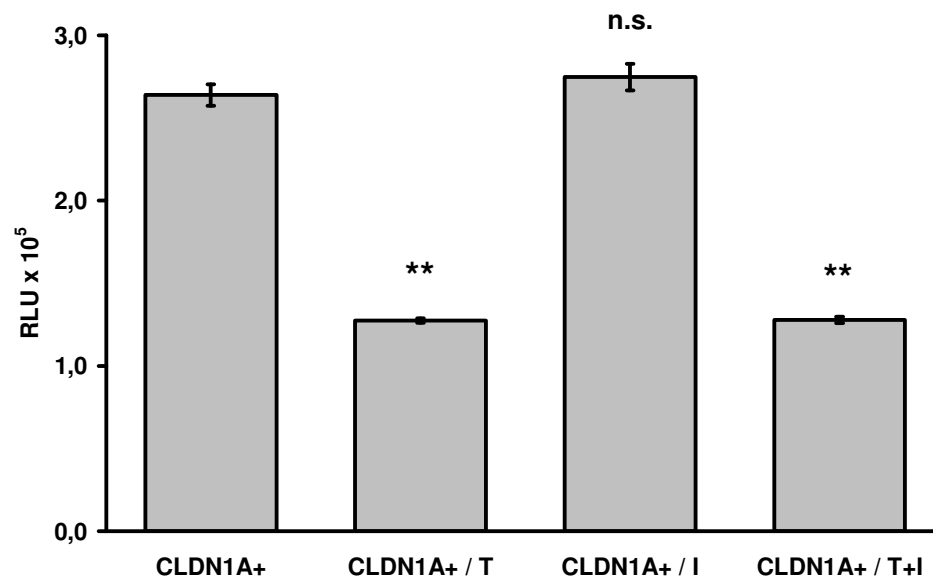


Abb. 20 Claudin-1-Promotor-vermittelte Expression von Luciferase in HT-29/B6-Zellen unter Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ (T) und $\text{IFN}\gamma$ (I).

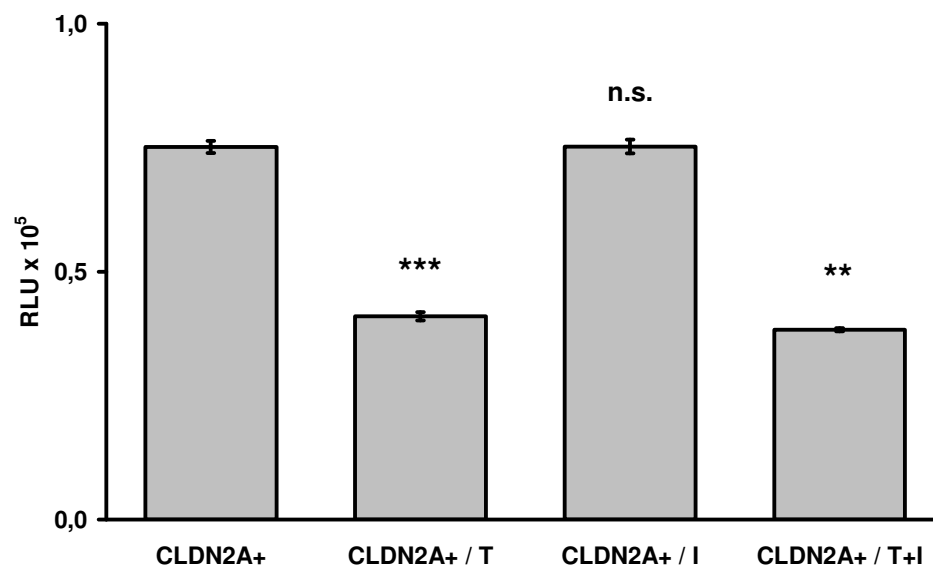


Abb. 21 Claudin-2-Promotor-vermittelte Expression von Luciferase in HT-29/B6-Zellen unter Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ (T) und $\text{IFN}\gamma$ (I).

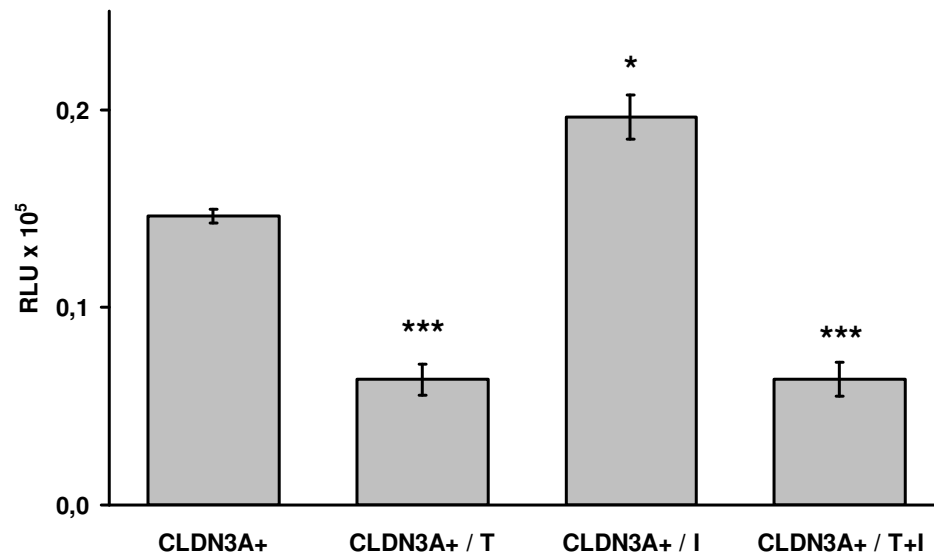


Abb. 22 Claudin-3-Promotor-vermittelte Expression von Luciferase in HT-29/B6-Zellen unter Einfluss von TNF α (T) und IFN γ (I).

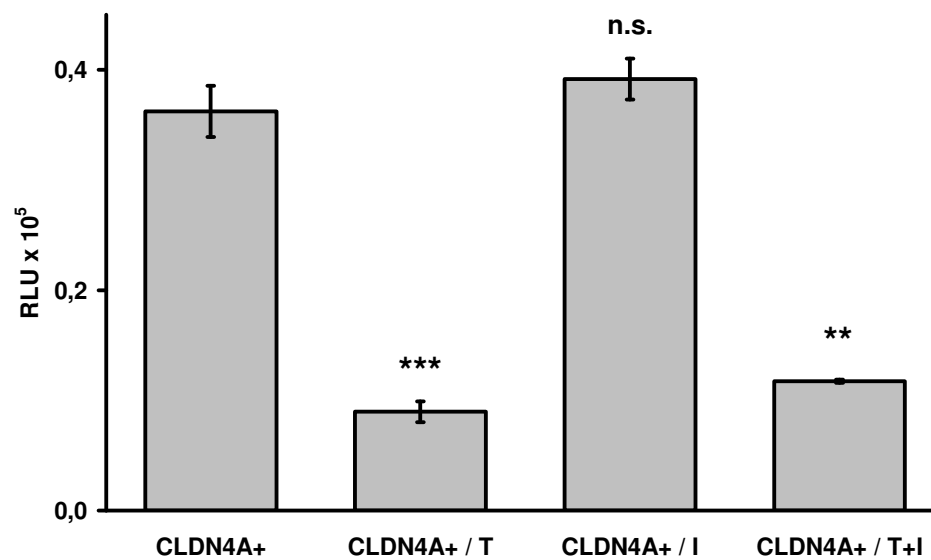


Abb. 23 Claudin-4-Promotor-vermittelte Expression von Luciferase in HT-29/B6-Zellen unter Einfluss von TNF α (T) und IFN γ (I).

Neben einer negativen Regulation abdichtender Tight Junction-Moleküle wäre die Hochregulation einer permeabilisierenden Komponente der Tight Junction, wie Claudin-2, eine plausible Erklärung für eine Störung der epithelialen Barrierefunktion. Neben $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ wurde daher mit Interleukin-6 (IL-6) ein weiteres proinflammatorisches Zytokin, das an der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmkrankungen beteiligt ist, hinsichtlich seiner Wirkung auf die Claudin-2-Promotor-Aktivität untersucht. **Abb. 24** zeigt, dass eine Zugabe von 100 U/ml IL-6 die Aktivität des Claudin-2-Promotors erhöht.

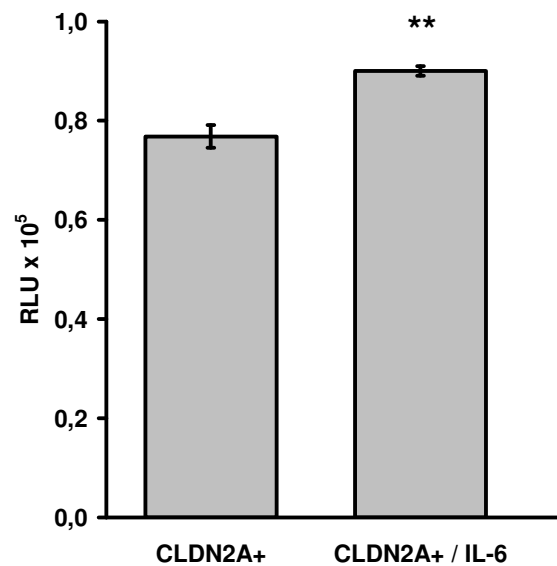


Abb. 24 Claudin-2-Promotor-vermittelte Expression von Luciferase in HT-29/B6-Zellen unter Einfluss von IL-6.