

Regulation der Genexpression des Tight junction-Proteins Claudin-2 durch Entzündungsmediatoren

Friederike Fojuth, Friederike Kuhnt, Shida Tavalali, Joachim Mankertz, Michael Fromm, Jörg-Dieter Schulzke

Abt. Gastroenterologie, Infektiologie u. Rheumatologie, Institut für Klinische Physiologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin

Einführung

Die Tight junction befindet sich im Bereich der Zonula occludens epithelialer Zellen und ist an der Bildung der parazellulären Barriere beteiligt. Elektronenmikroskopisch stellt sich die Tight junction als Netzwerk verzweigter Stränge dar (Fig. 1A).

Sie bestehen aus verschiedenen Transmembran-Proteinen (Fig. 1B), wie z.B. Occludin und den Claudinen. Es wird vermutet, dass die unterschiedliche Kombination der Tight junction Proteine die Variabilität der Durchlässigkeit verschiedener Epithelien verursacht (1).

Bis jetzt sind 24 Proteine identifiziert, die der Familie der Claudine zugeordnet werden. Sie weisen untereinander ausgeprägte Homologien auf, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die parazelluläre Permeabilität. So wurde gezeigt, dass Claudin-1 eine abdichtende Funktion ausübt, wohingegen Claudin-2 (Fig. 1C) durch den Einbau von Kationenkanälen die Durchlässigkeit der epithelialen Barriere erhöht (2).

Proinflammatorische Zytokine wie TNF α und IFN γ können die epitheliale Barrierefunktion beeinflussen, indem sie die Genexpression der Tight junction Proteine regulieren (3,4).

Bis jetzt sind 24 Proteine identifiziert, die der Familie der Claudine zugeordnet werden. Sie weisen untereinander ausgeprägte Homologien auf, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die parazelluläre Permeabilität. So wurde gezeigt, dass Claudin-1 eine abdichtende Funktion ausübt, wohingegen Claudin-2 (Fig. 1C) durch den Einbau von Kationenkanälen die Durchlässigkeit der epithelialen Barriere erhöht (2).

Proinflammatorische Zytokine wie TNF α und IFN γ können die epitheliale Barrierefunktion beeinflussen, indem sie die Genexpression der Tight junction Proteine regulieren (3,4).

Hierin könnte ein möglicher molekularer Mechanismus für die Barrierefunktionsstörungen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (z.B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) liegen, bei denen lokal eine Erhöhung dieser Zytokine feststellbar ist. Die Wirkung anti-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-13 auf die Regulation der Tight junction wird derzeit intensiv erforscht.

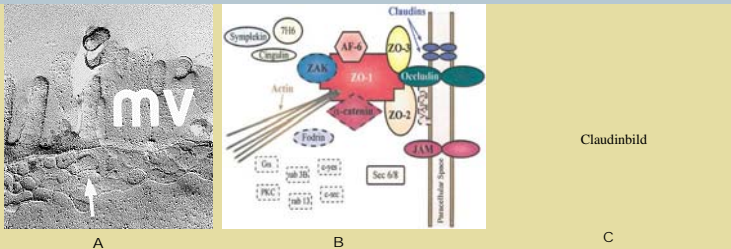


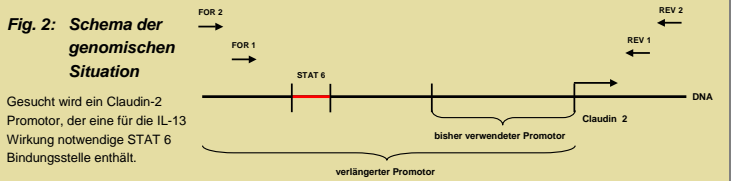
Fig. 1: Das Tight junction Netzwerk

- (A) Elektronenmikroskopischer Gefrierbruch der Tight junction Stränge einer HT-29/B6-Zelle
- (B) Wechselwirkung der Proteine der Tight junction
- (C) Claudin-2: ein integrales Membranprotein mit vier Transmembrandomänen und einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 22kD

Zielstellung

Ein Forschungsschwerpunkt der Arbeitsgruppe ist die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Regulation der Claudin-2 Genexpression durch Zytokine. TNF α induzierte nach stabiler Transfektion eine Hochregulation der Claudin-2 Expression. IL-13 zeigte aufgrund der fehlenden Bindungsstelle seines nukleären Effektors, STAT-6, in bisher verwendeten Promotor keinen Effekt (Fig. 2).

Unsere Arbeit bestand in der Herstellung einer längeren Promotorsequenz, die nach Analyse der humanen genomischen Sequenz in diesem Bereich eine potentielle STAT-6 Bindungsstelle enthält.



Literatur

- Anderson JM. Molecular Structure of Tight Junctions and Their Role in Epithelial Transport. *News Physiol Sci* 16: 126-130, 2001.
- Amashah S, Meiri N, Gilor A et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *Journal of Cell Science* 115: 4969-4976, 2002.
- Mankertz J, Tavalali S, Schulzke JD et al. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor α and interleukin 13. *Journal of Cell Science* 113: 2095-2099, 2000.
- Mankertz J, Waller JS, Hillenbrand B et al. Gene expression of the tight junction protein occludin involves differential splicing and alternative promoter usage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 298: 657-660, 2002.

Methoden und Ergebnisse

1. PCR mit genspezifischen Primern und Klonierung in den pCR^{2.1}-TOPO[®]-Vektor Humane genomische DNA wurde zunächst mit spezifischen Primern für das Claudin-2 Gen mittels PCR amplifiziert (Fig. 3). Das 2,4 kb große DNA Fragment wurde aus dem Gel extrahiert und nach Aufreinigung in den Plasmid-Vektor pCR^{2.1}-TOPO[®] ligiert (Fig. 4).

Das Ligationsprodukt wurde zur Vermehrung in kompetente *E.coli*-Bakterien (Stamm TOP10F⁺) transformiert. Nach Aufreinigung aus den Bakterien wurden die Plasmide mit Vektor-spezifischen Primern sequenziert.

Die Sequenzanalyse (Fig. 5) bestätigt, dass es sich bei dem Insert um den gesuchten Promotorabschnitt des Claudin-2-Gens handelt.

Zusammenfassung

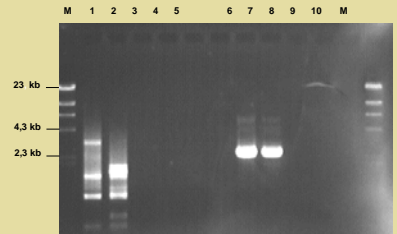
Das Protein Claudin-2 ist als Bestandteil der Tight junction an der Steuerung der Permeabilität epithelialer Barrieren beteiligt. Seine Genexpression wird durch Zytokine, wie IL-13 reguliert. Während unseres Praktikums gelang es, einen erweiterten Claudin-2-Promotor zu isolieren, der eine STAT-6 Bindungsstelle aufweist, die für die Wirkung von IL-13 notwendig ist. In den weiteren Untersuchungen wird die Arbeitsgruppe versuchen, mit Hilfe eines Reportergen-Assays den Effekt von IL-13 auf die Promotoraktivität aufzuklären.

Fig. 3: Agarosegel der Produkte aus der PCR mit Claudin-2-spezifischen Primern

Die Produkte aus der Amplifikation wurden in einem 0,7%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid über UV-Licht visualisiert.

Fig. 4: pCR^{2.1}-TOPO[®]-Vektor

Der TOPO-Vektor besitzt ein lacZ-Gen für die β -Galactosidase, die Lactose zu Glucose und Galactose hydrolysiert. Bei Zugabe des Galactose-Analogons X-Gal führt dessen Spaltung durch die β -Galactosidase zur blauen Färbung der Bakterien. Wird das lacZ-Gen durch das Einfügen eines Inserts unterbrochen, bleiben die Bakterien weiß. Durch diese sogenannte Weiß/Blau-Selektion können Bakterienkolonien, die Plasmide mit Insert enthalten identifiziert werden.



- M : λ Hind III - DNA-Fragmente
- 1 - 4 : PCR-Produkte nach Amplifikation mit den inneren Primern FOR1 und REV1 (Fig. 4)
- 5-10 : Kontrollansatz ohne DANN
- 6 - 9 : PCR-Produkte nach Amplifikation mit den äußeren Primern FOR2 und REV2 (Fig. 4)

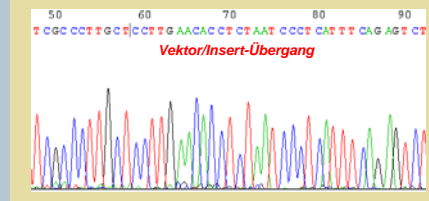
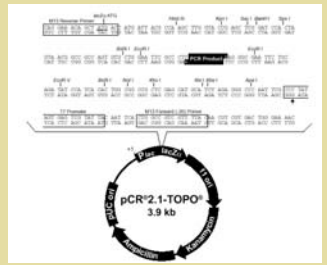


Fig. 5: Sequenzanalyse des Inserts

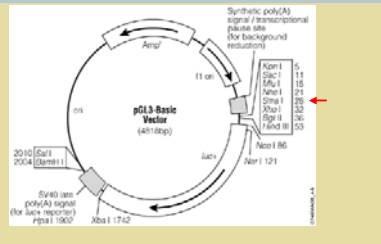
Zur Sequenzanalyse wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger eingesetzt, bei der durch markierte Didesoxynukleotide verschiedene lange DNA-Fragmente produziert werden. Aufgrund ihres unterschiedlichen Wanderungsverhaltens in der Kapillarelektrophorese erfolgt eine Auftrennung mit anschließender Detektion.

2. Umklonierung in den Reportergen-Vektor pGL3-Basic

Zur Verifizierung der Promotor-Aktivität wurde das Insert in den Reportergen-Vektor pGL3-Basic (Fig. 6) umkloniert. Dieser Vektor besitzt ein Gen für die Luciferase. Dieses Enzym ist durch eine Chemolumineszenzreaktion leicht nachweisbar. Durch Einfügen des Claudin-2-Promotors unmittelbar vor das Reportergen ist die Luciferase-Expression direkt abhängig von der Aktivität dieses Promotors. Die Umklonierung wurde durch eine weitere Sequenzierung überprüft.

Fig. 6: pGL3-Basic-Vektor

Für die Ligation wurde der Vektor mit der Restriktionsendonuklease SmaI linearisiert. Das Insert mit dem Claudin-2 Promotor wird direkt vor das luc-Gen ein geführt und dient somit als Promotor für die Luciferaseexpression.



3. Transfektion in HT-29/B6-Zellen (Ausblick)

Die Plasmide, die den Claudin-2-Promotor mit STAT-6-Bindungsstelle enthalten, werden nun in die humanen Colocarzinomzellen HT-29/B6 transfiziert und der Effekt von IL-13 auf die Luciferase-Expression untersucht. Diese gibt Auskunft über die Wirkung von IL-13 auf die Claudin-2-Promotoraktivität und dient somit als Modell für die durch IL-13 regulierte Claudin-2-Expression.