

1. Einleitung

1.1 Epithelien

Eine wesentliche Charakteristik des Lebens ist die Konstanzhaltung eines von der Umgebung verschiedenen inneren Milieus (Claude Bernard). Dies wird bei Eukaryonten im kleinen von den Membranen aller Zellen gewährleistet und im großen durch eine spezielle Gewebeart, den Epithelien.

Epitheliale Zellschichten kleiden alle inneren und äußeren Körperoberflächen aus und schaffen so mehr oder weniger isolierte Kompartimente. Dies geschieht durch zwei für Epithelien spezifische Charakteristika, erstens einen geregelten und gerichteten transepithelialen Transport von Soluten und Wasser und zweitens einer Barrierefunktion des Epithels.

Der gerichtete transepitheliale Transport setzt voraus, dass die Transportproteine der Zellmembranen (Kanäle, Carrier und die Sonderform der Carrier, ATPasen) in der apikalen Membran einerseits und in der basalen und lateralen Membran andererseits verschieden sind. Diese Asymmetrie der Transporter ist charakteristisch für Epithelien.

Wenn nicht ein weiteres Charakteristikum hinzukäme, würden sich die Membrantransporter jedoch alsbald wieder vermischen und außerdem würden die transzellulär transportierten Substanzen zwischen den Epithelzellen hindurch (=parazellulär) wieder zurück diffundieren (=Leckflux). Dieses weitere Charakteristikum der Epithelien (und vielen Endothelien) wird durch eine alle benachbarten Zellen verbindende Proteinstruktur gebildet, den Tight Junctions (**Abb. 1**). Sie haben demnach im wesentlichen zwei Funktionen (Diamond, 1977):

1. Verhinderung der Diffusion zwischen den Epithelzellen hindurch. Diese Abdichtung kann verschieden stark ausgeprägt sein. Sie ist außerdem regelbar und kann bei Erkrankungen stark verändert sein (Fromm et al., 1994). Wenn sie pro Flächeneinheit des Epithels geringer ist, als die der Zellmembranen mit ihren Transportern, spricht man von einem "lecken" Epithel. Leckepithelien finden sich typischerweise in den proximalen Segmenten von röhrenförmigen Epithelien (Beispiele: proximaler Nierentubulus, Dünndarm). Wenn die durch die Tight Junctions gebildete Barriere dichter als die der Zellmembranen ist, handelt es sich um "dichte" Epithelien.

Dichte Epithelien finden sich typischerweise in den distalen Segmenten von röhrenförmigen Epithelien (Beispiele: distaler Nierentubulus und Sammelrohr, Colon und Rektum). Eine weitere Gruppe bilden die "undurchlässigen" Epithelien, deren Tight Junction völlig undurchlässig ist und die auch kaum transzellulär transportieren (Beispiele: Harnblase, Epidermis) (Fromm, 2004).

2. Verhinderung der Diffusion von integralen Membranproteinen (z.B. den Kanälen, Carriern und ATPasen) und auch Lipidbestandteilen der Membran mit der Folge der Aufrechterhaltung der Unterschiedlichkeit von apikaler und basolateraler Membran.

Tight Junctions gehören mit mehreren anderen Strukturen zu der Gruppe der Zell-Zellverbindungen, die im folgenden vorgestellt werden.

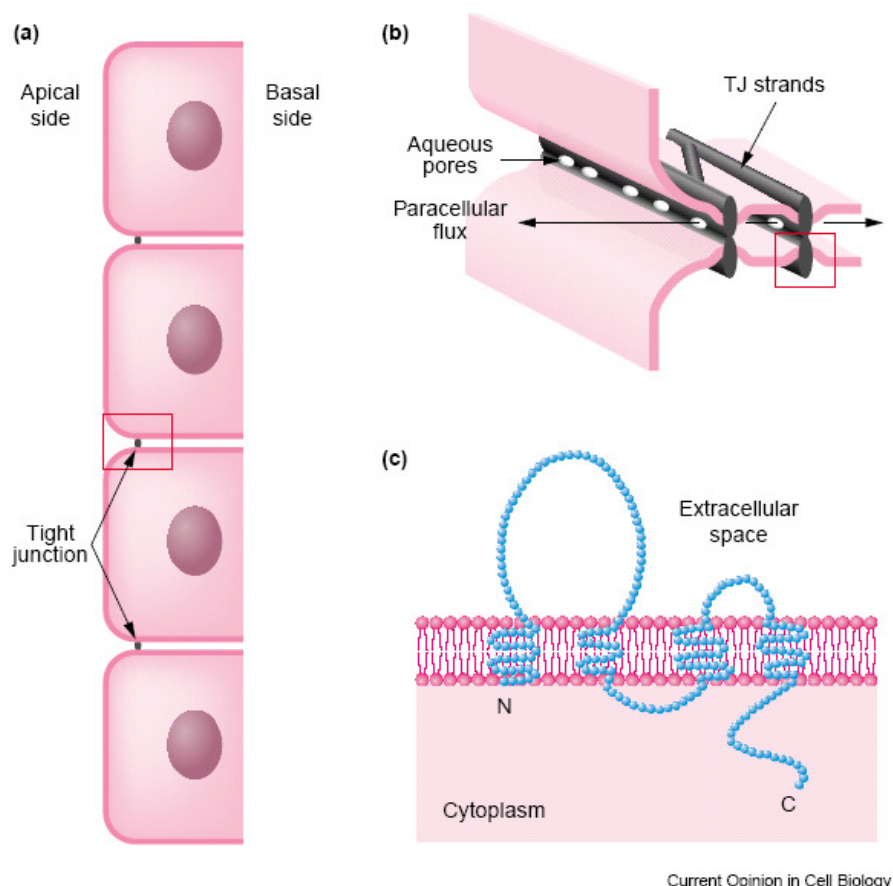


Abb. 1 Schemata des Tight junction-Aufbaus. (a) Lokalisation im Epithel, (b) Transepitheliale Barriere- und Poreneigenschaften, (c) Modell eines 4-Membrandomänen-Proteins (hier Claudin-1). (Aus: Tsukita & Furuse, 2002)

1.2 Zell-Zellverbindungen

An den epithelialen und endothelialen Zell/Zell- und vielen Zell/Matrix-Kontaktstellen findet man spezialisierte Zellverbindungen, die elektronenmikroskopisch im Dünnschnitt oder mit der Gefrierbruch-Technik sichtbar gemacht werden können. Die Zell-Zellverbindungen werden nach ihrer Funktion in drei Klassen eingeteilt:

Adherens Junction, Zonula adhaerens

Adherens Junctions bestehen aus vorwiegend Cadherinen, die – einmalig die Zellmembran durchspannend – feste Verbindungen zwischen benachbarten Zellen bilden und dadurch einen widerstandsfähigen mechanischen Zusammenhalt der Zellen gewährleisten. Besonders ausgeprägt sind die Haftverbindungen in Geweben, die starker mechanischer Beanspruchung ausgesetzt sind, so z.B. Herzmuskel und im Hautepithel. Es gibt drei Formen solcher Verbindungen, die sich in Struktur und Funktion unterscheiden: 1) Adhärenz-Verbindung, 2) Desmosomen und 3) Hemidesmosomen.

Gap Junction, Nexus, Konnexon

Gap Junctions werden durch Ansammlungen von je 6 Konnexinen gebildet, das sind vierfach die Membran durchspannende Proteine, die die Membranen zweier eng benachbarter Zellen verbinden. Die 6 Konnexine bilden eine zentrale Pore, die anorganischen Ionen und anderen kleinen Molekülen den direkten Übergang aus dem Zytoplasma der einen Zelle in das der anderen ermöglichen. Auf diese Weise verbinden sie die Zellen sowohl elektrisch ("elektrische Synapse") als auch metabolisch.

Tight Junction, Zonula occludens, Schlussleiste

Tight Junctions werden von den Proteinfamilien der Claudine, des Occludins und – etwas unterhalb der eigentlichen Tight Junction lokalisiert (Itoh et al., 2001) – des Junctional Adhesion Molecules (JAM) gebildet; hierzu später mehr im Detail. In elektromikroskopischen Aufnahmen erscheint die Tight Junction als gürtelähnliches Band aus verflochtenen Strängen, die jede Zelle der Epithelschicht umspannt (**Abb. 1**). Die beiden Hauptfunktionen der Tight Junctions, von Diamond (1977) anschaulich als "gate" und "fence" bezeichnet, wurden bereits oben beschrieben.

1.3 Tight Junction-Proteine

Erst vor etwa einem Jahrzehnt wurde das erste Tight Junction-Protein – Occludin – entdeckt (Furuse et al., 1993). Nach heutiger Kenntnis gehören zur Gruppe der Tight Junction-Proteine im engeren Sinn 1.) Occludin, 2.) die Familie der Claudine mit derzeit 24 Mitgliedern und 3.) das Junctional Adhesion Molecule (JAM) (**Abb. 2** und **Tabelle 1**).

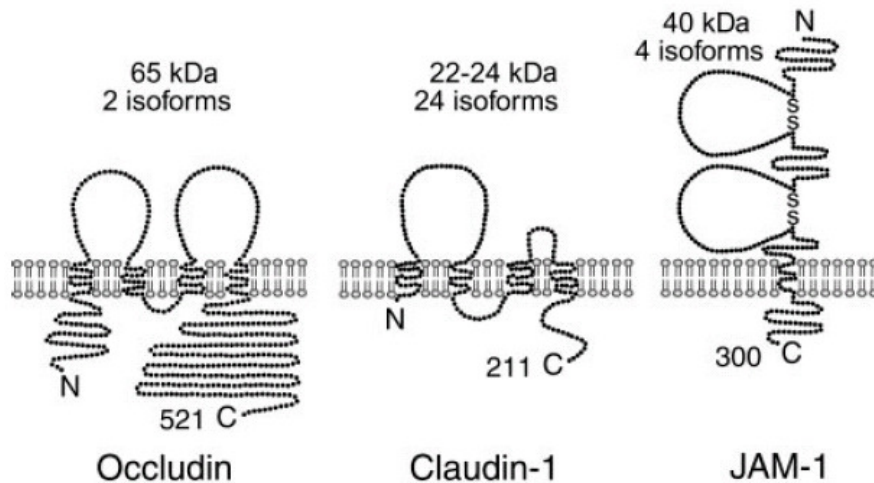


Abb. 2 Vertreter der drei Gruppen integraler Tight Junction-Proteine (Aus: Schneeberger & Lynch, 2004)

Von den "eigentlichen" transmembranären und zwei Zellen verbindenden Tight Junction-Proteinen zu unterscheiden sind zahlreiche intrazelluläre Proteine, die mit den Tight Junction-Proteinen assoziiert sind; zu ihnen gehören u.a. die Zonula Occludens-Proteine 1, 2 und 3 (ZO-1, ZO-2, ZO-3), RAB3B, RAB13, Symplekin, Cingulin, 7H6, AF-6 und 19B1. Da sie die die strukturelle Verankerung der Tight Junction-Moleküle bilden, sind sie zuerst dargestellt.

Tight Junction-Proteine	Molekulargewicht (kDa)
Occludin	65
Claudine (1-24)	22-23
JAM	36-41
Tight Junction-assoziierte Proteine	
ZO-1	210-225
ZO-2	160
ZO-3	130
RAB3B	25
RAB13	41

Symplekin	127
Cingulin	140
7H6	155
AF-6	180-196
19B1	210

Tabelle 1 Molekulargewichte der Tight Junction-Proteine und der Tight Junction-assoziierten Proteine

Tight Junction-assoziierte Proteine

Abb. 3 zeigt die wichtigsten Tight Junction-assoziierten Proteine in ihrer räumlichen Beziehung zu den Tight Junction-Proteinen.

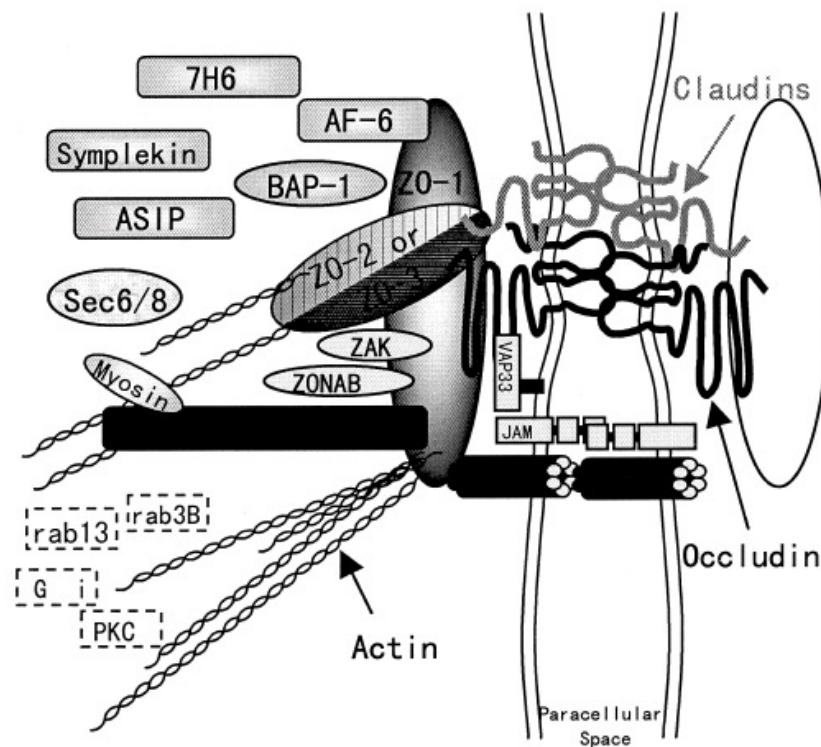


Abb. 3 Modellschema der räumlichen Beziehung zwischen Tight Junction-assoziierten Proteinen und Tight Junction-Proteinen (Aus: Mitic et al., 2000)

ZO-1 ist ein peripheres Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 210-225 kDa. Die biochemischen Analysen haben gezeigt, dass das *ZO-1* am Serin-Rest phosphoryliert ist. *ZO-1* kann auch in Zellen, die mit einem Aktivator der Tyrosinkinase oder Inhibitoren der Tyrosinphosphatase behandelt werden, am Tyrosin-Rest phosphoryliert werden. Die molekulare Klonierungen resultierten in der Identifizierung zweier Isoformen des *ZO-1*, welches auf alternatives RNA-Spleißen hindeutet.

tet. Die beiden Isoformen spielen eine funktionelle Rolle bei dem Zusammenbau und der Regulation der Tight Junction. Es ist auch bekannt, dass ZO-1 mit der Ras-Bindungsdomäne des AF-6 Proteins direkt interagiert. ZO-1 ist das Zentrum für die Wechselwirkung zwischen verschiedenen Proteinen (Stevenson et al., 1998; Citi & Cordenonsi, 1998). Es wurden auch andere Spleißformen von ZO-1 wie $\beta 1$, $\beta 2$ und γ identifiziert (Gonzalez-Mariscal et al., 2003).

ZO-2 ist ein peripheres Phosphoprotein, das am Tyrosin phosphoryliert ist. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 160 kDa und eine Sequenzhomologie mit ZO-1. Es geht an der zytoplasmatischen Seite der Tight Junction eine Wechselwirkung mit dem ZO-1-Protein ein (Gumbiner et al., 1991).

ZO-3 zeigt Sequenzhomologie zu den beiden ZO-1- und ZO-2-Proteinen. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 130 kDa und wird auch P130 genannt. ZO-3 steht mit dem ZO-1- und ZO-2-Proteinkomplex in Wechselwirkung (Balda & Anderson, 1993).

ZO-1, ZO-2 und ZO-3 gehören zur Familie der Membran-assoziierten Guanylat-Kinasen (MAGUK). Diese Proteinfamilie spielt eine große Rolle bei der Erschaffung und Aufrechterhaltung der Membrandomänen verschiedener Zelltypen (Itoh et al., 1999). Diese Moleküle besitzen drei verschiedene PDZ-Domänen, eine SH3-Domäne und eine Guanylat-Kinase (GUK)-Domäne (Stevenson & Keon, 1998). ZO-1, ZO-2 und ZO-3 sind über die PDZ-Domäne direkt mit der carboxyterminalen Domäne der Claudine assoziiert (Itoh et al., 1999). Der carboxyterminale Teil von ZO-1 und ZO-2 bindet wiederum an Actinfilamente.

Cingulin wurde durch monoklonale Antikörper auf der zytoplasmatischen Seite der Tight Junction in epithelialen und endothelialen Zellen identifiziert. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 140-160 kDa und ist ein Phosphoprotein (Stevenson & Keon, 1998). Das 7H6-Phosphoprotein hat ein Molekulargewicht von 155-175 kDa. Es wird sowohl in epithelialen und endothelialen Zellen exprimiert (Stevenson & Keon, 1998).

RAB3B-Protein wird in kultivierten und nativen Epithelien exprimiert. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 25 kDa und ist mit der zytoplasmatischen Seite der Tight Junction assoziiert (Stevenson & Keon, 1998). Das RAB13-Protein hat ein Molekulargewicht von 41 kDa und ist in apikalen Regionen der Lateralmembran der Epithelzellen lokalisiert (Zahraoui et al., 1994).

Symplekin wurde durch monoklonale Antikörper identifiziert. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 126,5 kDa und ist auf der zytoplasmatischen Seite der Tight Junction u.a. in Sertoli-Zellen des Hodens lokalisiert. Es wurde aus humaner Colon-cDNA kloniert. In kultivierten Fibroblasten wurde dieses Protein hauptsächlich im Nukleus gefunden (Keon et al., 1996).

AF-6 enthält eine Ras-Bindungsdomäne, eine PDZ- und eine Myosin V-ähnliche Domäne. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 180-195 kDa (Yamamoto et al., 1997). *In vitro*-Experimente zeigten, dass die Ras-Bindungsdomäne von AF-6 eine direkte Wechselwirkung mit ZO-1 eingeht (Stevenson & Keon, 1998).

19B1-Protein mit einem Molekulargewicht von 210 kDa wurde durch Zellfraktionierung mit monoklonalen Antikörpern an der Tight Junction identifiziert (Merzdorf et al., 1998).

Occludin

Occludin gehört zur Gruppe der integralen Membranproteine und ist daher ein Tight Junction-Protein im engeren Sinn. Es besitzt – wie die weiter unten beschriebenen Claudine – vier Membran-durchspannende Domänen, intrazelluläre C- und N-Termini und bildet zwei extrazelluläre Loops. Wie in **Abb. 3** dargestellt, besteht die Vorstellung, dass je 2 dieser Loops von Occludinen (und/oder Claudinen) benachbarter Zellmembranen aneinander lagern (Gonzalez-Mariscal et al., 2003).

Occludin ist mittels monoklonaler Antikörper gegen junctionale Membranfraktionen von Hühnerlebern gefunden worden (Furuse et al., 1993). Es besteht ca. eine 90%ige Aminosäure-Sequenzhomologie zwischen Mensch, Hund und Ratte, während die Sequenz bei Säugern und Huhn eine Homologie von nur 50% zeigt (Ando-Akatsuka et al., 1996). Das Protein hat ein Molekulargewicht von 58-82 kDa (im Durchschnitt 65 kDa) (Citi & Cordenonsi, 1998; Furuse et al., 1993; Yap et al., 1998).

Die erste extrazelluläre Schleife enthält zu 60% Tyrosin und Glycin und spielt eine Rolle bei der Zell-Zell-Verbindung (Ando-Akatsuka et al., 1996; Stevenson & Keon, 1998; Citi & Cordenonsi, 1998). Die zweite extrazelluläre Schleife ist an der Gestaltung der parazellulären Barriere beteiligt. Occludin enthält eine zytoplasmatische aminoternale Region mit 60 Aminosäureresten und längere carboxyterminale Region mit etwa 250 Aminosäureresten. Der Carboxyterminus des Occludins inter-

agiert mit dem ZO-1-Protein (Furuse et al., 1994). Das ZO-1-Protein wiederum geht eine Wechselwirkung mit ZO-2 und dem phosphorylierten Protein ZO-3 (P130) ein (Denker & Nigam, 1998; Citi & Cordenonsi, 1998). Durch Phosphorylierung unterliegt das Occludin einer posttranslationalen Modifikation (Sakakibara et al., 1997). Das Protein ist am Serin- und Threonin-Rest phosphoryliert. Die Phosphorylierungs- und Desphosphorylierungsreaktionen wurden auch an Mardin-Darby Canine Kidney (MDCK)-Zellen nachgewiesen (Citi & Cordenonsi, 1998). Es wird vermutet, dass die Phosphorylierung des carboxyterminalen Bereiches den Einbau von Occludin in die Zellmembran reguliert und die Bindung an ZO-1 ermöglicht (Furuse et al., 1994).

Neben dem ursprünglich entdeckten Occludin wurden in letzter Zeit einige Varianten identifiziert, die durch posttranskriptionales differentielles Spleißen zustande kommen. Das in MDCK-Zellen gefundene Occludin 1B ist geringfügig länger und besitzt einen anderen Aminoterminus. Das Molekulargewicht beträgt 70 kDa (Muresan et al., 2000). Es wurden drei weitere unterschiedliche Spleißvarianten des Occludin in cDNA aus humanem Colon und humaner Plazenta entdeckt. Die Analyse der Aminosäuresequenzen deuten auf gravierende Unterschiede gegenüber dem Occludin-Wildtyp (Typ I). Typ II fehlt die vierte Transmembrandomäne. Typ IV zeigt eine kleinere Deletion (18 Aminosäuren) in der carboxyterminalen Region. Beim Typ III ist neben der vierten Transmembrandomäne ein längerer Bereich der carboxyterminalen Sequenz deletiert. Durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass ZO-1 zwar mit Typ I und Typ IV, nicht aber mit den Typen II und III in der epithelialen Tight Junction colokalisiert ist (Mankertz et al., 2002).

Claudine

Das Wort Claudin kommt aus dem Lateinischen von „claudere“ (schließen). Bei den Claudinen handelt es sich um eine Genfamilie, von der bis heute 24 Mitglieder bekannt sind. Claudine sind wie das Occludin Membranproteine mit vier transmembranären Domänen. Claudine werden in epithelialen und endothelialen Zellen exprimiert. Es sind unterschiedliche Funktionen der Claudine wie z.B. Abdichtung oder Porenbildung charakterisiert worden. Man vermutet, dass das unterschiedliche Expressionsmuster der Claudine in verschiedenen Geweben für die unterschiedliche Dichtigkeit der Epithelien verantwortlich ist. So werden die Claudine-2 bis -5 in Duodenum, Ileum und Colon sowie in der Leber in verschiedenen Mengen exprimiert (Rahner et al., 2001). Claudin-4 wurde in großen Mengen im Oberflächenepithel von Dünn- und Dickdarm identifiziert, wohingegen für Claudin-2 im Dünndarm eine Ab-

nahme der Expression entlang der Krypten-Villus-Achse festgestellt wurde (Rahner et al., 2001). Die Claudine-3 und -5 wurden auf Zellen des Oberflächen-Epithels des Magens in der basolateralen Membran lokalisiert (Rahner et al., 2001). Die Claudine-7 und -8 wurden ebenfalls in der Lunge und der Niere gefunden (Morita et al., 1999a). Die Claudine-1 und -5 sind die wichtigste Bestandteile der Tight Junction in der Blut-Hirn-Schranke (Liebner et al., 2000a; Morita et al., 1999c).

Claudin-1 und Claudin-2 wurden aus junctionalen Fraktionen von Hühnerlebern isoliert. Die beiden Tight Junction-Proteine haben ein Molekulargewicht zwischen 22-23 kDa. Claudin-1 besteht aus 211 und Claudin-2 aus 230 Aminosäuren (Tsukita & Furuse, 1999). Die Aminosäuresequenzen zeigen eine Homologie von 38%. Es gibt jedoch keine Sequenzhomologie zum Occludin. Claudin-1 und Claudin-2 enthalten eine kurze aminoterminal und eine lange carboxyterminale Domäne sowie zwei extrazelluläre Loops. Der zweite Loop ist kürzer als der erste. Transfektionsexperimente deuten auf die Lokalisation der beiden Proteine in der Tight Junction hin (Furuse et al., 1998a). In Northern Blot-Analysen wurde die Claudin-1-mRNA als 4,0 kb-Bande in allen untersuchten Organen wie Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Niere, Hoden und Skelettmuskel entdeckt. Die Claudin-2-Expression beschränkt sich dagegen auf Leber und Niere und eine kleine Menge im Gehirn (Furuse et al., 1998a). In weiteren Studien wurde gezeigt, dass die Claudine-1 und -2 an der Bildung der Tight Junction-Stränge beteiligt sind (Furuse et al., 1998b). Durch die Überexpression von Claudin-1 nimmt der transepitheliale Widerstand in MDCK-Zellen zu, während der parazelluläre Transport reduziert wird. Gleichzeitig induziert die Überexpression von Claudin-1 die Expression von ZO-1. Die Wechselwirkung zwischen Claudin-1 und ZO-1 ist für die Barrierefunktion von Bedeutung (Inai et al., 1999).

Die humane Claudin-1 cDNA wurde zuerst aus humanen Mammaepithel-Zelllinien (HMECs) isoliert und dort als *Senescence-associated Epithelial Membrane Protein* (SEMPI) beschrieben. Die geringere Expression von SEMPI in Brusttumoren oder Brustkrebs-Zelllinien im Vergleich zu HMECs deutete zunächst auf eine Funktion als Tumor-Suppressor-Protein hin. Der Promotor für Claudin-1 enthält TATA-Box und SP1 Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle. Mutationsanalysen im Claudin-1-Gen und im Promotor lieferten jedoch keine weiteren Anhaltspunkte zum Verlust der Claudin-1-Expression in Brustkrebs-Zelllinien (Krämer et al., 2000; Swiss-

helm et al., 1999). In Astrozyten wurde die vermehrte Expression von Claudin-1 nach der Behandlung der Zellen mit Interleukin-1 β (IL-1 β) beobachtet (Duffy et al., 2000).

Es wurde durch Expressions-Experimente in Fibroblasten festgestellt, dass nicht alle Claudine untereinander Bindungen ausbilden können. So zeigten Zellen, die Kombinationen aus den Claudinen-1/-3 oder den Claudinen-2/-3 exprimierten, adhesive Eigenschaften, während die Kombination Claudin-1/-2 mit Claudin-2 keine Interaktion zeigten (Furuse et al., 1999). Durch die Expression von zwei Claudinen in jeder Zelle und der freien Kombination der Zellen untereinander stellte sich heraus, dass die Claudine innerhalb einer Zelle Heteropolymere ausbildeten und sich den gegenüber liegenden Zellen bindungsfähig anordneten. Dabei entstand die im apikalen Bereich der Zellen für die Tight Junction typische verzweigte, netzartige Struktur (Tsukita & Furuse, 2000).

Claudin-1 und Claudin-4 werden sowohl von der hochohmigen Zelllinie MDCK-I (C7) als auch der niederohmigen Zelllinie MDCK-II (C11) exprimiert, während die Claudin-2-Expression sich auf MDCK-II (C11)-Zellen beschränkt. Die Expression des Claudin-2-Proteins korreliert mit der Abnahme des transepithelialen Widerstandes (Furuse et al., 2001). Nach neuesten Erkenntnissen ist Claudin-2 für die Ausbildung parazellulärer, kationenselektiver Poren von Bedeutung (Amasheh et al., 2002).

Claudin-3 (RVP1; *rat ventral prostate-1*) und Claudin-4 (CPE-R; *Clostridium perfringens*-Enterotoxinrezeptor) zeigen eine deutliche Sequenzhomologie. *Clostridium perfringens*-Enterotoxin (CPE) ist ein 35 kDa-Protein mit 319 Aminosäuren, das sich mit seinem carboxyterminalen Ende an Claudin-3 und Claudin-4 bindet (Sonoda et al., 1999). Für Claudin-3 ist bekannt, dass CPE an den zweiten extrazellulären Loop des Proteins bindet (Fujita et al., 2000). Die aminoterminalen Domäne von CPE spielt bei der Zunahme der Membranpermeabilität durch Ausbildung von Poren in der Plasmamembran eine Rolle (Sonoda et al., 1999). Claudin-3 wird hauptsächlich in Lunge, Leber und Niere exprimiert. Claudin-4 wird in Lunge und Niere exprimiert (Morita et al., 1999a). Mit der Überexpression von Claudin-4 in MDCK Zellen nimmt die parazelluläre elektrische Leitfähigkeit und die selektive Na⁺- Permeabilität ab, wobei keine signifikante Änderung bei der Cl⁻- Permeabilität beobachtet werden kann (Van Itallie et al., 2001).

Durch die Überexpression von Claudin-4 in MDCK-Zellen nimmt der transepitheliale Widerstand zu, wobei die parazelluläre Permeabilität für Na^+ -Ionen abnimmt. Durch den Austausch einer negativen Ladung gegen eine positive Ladung an Aminosäureposition 65 der ersten extrazellulären Domäne des Claudin-4-Proteins konnte eine erhöhte parazelluläre Na^+ -Permeabilität provoziert werden (Colegio et al., 2002).

Claudin-5 wurde zunächst als TMVCF (*transmembrane protein deleted in velo-cardio-facial syndrome*)-Protein identifiziert, das bei einem weiten Spektrum hereditärer Erkrankungen deletiert ist (Sirotkin et al., 1997). Das humane TMVCF-Gen ist auf dem Chromosom 22q11 lokalisiert. Dieses Protein besteht aus 219 Aminosäuren und wird in zahlreichen Geweben (Herz, Gehirn, Skelettmuskel, Leber, Niere, Hoden, Lunge u.a.) exprimiert (Sirotkin et al., 1997; Morita et al., 1999c). Experimente mit Claudin-5-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass dieses Protein eine wichtige Komponente in der Permeabilitätsbarriere der Blut-Hirn-Schranke darstellt (Nitta et al., 2003).

Claudin-6-cDNA wurde in embryonalen Stammzellen der Maus gefunden. Die Claudin-6-Expression ist eng verbunden mit der Expression des epithelialen Markers Keratin-8 (Turksen & Troy, 2001). Transgene Mäuse, die Claudin-6 überexprimieren, zeigen einen starken Wasserverlust als Folge einer gestörten epidermalen Barriere (Turksen & Troy, 2002).

Claudin-11, auch bekannt als Oligodendrozyten-spezifisches Protein, wird in Gehirn und Hoden exprimiert. Dieses Molekül ist eine spezifische Komponente in der Tight Junction der Myelinschicht von Oligodendrozyten und Sertoli-Zellen der Hoden. Das Protein enthält 270 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 33,1 kDa. Die carboxyterminale Domäne des Claudin-11-Proteins zeigt eine Affinität zu ZO-1, ZO-2 und ZO-3 (Morita et al., 1999b).

Claudin-15 bildet Na^+ -selektive parazelluläre Ionenkanäle. Durch den Austausch von negativen Ladungen gegen positive Ladungen an drei Aminosäurepositionen der ersten extrazellulären Domäne des Claudin-15-Proteins wurde eine Veränderung in Richtung einer Cl^- -Selektivität erzeugt (Colegio et al., 2002).

Claudin-16 (früherer Name: Paracellin-1) ist Bestandteil der Tight Junction im dicken aufsteigendem Ast der Henle-Schleife der Niere. Claudin-16 bildet parazelluläre Poren für Mg^{2+} und – vermutlich – für Ca^{2+} . Claudin-11 ist der Haupt-

Resorptionsort für Mg^{2+} in der Niere. Durch spezifische Mutationen im Claudin-16-Gen verliert das Protein seine Funktion, wobei funktionelle Anomalien und Krankheiten hervorgerufen werden können, wie z.B. Hypomagnesiämie, Nierensteine, Harnwegsinfekte und Herzrhythmusstörungen (Simon et al., 1999).

Junctional adhesion molecule (JAM)

JAM wird ebenfalls zur Gruppe der Tight Junction-Proteine gezählt, da es ein transmembranales Protein ist, das unmittelbar basal der anderen Tight Junction-Proteine Occludin und Claudin angeordnet ist (Itoh et al., 2001). Es bildet wie diese Verbindungen mit gegenüberliegenden Partnern benachbarter Zellen (siehe Abb. 3), aber auch mit anderen Liganden.

JAM besitzt im Gegensatz zu den anderen Tight Junction-Proteinen nur eine Transmembran-Domäne und hat ein Molekulargewicht von 36-41 kDa (Citi & Cordenosi, 1998). Es wird nach neuerer Nomenklatur in drei Unterformen eingeteilt, JAM-A, JAM-B und JAM-C (Muller, 2003). Das Protein wird zur Immunglobulin-Großfamilie gezählt, da sein extrazellulärer Teil zwei Immunglobulin-artige Domänen vom Typ V_H und C_2 bildet (siehe **Abb. 2**). JAM kommt auch in Leukozyten und Thrombozyten vor.

JAM besitzt zwei ganz unterschiedliche Funktionen, zu denen jedoch nicht die Barrierefunktion zählt (Martin-Padura et al., 1998):

1.) Zell-Zell-Adhäsion. Es wird angenommen, dass nach Ausbildung primärer Adhäsions-Komplexe benachbarter Zellen durch Nectin und E-Cadherin im Bereich der Adhärenz Junction in der Folge JAM als erstes Protein die Ausbildung der Tight Junction einleitet (Takai & Nakanishi, 2003).

2.) An Endothelien wurde gezeigt, dass JAM den Gefäßaustritt von Monozyten und anderen immunkompetenten Zellen vermittelt (Muller, 2003; Bazzoni, 2003).

1.4. Der Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine auf die epitheliale Barriere bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Zu den wichtigsten Darmkrankheiten zählen *Colitis ulcerosa* und *Morbus Crohn*. *Morbus Crohn* ist eine chronisch entzündliche Darmkrankheit, die überwiegend den unteren Teil des Dünndarms (Ileum) und den Dickdarm befällt. Sie ist häufig mit Geschwürbildung verbunden. Die Ursache ist unbekannt. Es treten verschie-

dene Beschwerden wie Schmerzen in der unteren rechten Seite des Bauches, leichtes Fieber, Appetitlosigkeit und Diarrhoen auf. *Colitis ulcerosa* ist eine chronische Entzündung des Dickdarms und des Rektums. Die Krankheit kann Jahre dauern und ist mit Geschwürbildung und blutigen Diarrhoen verbunden. Sie führt zu einem erhöhten Darmkrebsrisiko.

Mittlerweile geht man von der Vorstellung aus, dass es sich bei den auftretenden Diarrhoen um eine sogenannte Leckflux-Diarrhoe handelt, die durch eine Störung der epithelialen Barriere verursacht wird. Die ungenügende parazelluläre Abdichtung des epithelialen Zellverbandes führt dabei zu einer Diffusion zuvor resorbierter Ionen sowie zu einem Übertritt von Wasser aus den subepithelialen Kapillaren in das Darmlumen (Fromm et al., 1994). Als Ursache für die Barrierestörung können sowohl epitheliale Apoptosen (Gitter et al., 2000) als auch eine Störung der Tight Junction (Schmitz et al., 1999a) verantwortlich sein.

In der intestinalen Mukosa spielt die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin-12 (IL-12) eine wichtige Rolle bei der Pathogenese. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde parallel zur Vermehrung der TNF α Produktion eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in der Mukosa beobachtet. CD4-positive T-Lymphozyten werden bei *Morbus Crohn* durch IL-12 aktiviert. Sie werden dabei zu T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1-Zellen) differenziert. Th1-Zellen wiederum sezernieren Interferon γ (IFN γ). IFN γ seinerseits aktiviert Makrophagen und stimuliert die TNF α Produktion (Wittig et al., 2001).

Mittlerweile geben eine Vielzahl von experimentellen Arbeiten Hinweise auf den Wirkungsmechanismus dieser Zytokine auf die epitheliale Barriere. TNF α beeinflusst die Barriereigenschaften der humanen intestinalen Zelllinie HT-29/B6 (Kreusel et al., 1991) in der Weise, dass der transepitheliale elektrische Widerstand reduziert und die Permeabilität für Mannitol erhöht wird. Analysen mit Hilfe der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie zeigten, dass dabei TNF α eine Änderung in der Netzwerk-Konfiguration der epithelialen Tight Junction induziert. IFN γ verstärkt die TNF α Wirkung (Schmitz et al., 1999b). Die Untersuchung von Sigma-Biopsien von Patienten mit kollagener Colitis, einer weiteren Form der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, ergab eine Reduzierung der Occludin- und Claudin-4-Protein-Expression (Bürgel et al., 2002). Weitere Studien deuten auf die Reduzierung der Occludin-

Expression in Astrozyten durch $\text{TNF}\alpha$, während $\text{TNF}\alpha$ keinen Effekt auf die Occludin-Expression in endothelialen Gehirnzellen und MDCK-Zellen zeigt (Wachtel et al., 2001). Auch in primären HAE (*Human Airway Epithelial*) Zellen wird die Expression von Claudin-1 und Claudin-4 durch den Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ nicht verändert (Coyne et al., 2002).

Durch die Nutzung neuer Arzneistoffe wie dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 und anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antikörper (Infliximab, cA_2 , Remicade), die seit 1999 in Deutschland zugelassen sind, konnten Fortschritte in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen erreicht werden. Allerdings traten bei der Therapie mit anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antikörpern auch gravierende Nebenwirkungen auf, wie z.B. allergische Reaktionen oder die Aktivierung einer Tuberkulose. Durch eine in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Studie wurde kürzlich die Reduzierung der epithelialen Apoptoserate und eine Verbesserung der epithelialen Barrierefunktion an Colonbiopsien bei Patienten mit *Morbus Crohn* nach Behandlung mit den anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antikörpern beobachtet (Zeissig et al., 2004).

1.5. Die Regulation der Genexpression von Tight Junction Proteinen

Die Kontrolle der Genexpression bei Eukaryonten erfolgt hauptsächlich auf der Ebene der Transkription. Jedes Gen steht mit regulatorischen DNA-Sequenzen in Verbindung, mit dem das Gen zur richtigen Zeit und in der richtigen Zelle transkribiert wird. Der Promotor ist auf der Ebene der genomischen DNA das entscheidende *in cis* regulative Element. Startpunkt und Effizienz der mRNA-Synthese wird durch den Promotor definiert. Die Basensequenzen der Promotoren unterschiedlicher Gene sind nicht identisch. Allerdings besitzen sie übereinstimmende Merkmale, die sich durch idealisierte Konsensus-Sequenzen darstellen lassen. Die Transkriptionsfaktoren kommen als *in trans* essentieller Bestandteil der Genregulation mit den *in cis* essentiellen DNA-Sequenzen im Promotor in Wechselwirkung. Der Komplex aus RNA-Polymerase II und generellen Transkriptionsfaktoren bindet an den Promotor und initiiert die Transkription.

Eine Grundlage der Genregulation ist die Wechselwirkung von spezifischen transaktivierenden Transkriptionsfaktoren mit spezifischen Bindungsstellen im Promotor eines Gens. Die Transkriptionsfaktoren sind als *in trans* aktive Faktoren oftmals Empfänger von Signalen, die über mehrere Stationen von der Zelloberfläche

oder aus dem Zytoplasma in dem Zellkern gelangen. Dieser Vorgang wird als Signaltransduktion bezeichnet.

Das Tight Junction-Protein Claudin-1 wird in humanen colorektalen Karzinomen verstärkt exprimiert. Außerdem wurden in Colonicarcinomzellen größere Mengen des Proteins β -Catenin in freier Form gefunden. Weiterhin wurden auf dem Claudin-1 Promotor zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Lymphoid enhancer-Faktor / T-Zell-Faktor (LEF/TCF) identifiziert. Diese Beobachtungen deuten auf eine Hochregulation des Claudin-1-Proteins durch Aktivierung des β -Catenin/LEF/TCF-Komplexes hin. Dieser Zusammenhang konnte durch eine Verminderung der Claudin-1-Expression in der Colonicarcinom-Zelllinie SW 480 nach Wiederherstellung des β -Catenin / Adenomatosis Polyposis Coli (APC)-Komplexes durch Transfektion nachgewiesen werden (Miwa et al., 2000).

Der Claudin-2-Promotor besitzt zwei spezifische Bindungsstellen für caudal related homebox (Cdx)-Proteine sowie für den *Hepatocyte Nuclear Faktor alpha* (HNF-1 α). Cdx-1 und Cdx-2 sind die Mitglieder einer Genfamilie, die Sequenzhomologie zum *caudal*-Gen von *Drosophila melanogaster* zeigen. Diese beiden Transkriptionsfaktoren sind für die Differenzierung und Aufrechterhaltung des differenzierten Status der epithelialen Zellen wichtig. Cdx-1 und Cdx-2 aktivieren den Claudin-2 Promotor in der humanen epithelialen intestinalen Zelllinie Caco-2. HNF-1 α verstärkt die transkriptionale Aktivierung von Cdx-2 auf den Claudin-2 Promotor. HNF-1 α ist für die Claudin-2 Expression in den Villi der Epithelien im Ileum und der Leber, aber nicht in der Niere von Bedeutung (Sakaguchi et al., 2002). Die Strukturanalyse der Promotorsequenz zeigt weiterhin zwei Bindungsstellen für nukleäre Effektoren des Wnt/ β -Catenin Signaltransduktionsweges (LEF/TCF). Durch Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) wurde bewiesen, dass nur die erste LEF/TCF Bindungsstelle bei der Bindung von LEF-1-Protein eine Rolle spielt. Die Claudin-2 Promotoraktivität wurde nach Überexpression von β -Catenin und LEF-1 erhöht. Die erhöhte Claudin-2 Promotoraktivität wurde durch die Mutation der ersten LEF/TCF Bindungsstelle reduziert. Auch für einen weiteren nukleären Effektor des Wnt-Signaltransduktionsweges (TCF-4) konnte gezeigt werden, dass er die Promotoraktivität erhöht. Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Expression von β -Catenin gesteigert. Das bedeutet, dass die Interaktion zwischen Faktoren des Wnt-Signaltransduktionsweges und der Claudin-2 Promotorsequenz eine wichtige Rolle für die Regulation der Genexpressi-

on von Claudin-2 spielt. Darüber hinaus belegten Mutationsexperimente an den Cdx- und LEF/TCF-Bindungsstellen im Claudin-2 Promotor einen funktionellen Zusammenhang zwischen diesen beiden für die Zelldifferenzierung wichtigen Signaltransduktionswegen (Mankertz et al., 2004).

Die Veränderung der Expression einzelner Tight Junction-Proteine bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde bereits im vorigen Kapitel (1.4.) beschrieben. Auch auf mRNA Ebene wurde eine Veränderung der Occludin-Expression durch pro-inflammatorische Zytokine festgestellt (Mankertz et al., 2000). Daher wurde für das humane Occludin der Promotor identifiziert und charakterisiert (Tavalali, 1999). Für ein 1853 bp langes Fragment aus humaner genomischer DNA, das den Transkriptionsstartpunkt für die Occludin mRNA enthält, konnte in Reporter-Gen-Analysen die Promotoraktivität funktionell bestätigt werden. Unter dem Einfluss der pro-inflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ konnte eine deutliche Reduzierung der Promotoraktivität verzeichnet werden (Mankertz et al., 2000). Weiterhin konnte ein alternativer Promotor isoliert und mittels Reporter-Gen-Analyse funktionell bestätigt werden. Die Transkription von diesem Promotor führt zu einem Austausch des untranslatierten ersten Exons. Die Promotoraktivität verringert sich ebenfalls durch die Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ (Mankertz et al., 2002).