

2. Fragestellung

Der epitheliale Zellverband übernimmt Transportfunktionen, andererseits stellt er eine Permeabilitätsbarriere dar. Bei der Herstellung von Zell-Zell-Kontakten und der Ausbildung der epithelialen Barriere spielen die Tight Junction-Proteine eine wesentliche Rolle. Es sind neben dem Tight Junction-Protein Occludin die Proteinfamilie der Claudine, das JAM und eine Reihe von Tight Junction-assoziierten Proteinen identifiziert worden. In der eigenen Diplomarbeit ist bereits der Occludin Promotor mit einer 1853 bp langen Sequenz identifiziert und analysiert worden (Tavalali, 1999).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten weitere an der Expression der humanen Tight Junction-Gene, insbesondere der Claudine, beteiligte regulatorische Elemente der Genexpression isoliert sowie strukturell und funktionell analysiert werden. Zur funktionellen Analyse sollte auch die der Wirkung pro-inflammatorischer Zytokine auf die Promotoraktivität untersucht werden.

Als Ausgangsmaterial sollten entweder Restriktionsfragmente humaner genomischer DNA oder die in Cosmid-Bibliotheken des Deutschen Ressourcenzentrums für das humane Genomprojekt klonierte humane genomische DNA verwendet werden. Durch PCR mit genspezifischen Oligodesoxynukleotiden oder mittels Hybridisierung mit genspezifischen Sonden sollten die Bereiche, die stromaufwärts der bekannten Claudin-cDNA-Sequenzen liegen, isoliert und durch Sequenzanalyse strukturell charakterisiert werden.

Zur funktionellen Analyse der Promotoren sollten diese in einen Luciferase-Reporter-Gen-Vektor umklontiert und in die humane intestinale Zelllinie HT-29/B6 transfiziert werden. Die Claudin-Promotor-vermittelte Luciferase-Expression sollte anschließend luminometrisch bestimmt werden. Weiterhin sollte die Veränderung der Claudin-Promotor-Aktivität durch pro-inflammatorische Zytokine untersucht werden, die im Rahmen von intestinalen Entzündungen vermehrt freigesetzt werden wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und IL-6, um Aufschluss über die entzündlichen Barrierestörungen zugrunde liegenden Veränderungen der Tight Junction zu erhalten.