

6. Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Erkrankungen des Darmes und anderer Organe äußern sich häufig in einer erhöhten Durchlässigkeit der epithelialen Barriere. Die Tight Junction epithelialer Zellen spielt bei der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion eine entscheidende Rolle. Die Integrität der Tight Junction wird durch pro-inflammatorische Zytokine, die bei entzündlichen Prozessen vermehrt gebildet werden, gestört. Über die molekularen Mechanismen des Zytokin-vermittelten Barriere-defektes ist derzeit noch wenig bekannt. In den letzten Jahren wurden mit *Occludin*, den *Claudinen* und dem *Junctional Adhesion Molecule* eine Reihe von Tight Junction-Proteinen identifiziert. Ziel dieser Arbeit war es, die Promotoren als *in cis*-regulatorische Elemente der Genexpression verschiedener Claudine zu isolieren und den Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine auf die Promotor-Aktivität zu untersuchen.

Mit Hilfe der Genom Walking-Methode und dem Screening genomischer Bibliotheken wurde die potentiellen regulatorischen Elemente für Claudin-1 (798 bp), Claudin-2 (420 bp), Claudin-3 (628 bp) und Claudin-4 (357 bp) isoliert und nach Sequenzierung strukturell charakterisiert. Die Fragmente wurden zur Bestimmung ihrer Promotor-Aktivitäten ganz oder teilweise in einen Luciferase-Reporter-gen-Vektor umkloniert. Nach Transfektion der Promotor-Konstrukte in die humane intestinale Zelllinie HT-29/B6 konnte eine gesteigerte Enzymaktivität im Vergleich zum promotorlosen Konstrukt nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung des Einflusses pro-inflammatorischer Zytokine auf die Claudin-Promotor-vermittelte Genexpression wurde die Promotor-Aktivität nach Transfektion in HT-29/B6-Zellen - einer humanen Colon-Zelllinie - und Inkubation mit Tumornekrosefaktor α , Interferon γ und Interleukin-6 bestimmt.

Alle vier Promotoren zeigten eine Verminderung der Promotor-Aktivität durch die Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$. Nach Inkubation mit $\text{IFN}\gamma$ konnte keine Veränderung nachgewiesen werden. Die Inkubation des Promotors für Claudin-2, einem Protein, dass als Kationen-selektive Pore die epitheliale Tight Junction permeabilisiert, mit Interleukin-6 führte dagegen zu einer Erhöhung der Promotor-Aktivität.

Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass die epitheliale Tight Junction bei Entzündungsprozessen durch regulatorischen Einfluss von Zytokinen

auf den Promotor im Sinne einer Expressionsregulation beeinflusst wird. Eine Steigerung der Claudin-2 Expression durch IL-6 in Verbindung mit einer Herabregulation der abdichtenden Tight Junction-Proteine Claudin-1, -3, und -4 bewirkt insgesamt eine Erhöhung der Permeabilität für kleine Solute. Das kann einerseits einen protektiven Effekt im Sinne einer Wegschwemmung luminaler Noxen und Antigene bewirken. Andererseits kann bei dieser Art der Barrierestörung eine gesteigerte Permeation entzündliche Prozesse in der Darmwand fördern.