

Aus der Medizinischen Klinik I
Gastroenterologie / Infektiologie / Rheumatologie
Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

**Transkriptionelle Regulation der Genexpression der
Tight junction-Proteine Claudin-1 und Claudin-2
durch den Wnt-Signalweg**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades Doctor rerum naturalis

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Bernd Hillenbrand

Diplom Biochemiker aus St. Ingbert

September 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg-Dieter Schulzke

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Gerd Multhaup

Tag der Disputation: 13.01.2006

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin,
Campus Benjamin Franklin

**Ich widme diese Arbeit meinen Eltern,
deren Liebe und Rückhalt ich soviel verdanke.**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Epithelien	6
1.2	Zell-Zell-Kontakte	7
1.3	Proteine der Tight junction	10
1.4	Der Wnt-Signalweg	18
1.5	<i>Cdx</i> -Gene	21
2	Zielsetzung	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	24
3.1.1	Laborgeräte	24
3.1.2	Verbrauchsmaterial	24
3.1.3	Puffer und Lösungen	25
3.1.4	Zelllinien	27
3.1.5	Primer	27
3.1.6	Plasmide	28
3.2	Molekularbiologische Methoden	28
3.2.1	EMSA (Gelretardations-Assay)	28
3.2.2	Gerichtete Mutagenese mittels PCR	31
3.2.3	Transformation von DNA in kompetente Zellen	32
3.2.4	Plasmid Miniprep	32
3.2.5	Plasmid Midiprep	32
3.2.6	Quantifizierung von DNA	33
3.2.7	Restriktionsanalyse	33
3.2.8	Agarosegel Elektrophorese	34
3.2.9	Sequenzierung von DNA	35
3.2.10	Glycerolstocks	36
3.3	Zellkulturtechniken	36
3.3.1	Anzucht von eukaryontischen Zellkulturen	36
3.3.2	Zellzählung	37
3.3.3	DNA Transfer in eukaryote Zellen	37
3.3.4	Dual-Reportergen-Assay	38
4	Ergebnisse	41
4.1	Regulation des Claudin-1-Promotors durch den Wnt-Signalweg	41
4.1.1	Einfluss von Wnt auf den Claudin-1-Promotor	43
4.1.2	Identifizierung von LEF/TCF Bindungsstellen im Claudin-1-Promotor	44
4.1.3	Herstellung eines Claudin-1 Reportergen-Konstruktes mit inaktivierter LEF/TCF-Bindungsstelle	47
4.1.4	Beeinflussung des Claudin-1-Promotors durch LEF/TCF	49
4.2	Regulation des Claudin-2-Promotors durch den Wnt-Signalweg	50
4.2.1	Einfluss von Wnt auf den Claudin-2-Promotor	51
4.2.2	Identifizierung von LEF/TCF Bindungsstellen im Claudin-2-Promotor	52
4.2.3	Herstellung eines Claudin-2 Reportergen-Konstruktes mit inaktivierter LEF/TCF-Bindungsstelle	54

4.2.4	Beeinflussung des Claudin-2-Promotors durch LEF/TCF.....	55
4.2.5	Cdx-abhängige Beeinflussung des Claudin-2-Promotors.....	57
4.2.6	Funktioneller Crosstalk zwischen dem Wnt-Signalweg und der Cdx abhängigen Transkriptionsaktivierung	59
5	Diskussion	62
6	Zusammenfassung	69
7	Abstract	71
8	Abkürzungsverzeichnis	73
9	Literaturverzeichnis	74