

**Modulation  
epithelialer Zell-Zellkontakte  
durch TFF3**

**Inauguraldissertation**

vorgelegt am

Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie

der Freien Universität Berlin

**Dirk Oliver Meyer zum Büschenfelde**

Berlin, 2004

Die praktischen Arbeiten für die hier vorliegende Dissertation wurden am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Charité – Universitätsmedizin Berlin der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. R. Tauber

Univ.-Prof. Dr. M. Kalesse

Tag der Disputation:

08.07.2004

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Epitheliale Zell-Zellkontakte.....	1
1.1.1	Der molekulare Aufbau der <i>Adherens Junctions</i> .....	2
1.1.2	Der molekulare Aufbau der <i>Tight Junctions</i> .....	4
1.1.3	Zell-Zellkontakte und ihre biologische Bedeutung.....	5
1.1.4	Regulation epithelialer Zell-Zellkontakte.....	7
1.2	TFF-Peptide.....	10
1.2.1	TFF-Peptide und ihre Expression.....	10
1.2.2	Biologische Wirkungen der TFF-Peptide.....	15
1.3	Fragestellung.....	18
<b>2</b>	<b>Material</b> .....	<b>19</b>
2.1	Allgemeine Hinweise.....	19
2.2	Laborgeräte.....	19
2.2.1	Bakterien und Zellkultur.....	19
2.2.2	Elektrophorese und Western Blot.....	19
2.2.3	Zentrifugen.....	20
2.2.4	Sonstige Geräte.....	20
2.3	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.3.1	Chemikalien.....	21
2.3.2	Zellkulturbedarf.....	22
2.3.3	Molekulargewichtsstandards für Proteine und DNA.....	22
2.3.4	Antikörper.....	22
2.3.5	Enzyme, Proteine und Reaktionskits.....	24
2.3.6	Sonstiges Verbrauchsmaterial.....	24
2.4	Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien.....	25
2.5	Vektoren und cDNAs.....	25
2.6	Oligonukleotide.....	26

<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>28</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden .....	28
3.1.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	28
3.1.2	Isolierung von Nukleinsäuren .....	28
3.1.3	DNA-Modifikation mit Bisulfit .....	30
3.1.4	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren .....	30
3.1.5	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktionen .....	31
3.1.6	Klonierung von DNA in Plasmide .....	32
3.1.7	Sequenzierung von DNA .....	33
3.2	Zellbiologische Methoden .....	33
3.2.1	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen .....	33
3.2.2	Kultivierung und Transfektion von eukaryontischen Zellen .....	34
3.2.3	Selektionierung stabil transfizierter Einzelklone .....	36
3.2.4	Proliferationsassay .....	37
3.2.5	Migrationsassay .....	37
3.3	Proteinbiochemische und immunologische Methoden .....	38
3.3.1	Expression und chromatographische Reinigung rekombinanter Proteine .. .....	38
3.3.2	Lyse von Zellen .....	39
3.3.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	39
3.3.4	SDS-Gelelektrophorese .....	39
3.3.5	Gelfärbung und Trocknung .....	40
3.3.6	Western Blot und Immunodetektion .....	41
3.3.7	Immunpräzipitation .....	42
3.3.8	Pulse Chase-Experimente .....	43
3.3.9	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie .....	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>45</b>
4.1	Expression von FLAG-getagtem hTFF3 in stabil transfizierten epithelialen Zellen .....	45
4.1.1	Stabile Transfektion von HT29/B6 und MDCK-Zellen mit pFLAG- hTFF3 .....	45
4.1.2	Nachweis des FLAG-getagten hTFF3-Peptids .....	46

4.2	FLAG-hTFF3-transfizierte Zellen weisen eine Erhöhung der Migration und eine Veränderung des Aktincytoskeletts auf.....	49
4.3	Untersuchung des E-Cadherin/Catenin-Komplexes .....	54
4.3.1	Der E-Cadherin/Catenin-Komplex in FLAGTFF3-transfizierten Zellen....	54
4.3.2	Transkriptionelle Regulation von E-Cadherin in FLAG-hTFF3-transfizierten Zellen.....	56
4.3.3	Verringerung der E-Cadherin Stabilität in FLAG-hTFF3-transfizierten HT29/B6 Zellen.....	62
4.3.4	Untersuchung von <i>Tight Junctions</i> -Proteinen .....	65
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>76</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>95</b>
	Abstract.....	95
	Danksagung.....	96
	Curriculum Vitae.....	97